

Artículo Original

Detección del Gen *cagA* y Tipificación del Gen *vacA* en Cepas de *Helicobacter pylori* Aisladas de Pacientes con Enfermedad Úlceropéptica en Risaralda

José Ignacio Moncayo*
Jorge Javier Santacruz*

Resumen

Se estableció la presencia del gen *cagA* y su asociación con subtipos específicos del gen *vacA* en 21 cepas de *H. pylori* cultivadas de 73 pacientes con enfermedad úlcero-péptica (EUP) que asistieron a la Unidad de Gastroenterología del Centro de Especialistas de Risaralda. A partir del ADN genómico extraído de las cepas de *H. pylori* cultivadas se realizaron tres PCRs: PCR-*ureC*, PCR-*cagA* y PCR-*vacA*. La PCR-*cagA* detectó que en 21 cepas de *H. pylori* cultivadas, 19 (90.5%) fueron *cagA* positivas y 2 (9.5%) *cagA* negativas. La PCR-*vacA* para la genotipificación del gen *vacA* mostró que 17 (80.9%) fueron *vacAs1* y 4 (19.1%) *vacAs2*, 17 (80.9%) *vacAm1* y 4 (19.1%) *vacAm2*. Los resultados de las combinaciones de las regiones *vacA* s y m indican que 17 (80.9%) de las cepas de *H. pylori* fueron *vacAs1m1* y 4 (19.1%) *vacAs2m2*. En conclusión, el 81% de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con EUP en Risaralda fueron *cagA* positivas/*vacAs1m1* que son consideradas cepas más virulentas y pueden ser catalogadas como cepas *H. pylori* tipo I las cuales están asociadas a un mayor riesgo para desarrollar EUP severa. La detección del gen *cagA* y su asociación con un subtipo específico del gen *vacA* pueden ser entonces utilizadas para establecer la virulencia de una cepa y establecer las implicaciones patogénicas que pueden tener en el huésped.

*Lic. Biología y Química, MSc en Microbiología, Profesor de Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira.

Correspondencia: Dr. Moncayo, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira. Telefax: 0963-215393. E-mail: jimo@pereira.multi.net.co

Palabras clave:

Helicobacter pylori, gen *ureC*, gen *cagA*, gen *vacA*, PCR.

INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa espiralada que coloniza el estómago humano y lo infecta. En la actualidad más de la mitad de la población mundial está infectada con *H. Pylori*; sin embargo, la mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos y solamente el 10 al 20% desarrollan enfermedad.^{1,2}

Se reconocen cuatro enfermedades como causadas por *H. pylori*: úlcera duodenal (UD), úlcera gástrica (UG), adenocarcinoma de la parte distal del estómago (antro y fundus) y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT).³

Anualmente, se diagnostican más de 500.000 casos de enfermedad úlcero-péptica (EUP) en USA y alrededor de 4 millones de personas tienen enfermedad ulcerosa recurrente.² La infección con *H. pylori* incrementa el riesgo EUP entre 5 a 7 veces.¹

Aunque la mayoría de las personas infectadas con *H. pylori* permanecen asintomáticas a pesar de la presencia de gastritis, durante el curso de la infección pueden ocurrir serias complicaciones como el desarrollo de enfermedad úlcero-péptica o carcinoma en una minoría de personas. La hipótesis que podría explicar este comportamiento está basada en la existencia de diferentes cepas de *H. pylori* que varían en su virulencia.⁴⁻⁷

Existen muchos factores de virulencia en *H. pylori* que se han involucrado en la patogénesis de la enfermedad gastroduodenal. Entre los más importantes están los productos de los genes *vacA* (*vacuolating toxin A*), *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) e *iceA* (*induced by contact with epithelium*).^{4,8,9}

El gen *cagA* está presente en aproximadamente el 50-60% de las cepas de *H. pylori* y codifica para una proteína de 128 KDa. La presencia de *cagA* está asociada con EUP, atrofia de la mucosa gástrica y cáncer gástrico aunque su función no se ha establecido.^{5,7}

Adicionalmente, el gen *CagA* hace parte de una entidad genómica grande denominada isla de patogenicidad (Pathogenicity island *cag*, PAI*cag*), estructura genética que contiene múltiples genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de las cepas de *H. Pylori*.¹⁰⁻¹³ La PAI*cag* contiene otros genes que codifican para proteínas que aumentan la interacción de la bacteria con las células del huésped, por ejemplo, por inducción de citocinas.²² El gen *cagA*, además de hacer parte de PAI*cag* puede ser considerado como un marcador de esta estructura genética y su presencia está asociada con las cepas de mayor virulencia.^{12,14,15}

Otro factor de virulencia, producido por aproximadamente el 50% de las cepas, es una citotoxina vacuolizante, *vacA*,

la cual induce vacuolización citoplasmática en los cultivos celulares y muerte de las células epiteliales.^{4,6-18}

El gen *vacA* está constituido por dos partes variables: a) la región *s* que codifica para el péptido señal, localizada en el extremo 5' del gen y de los cuales existen los alelos *s1* y *s2*. Dentro del tipo *s1* existen varios subtipos identificados, *s1a*, *s1b* y *s1c*. Las cepas *vacA s1a* parecen ser más patogénicas que las cepas *vacA s1b* o *vacA s2* y son más frecuentemente aisladas de pacientes con EUP. b) La región *m* que codifica la región media (*middle*) de la cual existen los alelos *m1* y *m2*. Las cepas *vacAm1* están asociadas con un mayor daño en el epitelio gástrico que las cepas *vacAm2*.^{16,17,20,21}

La combinación de las regiones *s* y *m* determina la producción de la citotoxina y está asociada con la patogenicidad de la bacteria. Las cepas *vacA s1m1* producen elevadas cantidades de citotoxina, las cepas *vacA s1m2* la producen en forma moderada y las cepas *vacA s2m2* no la producen o lo hacen a muy baja concentración.^{18,19}

Las cepas de *H. pylori* pueden ser agrupadas en dos grandes grupos, con base en la presencia de la citotoxina vacuolizante y del antígeno *cagA*, denominadas cepas tipo I (*cagA* positivas y que expresan el gen de la citotoxina) y cepas tipo II (*cagA* negativas y que pueden o no expresar el de la citotoxina).¹⁰

La presencia de los genes *cagA* y *vacA* en una misma cepa ha permitido establecer que las cepas productoras de citotoxina/*cagA* positivas inducen la producción de altos niveles de IL-8 en las células epiteliales y una mayor infiltración antral con polimorfonucleares neutrófilos que las cepas citotoxina/*cagA* negativas. Las contribuciones específicas de *vacA*, *cagA* y otros determinantes bacterianos a los síndromes clínicos no han sido aún bien dilucidadas. Sin embargo, con base en estudios experimentales en animales, parece probable que la citotoxina vacuolizante contribuya al daño epitelial, el cual podría ser una etapa temprana en el desarrollo de la úlcera péptica. Adicionalmente a la asociación con la citotoxina, *cagA* es un marcador muy útil para las cepas que inducen la producción de altos niveles de IL-8 en las células epiteliales y que están por lo tanto asociadas con una infiltración incrementada de la mucosa por neutrófilos.¹⁶

La importancia de la presencia del gen *cagA* y la genotipificación del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* con relación a su potencial de virulencia y su asociación con la EUP es mundialmente aceptada.^{1,8,10} La determinación del genotipo *vacA/cagA* permite establecer la virulencia de la cepa y el papel que juega en el desarrollo de la enfermedad gastroduodenal.^{8,10,15,19,28} El objetivo del presente estudio fue establecer la presencia del gen *cagA* y los subtipos *vacA* asociados con las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con EUP en Risaralda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Con base en el programa EPI-INFO versión 6.04 y considerando la población de Risaralda de acuerdo al censo de 1998, se estableció un tamaño de muestra de 73 pacientes con EUP que asistieron a la Unidad de Gastroenterología del Centro de Especialistas de Risaralda. Los especímenes de biopsia fueron cultivados en condiciones microaerofílicas aislándose 21 cepas de *H. pylori* de los 73 pacientes estudiados.

De cada paciente con úlcera duodenal o úlcera gástrica se tomaron 5 biopsias. Las biopsias obtenidas fueron distribuidas para el análisis de la siguiente forma: con una biopsia antral se practicó la prueba rápida de ureasa (CLO test). La biopsia anterior junto con una biopsia del cuerpo se utilizó para el examen histológico. Una tercera biopsia del antro con una cuarta de cuerpo se utilizó para el cultivo. La quinta biopsia de la región antral se sometió a la técnica de PCR.

Cultivo de *Helicobacter pylori*

Los especímenes de biopsias fueron cultivados en agar BHI suplementado con suero de caballo, Isovitalex (BRL),

tres antibióticos (trimetoprim, vancomicina y anfotericina) o agar tripticasa soya con sangre de oveja suplementado con antibióticos. Los cultivos fueron incubados en ambiente microaerofílico (10% O₂, 5%CO₂ y 85%N₂), durante 5 a 7 días a 37°C. Los aislados de *H. pylori* fueron identificados por morfología con la coloración de Gram y pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y ureasa.^{5,30} De los cultivos primarios se obtuvieron subcultivos sucesivos de una sola colonia, a partir de los cuales se extrajo el ADN y se obtuvieron cepas de la bacteria para ser conservadas a -70°C.

Extracción de ADN genómico de *H. pylori*

La extracción del ADN genómico de 10 cepas de *H. pylori* se llevó a cabo por el método del isotiocianato de guanidina (GES) descrito por Pitcher et al,²³ y las 11 cepas restantes por el método de CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio).²⁴

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La tabla 1 muestra la secuencia, la posición de acople y la longitud esperada de los productos de la PCR con los iniciadores utilizados para amplificar los genes *ureC*, *cagA* y *vacA*. La concentración utilizada para cada reacción de PCR estuvo en un rango de 10 a 25 pmoles/l del iniciador.

Tabla 1. Condición de optimización para PCR.

NOMBRE DEL GEN	INICIADORES	SECUENCIA DEL NUCLEÓTIDO	LOCALIZACIÓN EN EL GEN	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR (pb)
<i>UreC</i>	93275	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'	1293-1318	294
	93276	5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	1587-1563	
<i>CagA</i>	93089	5'-AATACACCAACGCCTCCAAG-3'	2593-2612	400
	93261	5'-TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC-3'	2992-2973	
<i>CagA</i>	cagA-1F	5'-GATAACGCTGTGCGTTTCATACG-3'	1170-1191	409
	cagA-2R	5'-CTGCAAAGATTGTTTGGCAGA-3'	1578-1557	
<i>VacA</i> Región S1	VA1-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	797-1055	259
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'		
<i>VacA</i> Región S2	VA1-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	284-569	286
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'		
<i>VacA</i> Región m1	VA7-F	5'-GTAATGGTGGTTTCAACACC-3'		630
	VA7-R	5'-TAATGAGATCTTGAGCGCT-3'		
<i>VacA</i> Región m2	VA4-F	5'-GGAGCCCAGGAAACATTG-3'	976-1327	352
	VA4-R	5'-CATAACTAGCGCCTTGAC-3'		

La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl de reacción. La mezcla de reacción contenía: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01% de gelatina, los deoxinucleótidos trifosfatos a una concentración de 200 µM de cada uno, 1.5 U de Ampli-Taq Gold DNA polimerasa (Perkin-Elmer) e iniciadores a una concentración entre 10 a 25 pmoles/l de cada uno. Se utilizó 1 µl de ADN genómico de *H. pylori* por mezcla de reacción.

Se realizaron las siguientes PCR:

1. **PCR-ureC:** El gen *ureC* es un gen estructural exclusivo de *H. pylori* y la amplificación permitió establecer que las cepas aisladas eran efectivamente *H. pylori*. Como controles positivos se utilizaron las cepas NTCC1637 y NTCC12908 y como controles negativos, cepas de enterobacterias ureasa positiva como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*.

Los iniciadores *ureC* 93275 y *ureC* 93276 reportados por Labigne²⁵ fueron utilizados para amplificar un segmento de 294 pb del gen estructural de la ureasa. El programa utilizado para la PCR-ureC fue el siguiente: desnaturalización 94°C por 1 minuto, acoplamiento a 60°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto durante 35 ciclos.

2. **PCR-cagA:** para la amplificación del gen *cagA* se utilizaron dos parejas de iniciadores. La primera de ellas fue reportada por Tummuru et al⁷ y amplificó un segmento de 400 pb (*cagA* 93089 y *cagA* 93261). La segunda pareja de *cagAF*-AN2455 y *cagAR*-SN2456 donados por el Dr. Blaser (acceso a Gene Bank L11714), amplificó 409 pb. El programa utilizado para la PCR-*cagA* fue el siguiente: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, acoplamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto durante 35 ciclos. Como control positivo se utilizó la cepa de *H. pylori* NTCC1637 (*cagA* positiva) y como control negativo la cepa de *H. pylori* NTCC12908 (*cagA* negativa).

3. **PCR-vacA:** para la tipificación de los alelos de la región s y de la región m del gen *vacA*, se utilizaron iniciadores descritos previamente por diferentes autores^{7,26-28} y donados gentilmente por los doctores Douglas Berg, Department of Molecular Microbiology and Genetics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, y Martin Blaser, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.

El programa utilizado para amplificar la región s1 y s2 fue el siguiente: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, acoplamiento a 52°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto en 35 ciclos. El control positivo para la región s1 fue la cepa 60-190 y para la región s2 la cepa 88-22.

El programa para la región m se hizo con una desnaturalización inicial a 95°C por 90 segundos seguida de 36 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, acoplamiento a 56°C por 60 segundos y una extensión a 72°C por 90 segundos, y una extensión final a 72°C por 300 segundos. Como control positivo para la región m1 se utilizó la cepa 60-190 y para la región m2, la cepa 88-22.

Detección de los productos amplificados de ADN

Cantidades de 2 a 10 µl de cada mezcla de la reacción obtenida por PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1.5 – 2%) y se tiñeron con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos de las muestras amplificadas fueron establecidos de acuerdo con el patrón de bandas de los marcadores moleculares de 123 pb DNA Ladder y 1Kb DNA ladder (Promega).

RESULTADOS

De las 21 cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con enfermedad úlcero-péptica (EUP), 15 (71.4%) fueron aisladas de pacientes con úlcera duodenal (UD) y 6 (28.4%) de pacientes con úlcera gástrica (UG).

La PCR para el gen *ureC* (PCR-*ureC*) amplificó un patrón electroforético de 294 pb conforme a lo esperado para los iniciadores *ureC* 93275 y *ureC* 93276 reportados por Labigne y colaboradores (Figura 1).²⁵

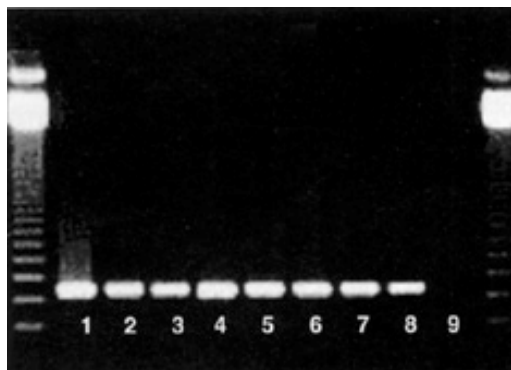


Figura 1. PCR-*ureC* de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con EUP. Líneas 1-7 muestran cepas *ureC* + (294 pb); línea 8 control positivo y línea 9 control negativo. M: Marcador molecular 123 pb DNA Ladder.

En la tabla 2 se muestra que la PCR-*ureC* amplificó el 100% de las cepas aisladas y el microorganismo fue observado en los cortes histológicos de las 21 biopsias de los pacientes demostrando que la bacteria cultivada correspondía a *H. pylori*. Adicionalmente, se pudo establecer que la prueba rápida de ureasa (CLO test) detectó la presencia de la bacteria en la correspondiente biopsia en solo 16 (76.2%) pacientes que fueron positivos en el cultivo para *H. pylori*.

Tabla 2. Comparación de los métodos de PCR-ureC, examen histológico y prueba rápida de la ureasa en las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con enfermedad úlcero-péptica.

Resultado/método	PCR-ureC	Examen Histológico	Prueba de ureasa
Positivo	21	21	16
Negativo	0	0	6

Detección del gen *cagA*

Las PCR-*cagA* amplificaron los fragmentos esperados de 400 pb y 409 pb para las parejas de iniciadores, *cagA* 93089-*cagA* 93261 y *cagA*AF-AN2455-*cagA*R-SN2456, respectivamente (Figura 2).

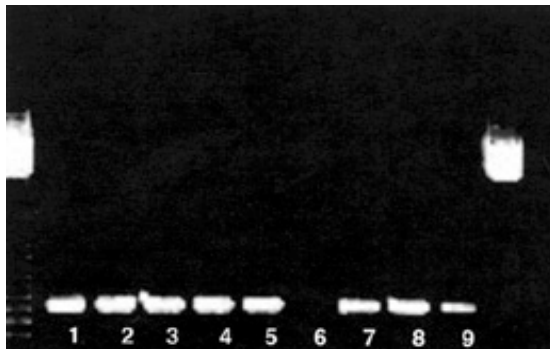


Figura 2. PCR-*cagA* de *H. pylori* aislado de pacientes con EUP. Líneas 1-5, 7 y 8 muestran *cagA* (+) (400pb), línea 6 *cagA* (-), línea 9 control positivo. M: Marcador molecular 123pb DNA Ladder.

De las 21 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con EUP, 19 (90.5%) fueron *cagA* positivas y 2 (9.5%) fueron *cagA* negativas. Las dos cepas *cagA* negativas fueron sometidas a análisis adicionales con otras parejas de iniciadores diferentes a los descritos en la metodología. Ninguna de las PCRs adicionales realizadas amplificó el gen *cagA*, ratificando el carácter negativo de las dos cepas analizadas.

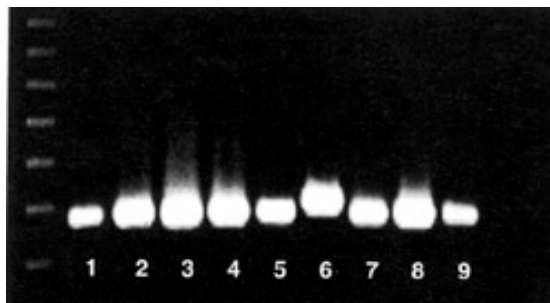


Figura 3. pcr-*vacA* region s: Líneas 1-5 y 7 muestran *vacA* s1 (259 pb), línea 6 muestra *vacA* s2 (286 pb). Línea 8 control *vacA* s1+ y línea 9 control (-). M: Marcador molecular 123pb DNA ladder

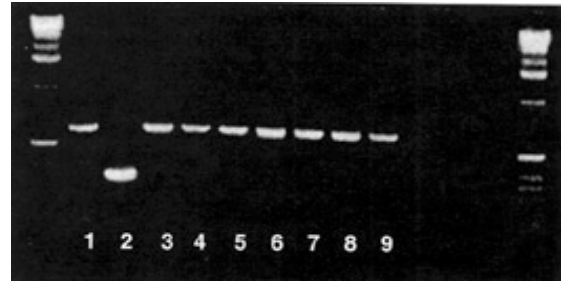


Figura 4. PCR-*vacA* región m: Líneas 1,3-9 muestran *vacA* m1 (630 pb), línea 2 muestra *vacA* m2 (352 pb). Líneas 10-12 negativas. M: Marcador molecular 1kb DNA ladder.

Genotipificación del gen *vacA*

La figura 3 muestra los productos de amplificación de la PCR-*vacA* para la región s (289 pb para s1 y 286 pb para s2) y la figura 4 muestra la PCR-*vacA* de la región m (630 pb para m1 y 352 pb para m2).

Una completa genotipificación del gen *vacA* fue obtenida en las 21 cepas de *H. pylori* y la distribución del gen *vacA* de acuerdo con el tipo de úlcera se describe en la tabla 3.

La genotipificación de la región *vacA* mostró que de las 21 cepas de *H. pylori*, 17 (80.9%) fueron positivas para el subtipo *vacA* s1 y 4 (19.1%) para el subtipo *vacA* s2.

La subtipificación de la región *vacA* m mostró que 17 (80.9%) de las cepas de *H. pylori* fueron positivas para el subtipo *vacA*m1 y 4 (19.1%) para el subtipo *vacA*m2.

Los resultados de las combinaciones de las regiones *vacA* s y m, indicaron que 17 (80.9%) de las cepas de *H. pylori* fueron del genotipo *vacA*s1m1 y 4 (19.1%) fueron genotipo *vacA*s2m2. Las otras combinaciones no fueron detectadas.

Tabla 3. Distribución del gen *vacA* en las cepas de *H. pylori* según el tipo de úlcera

Tipo úlcera/Subtipo <i>vacA</i>	S1m1	S2m2
UD	12 (57.1%)	3 (14.3%)
UG	5 (23.8%)	1 (4.8%)
Total	17 (80.9%)	4 (19.1%)

Asociación del gen *cagA* y *vacA*

La asociación del gen *cagA* con los subtipos del gen *vacA* es mostrada en la tabla 4. Las dos cepas *cagA* negativas se asociaron al subtipo *vacA*s2m2.

Según la presencia o ausencia del gen *cagA* asociado con el gen *vacA*, los aislados clínicos de *H. pylori* pueden ser divididos en dos categorías, cepas Tipo I y Tipo II (10). Las cepas tipo I son definidas por la presencia del gen

Tabla 4. Asociación del gen *cagA* con subtipos del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad úlcero-péptica.

Subtipo <i>vacA</i> /gen <i>cagA</i>	<i>CagA</i> positivo	<i>CagA</i> negativo
S1m1	17 (81.0%)	0 (0.0%)
S2m2	2 (9.5%)	2 (9.5%)

cagA y la producción de citotoxina vacuolizante. De acuerdo con esta definición 19(90.5%) de las cepas de *H. pylori* analizadas corresponden a la categoría Tipo I.

Las cepas Tipo II no poseen el gen que codifica *cagA* (no producen la proteína *cagA*) y la citotoxina vacuolizante no se produce o lo hace en baja concentración. A esta categoría corresponden 2 (9.5%) de las cepas de *H. pylori* estudiadas.

DISCUSIÓN

De los 73 pacientes con EUP que asistieron a la Unidad de Gastroenterología del Centro de Especialistas de Risaralda se cultivaron 21 cepas de *H. pylori* y las cepas cultivadas fueron estudiadas para detectar el gen *cagA* y genotipificar el gen *vacA*.

Existe una gran cantidad de evidencia que afirma que la diversidad genética de *H. pylori* puede tener una relevancia clínica en el desarrollo de la EUP.^{1,9,22} Los grupos de investigación en *H. pylori* han estudiado diferentes genes como factores de virulencia; así los genes *cagA*, *vacA* y *iceA* han sido asociados con la patogenicidad bacteriana.^{8,9,19,22,29} Con base en lo anterior, la detección del gen *cagA* y la genotipificación del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas en pacientes de Risaralda pueden ser utilizadas como marcadores de virulencia y la presencia de uno u otro genotipo tendrá implicaciones importantes en el desarrollo de la infección.

La importancia de la detección del gen *cagA* radica en la demostración de que los pacientes infectados por cepas de *H. pylori* *cagA* positivas usualmente tienen una inflamación más severa y mayor daño tisular, que los pacientes infectados con cepas *cagA* negativas.^{18,19} Los pacientes objeto del estudio fueron infectados por cepas virulentas en un 90.5%. Al comparar estos hallazgos con estudios en poblaciones de Europa y Estados Unidos donde la prevalencia de *H. pylori* *cagA* positivos varió entre 69 y 79%, mientras que en la población asiática la prevalencia varió entre 97% y 99% en pacientes con EUP, los resultados obtenidos en el presente estudio están en un punto intermedio con respecto a las poblaciones mencionadas. Para clarificar esta tendencia se necesitará realizar estudios más amplios en la población colombiana.

Desde el punto de vista de la importancia del gen *vacA*, existen reportes que han confirmado la relación entre la infección con cepas de *H. pylori* productoras de citotoxina

y la EUP, más aún con subtipos específicos del gen *vacA*.^{4,18} Bajo este parámetro, se acepta que las cepas de *H. pylori* con genotipo *vacAs1* producen mayor concentración de citotoxina vacuolizante que las cepas *vacAs2*.^{1,18,19} El subtipo *vacAs1* fue el genotipo predominante en los pacientes estudiados y teniendo en cuenta lo reportado por otros investigadores para las cepas *vacAs1*, encontramos que el 80.9% de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con EUP fueron cepas más virulentas.

Adicionalmente, el análisis de la presencia de los subtipos de *H. pylori* en la región m del gen *vacA* ha sugerido que las cepas *vacAm1* están asociadas con un mayor daño en el epitelio gástrico que las cepas *vacAm2*.^{16,18,19,22} Teniendo en cuenta que el 80.9% de las cepas estudiadas fueron tipificadas como *vacAm1*, éstas pueden ser consideradas más patogénicas.

Después de hacer un análisis individual de cada subtipo detectado para *vacA* se puede ahora hacer un análisis de la combinación de las regiones s y m del gen *vacA*. Esta combinación determina probablemente la producción de la citotoxina y el daño del epitelio gástrico. Existe consenso en que las cepas *VacAs1m1* producen elevadas cantidades de citotoxina,^{8,9,19,22,29} y con base en lo anterior, el 80.9% de los pacientes estudiados estaban infectados por cepas del genotipo más virulento, *vacAs1m1*. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros investigadores^{8,9,19} y con los resultados obtenidos por Yamaoka con cepas de *H. pylori* de diferentes países, incluyendo cepas de origen colombiano que fueron genotipificadas como *vacAs1a m1*.

En conclusión, el 81% de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con EUP en Risaralda fueron *cagA* positivas/*vacAs1m1* consideradas como más virulentas y que pueden ser categorizadas como cepas *H. pylori* tipo I, asociadas a un mayor riesgo para desarrollar EUP severa.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos los más sinceros agradecimientos a COLCIENCIAS y a la Universidad Tecnológica de Pereira, por su generosa colaboración en el financiamiento y apoyo durante el desarrollo de la investigación. Adicionalmente, queremos expresar nuestros agradecimientos a los gastroenterólogos Drs Fabio Salazar y Emiro Meisel, y a los patólogos Drs Beatriz Franco y Manuel A. López. Finalmente, a nuestras familias por su comprensión, paciencia y apoyo en todo el proceso investigativo.

SUMMARY

It was established the presence of gene *cagA* and its relation with gene *vacA*'s specific subtypes, in 21 strains of *H. pylori* cultivated from 73 patients with peptic ulcer disease who assisted to the Centro de Especialistas de Risaralda Gastroenterology Unit. From using the genomic DNA extracted from *H. pylori* strains there were done three PCR: PCR-*cagA*, PCR-*ureC*, and PCR-*vacA*. The PCR-*cagA* detected that in 21 cultivated strains, 19 (90.5%) were *cagA* positive and 2 (9.5%) *cagA* negative. The PCR-*vacA* showed that 17 (80.9%) were *vacAs1* and 4 *vacAs2* (19.1%), 17 (80.9%) were *vacAm1*, and 4 *vacAm2* (19.1%). The results of the combination of *vacA* S and M regions show that 17 (80.9%) of *H.*

pylori strains were vacAS1M1 and 4 (19.1%) vacAS2M2. In conclusion, the 81% of the isolated *H. pylori* strains from patient with peptic ulcer disease in Risaralda were *cagA* positive/vacAS1M which are considered more virulent strains and could be classified type I, which are related to a major risk to develop severe peptic ulcer disease. The gene *cagA* detection and its relationship with an specific gene *vacA*'s subtype could be used to establish the virulence of a strain and the pathogenic implications that it could have in the host.

Key words: *Helicobacter pylori*, *ureC* gene, *cagA* gene, *vacA* gene, PCR.

REFERENCIAS

- Graham, et al. Scope and consequences of peptic ulcer disease. ¿How important is asymptomatic *Helicobacter pylori* infection?. *Postgraduate Medicine* 1999; 105(3):100-10.
- Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; 4(3):185-97.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284(5418):1328.
- Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, et al: Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcer and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989; 27:225-26.
- Grubtree JE, Taylor JD, Wyatt JL, et al: Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338:332-35.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:5791-95.
- Tummuru MK, 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; 61:1799-1809.
- Yamahoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: Studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7):2274-79.
- Rudi J, 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(4):944-48.
- Censini S, et al. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14648-53.
- Saunders N, et al. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* 1988; 27(6):1091-98
- Akopyants N, Kirsulyte D, Crabtree J, et al. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; 28(1):37-53.
- Maeda S, et al. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999; 44: 336-41
- Salama S, et. al. Characterization of cromosomal DNA profiles from *Helicobacter pylori* strains isolated from sequential gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2496-97.
- Dunn BE. *Helicobacter pylori* infection: pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin North Am* 1993; 22(1):43-57.
- Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267:10570.
- Cover TL, Tummuru MK, Cao P, et al. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269:10566-73.
- Atherton JC, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995; 270(30):17771-77.
- Van Doorn L, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *icaA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1998; 115(1):58-66.
- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179:1653-58.
- Rautelein H, Blomberg B, Jannerot G, et al: Nonopsonic activation of neutrophils and cytotoxin production by *Helicobacter pylori*: Ulcerogenic markers. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:128-32.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Distinct variants of *Helicobacter pylori* *cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2306-11.
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*. 1989; 8:151-56.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Preparation and analysis of DNA: Preparation of genomic DNA from bacteria. New York: Published by Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1988: 241-45.
- Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 1991; 173:1920-31.
- Mobley H, Island M, Hausinger R, et al. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995; 59:451-80.
- Figura N. *Helicobacter pylori* factors involved in the development of gastroduodenal mucosal damage and ulceration. *J Clin Gastroenterol*, 1997; 25(Suppl 1):S149-63.
- Figura N. Identifiable *Helicobacter pylori* strains or factors important in the development of duodenal ulcer disease. *Helicobacter* 1997; 2(Suppl.1):S3-12.
- Van Doorn L, Figueiredo C, Rossau R, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 36(5):1271-76.
- Moran AP. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1996; Suppl 215:22-31.