

Institución que auspicia el trabajo:

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. FACULTAD DE CIENCIAS

Título:

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori* EN BASE A LOS GENES *ADNr 16S* Y EL GEN ASOCIADO A CITOTOXINA (*cagA*) Y POSIBLE ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍAS GASTROINTESTINALES.

Autores:

Molina Delgado Angie Patricia<sup>1</sup>, Jaramillo Henao Carlos Alberto<sup>2</sup>, Delgado Perafán Mari a del Pilar<sup>3</sup>, Bohórquez Lozano Mabel Elena<sup>4</sup>, Ámezquita Torres Adolfo<sup>5</sup>.

Grado Científico:

<sup>1</sup> Microbióloga, Asistente Graduada, Aspirante a Master en Ciencias Biológicas, angi-mol@uniandes.edu.co.

Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia.

<sup>2</sup> Microbiólogo MSc, Profesor Titular, cjaramil@uniandes.edu.co. Laboratorio de Diagnóstico Molecular y

Bioinformática, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia.

<sup>3</sup> Bacterióloga MSc, Profesor Asociado, mdelgado@uniandes.edu.co. Laboratorio de Diagnóstico Molecular y

Bioinformática, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia.

<sup>4</sup> Médico Patólogo, Profesor Asociado, meboloza@gmail.com. Citogenética, Filogenia y Evolución de Poblaciones.

Universidad del Tolima Ibagué. Colombia

<sup>5</sup> PhD Biología, Profesor Asociado, aamezqui@uniandes.edu.co. Grupo de Ecofisiología del Comportamiento y

Herpetología, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia

Dirección:

Universidad de los Andes

Carrera 1ª N° 18A-10.

Departamento de Ciencias Biológicas. Bloque J (Laboratorio J203).

PBX +57(1) 339 4949 Ext. 3761-2773

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es un microorganismo colonizador de la mucosa gástrica, reconocido como agente etiológico de patologías gástricas severas. No se conoce con exactitud la prevalencia en Colombia, por lo que este estudio busca brindar información acerca de la frecuencia de la infección, además de tipificar las cepas mediante la amplificación del gen asociado a citotoxina *cagA* en pacientes residentes en el Tolima. Para cumplir este objetivo, se incluyeron 60 pacientes de los cuales el 62% resultó positivo para la detección molecular del microorganismo, coherente con los datos reportados para la población; y de estas cepas, el 43% se genotipificaron como *cagA+*.

La PCR como técnica diagnóstica fue evaluada teniendo en cuenta factores como la sensibilidad, especificidad y la concordancia de los resultados, al comparar con los obtenidos para la histología, prueba de oro para el diagnóstico. Finalmente, los resultados presentados permiten ilustrar una posible correlación entre la presencia del gen *cagA* y el desarrollo de gastritis atrófica en la población estudiada.

**PALABRAS CLAVE:** *Helicobacter pylori*, Factores de Virulencia, *cagA*, *ADNr 16S*, Detección, Tipificación, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Patologías Gastrointestinales.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a microorganism that colonizes the gastric mucosa and it is recognized as the etiologic agent of severe gastric diseases. It's prevalence in Colombia is not well known, and that is why this study tried to bring information about the frequency of infection, and also typing the strains through amplification of the cytotoxin-associated gene *cagA* in patients living in Tolima province. To attain it, 60 patients were included, 62% resulted positive for the molecular detection of the microorganism, similar to previous reports for that population; and 43% of these strains were genotyped as *cagA+*.

The PCR as a diagnostic tool was evaluated through the sensibility, specificity and the concordance of the results, when compared with those obtained for the histology, known as the gold standard for the diagnostic.

The results presented allowed the observation of a possibly correlation between the presence of the gene *cagA* and the development of atrophic gastritis.

**KEY WORDS:** *Helicobacter pylori*, Virulence Factors, *cagA*, *ADNr 16S*, Detection, Typification, Polymerase Chain Reaction, Gastrointestinal Outcomes.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un microorganismo microaerófilo que coloniza e infecta la mucosa gástrica humana. La infección está distribuida mundialmente y su prevalencia varía según la región geográfica y de acuerdo al nivel socioeconómico de la población.<sup>1</sup> En Colombia aunque no se han establecido datos certeros sobre la infección con este patógeno, se ha descrito que causa más del 90% de las úlceras duodenales y más del 80% de las gástricas dentro de la población trabajadora.<sup>2</sup>

Se ha postulado que algunos genes de *H. pylori*, expresados diferencialmente entre cepas, pueden ser usados como marcadores de virulencia y su presencia se ha asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar patologías gastroduodenales severas como gastritis crónica, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT.<sup>3</sup> Uno de éstos es el gen asociado a citotoxina cagA, marcador de la isla de patogenicidad cag, cuya presencia se ha visto asociada a un aumento en el riesgo de desarrollar úlcera péptica, gastritis atrófica y carcinoma debido a que la proteína, interrumpe algunas de las vías de transducción de señales presentes en las células epiteliales e induce la secreción de citoquinas proinflamatorias que van a facilitar la colonización y transmisión persistente del microorganismo.<sup>4</sup>

Teniendo en cuenta que la infección por *H. pylori* es muy frecuente en la población colombiana y que la presencia de ciertos genotipos podría estar asociada con la generación y desarrollo de patologías gastroduodenales; el diagnóstico y genotipificación del microorganismo, se establecieron como la base para la realización de este estudio. De igual forma se buscó determinar si existen posibles asociaciones entre la presencia del gen de virulencia *cagA* y una o más de las patologías descritas en la población colombiana analizada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Pacientes:** La población de estudio estuvo constituida por 60 pacientes a quienes se les había indicado la realización de una endoscopia como parte del estudio de un cuadro de dispepsia. Cumpliendo con los requerimientos éticos, la inclusión de pacientes en el estudio se dio tras la consecución del consentimiento informado escrito. Fueron tomadas dos muestras de biopsia gástrica, una de la región antral y otra de una porción del estómago a criterio del médico.

**Análisis histológico:** Éste incluyó coloración de Giemsa para la visualización de bacilos tipo *H. pylori* en el moco foveolar y el diagnóstico patológico de las lesiones de la mucosa gástrica, siguiendo los parámetros de la clasificación Sydney modificada.<sup>5</sup>

**Extracción de ADN:** Se realizó la extracción de ADN a partir de un fragmento de tejido del antro gástrico, usando el kit Aqua Pure Genomic DNA® de Bio-Rad, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Análisis molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Detección del microorganismo: La detección de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen ADNr 16S, utilizando los iniciadores ACT-1 y ACT-2 (Tabla 1) y siguiendo el protocolo descrito previamente.<sup>6</sup>

Cada reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl pH 8.4, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador, 1.25 U de Taq polimerasa (Invitrogen™) y 135 ng de ADN. El programa de la PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 38 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 1 min; finalmente una elongación a 72°C por 10 min. Para las muestras que resultaron negativas para la detección del microorganismo, se realizó un control de la reacción, amplificando el gen de la  $\beta$ -globina humana.<sup>7</sup>

Genotipificación de *H. pylori*: La región 5' del gen *cagA*, fue el blanco de amplificación para la tipificación del microorganismo. La reacción se efectuó en un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl pH 8.4, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador (*cagAR-cagAF*) (Tabla 1), 0.625 U de Taq Polimerasa (Invitrogen™) y 72 ng de ADN extraído. El programa de la PCR utilizado fue desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 45 s y 72°C por 45 s, seguido de una elongación a 72°C por 5 min.<sup>8</sup>

Visualización y análisis de los productos de amplificación: Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y 2% (para el gen ADNr 16S; y *cagA* y  $\beta$ -globina humana, respectivamente), a 100 voltios durante 60 minutos. La detección y visualización de los fragmentos de ADN se realizó con bromuro de etidio (0.4 %) bajo luz UV, en un sistema de documentación de geles ChemiDoc System XRS® de Bio-Rad.

Análisis estadísticos: El análisis incluyó el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. La concordancia entre las pruebas diagnósticas fue determinada a través del cálculo del índice Kappa de Cohen. Los resultados fueron procesados con el paquete estadístico SPSS 14.0™ para Windows. Se realizó un análisis de regresión multinomial para evidenciar la posible correlación entre la presencia del gen *cagA* y el desarrollo de patología gástrica. Se consideraron significativos valores de p menores a 0.05.

## RESULTADOS

La población de estudio estuvo conformada por 60 pacientes que a criterio del médico fueron sometidos a una endoscopia de vías digestivas altas, al presentar un cuadro de dispepsia. Estos fueron categorizados en 4 grupos de

acuerdo a los resultados del examen histopatológico aplicado<sup>5</sup>: Gastritis no atrófica (75%), gastritis atrófica multifocal (7%), metaplasia intestinal y displasia (7%) y carcinoma (2%) (Tabla 2).

De las muestras analizadas, 37 (62%) resultaron positivas para la amplificación del gen especie-específico ADNr 16S (Tabla 2). Se calculó la sensibilidad (71%), especificidad (58%), valor predictivo positivo (78%) y valor predictivo negativo (48%) de la PCR, con el fin de comparar esta técnica de detección contra la prueba de oro (análisis histológico). De igual forma, se calculó el índice Kappa de Cohen obteniendo un resultado de 0.271 y un error estándar (SE) de 0.127.

En cuanto a la tipificación, 16 de las 37 muestras analizadas (43%), fueron positivas para el gen *cagA* (Figura 1 y Tabla 2). Sin embargo, al analizar las muestras negativas para la amplificación del gen ADNr 16S (12 pacientes) se encontró que dos de estas resultaron positivas para *cagA* (pacientes 6 y 43), las cuales reportan presencia de bacilos tipo *H. pylori* mediante el análisis histológico.

Teniendo en cuenta el cuadro clínico de los pacientes y el genotipo del microorganismo en base al gen asociado a citotoxina *cagA*, se procedió a realizar una regresión multinomial, con el fin de determinar una posible asociación entre la presencia de cepas de *H. pylori cagA+* y alguna de las patologías incluidas, obteniendo que la presencia del gen *cagA* podría estar asociada con el desarrollo de gastritis atrófica multifocal (estadístico de Wald = 2.77, g.l. = 1, p = 0.096, n = 53 pacientes), relación que está soportada gráficamente (Figura 2).

## DISCUSIÓN

Debido a que se ha reportado una prevalencia de *H. pylori* del 69% en la población colombiana,<sup>9</sup> la identificación de marcadores de virulencia de la bacteria que permitan la identificación de pacientes con una probabilidad de desarrollar patologías gástricas severas, toma importancia. Este estudio se centró en la detección y genotipificación de *H. pylori*, a partir de la extracción de ADN de tejido gástrico obtenido de pacientes que fueron remitidos a la unidad de endoscopia debido al cuadro clínico que presentaban, teniendo como blanco de amplificación los genes ADNr 16S y *cagA*.

La amplificación del gen especie-específico ADNr 16S reveló, que el 62% de los pacientes presentan el microorganismo, resultado que es congruente con lo reportado para Ibagué (60%), ciudad que está incluida dentro de la población en estudio.<sup>9</sup>

Al comparar la detección molecular con la histológica (Tablas 2 y 3) se observan discrepancias en cuanto a que, en 12 de los pacientes se evidencia el bacilo tipo *H. pylori* en la zona gástrica analizada usando la tinción histoquímica,

mientras que la amplificación arrojó un resultado negativo. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que las muestras extraídas para los análisis histológico y molecular no necesariamente provenían de la misma región del estómago, ya que para el primero, la región era escogida a criterio del médico y de acuerdo a la localización de la afección, y para la detección molecular, del antro, que es la zona colonizada de forma preferencial por el microorganismo, debido a la ausencia de células secretoras de ácido.<sup>10</sup>

El análisis histológico, incluyó tinción histoquímica con colorante Giemsa, el cual indica la presencia de bacilos, sin ser esta tinción realmente específica para *H. pylori*. Se ha reportado la presencia de dos especies de *Helicobacter* en la cavidad gástrica humana: *H. pylori* y *H. heilmannii*, las cuales presentan características similares bajo tinción de Gram (espirilos Gram negativos), lo cual complica su distinción en el análisis microscópico. Al igual que *H. pylori*, *H. heilmannii* se ha asociado con la generación de gastritis en humanos; sin embargo, su frecuencia de infección es mucho menor que la de *H. pylori*.<sup>11, 12</sup>

Diversos autores consideran la histología como prueba de oro para la detección de *H. pylori* en la mucosa gástrica<sup>13</sup>,<sup>14</sup> debido a que presenta valores de sensibilidad y especificidad altos en comparación a otras técnicas de diagnóstico (88-95% y 90-95%, respectivamente).<sup>15</sup> La PCR como técnica alternativa para la detección del microorganismo fue evaluada, a través de la medición de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Al comparar los resultados de sensibilidad y especificidad de ambas técnicas (71% y 58% para PCR, y 88% y 90% para histología, respectivamente) se observa, que la capacidad de la PCR para identificar a los individuos que no presentan el microorganismo, es baja. Esto se comprueba al calcular el VPN, el cual al ser bajo (48%) indica que la probabilidad de que un resultado negativo por PCR indique la ausencia del patógeno no es confiable.

Por otro lado, se analizó la concordancia de las técnicas diagnósticas a través del cálculo del Índice Kappa de Cohen el cual arrojó un valor de 0.271 con un error estándar de 0.127, que indica una concordancia aceptable y significativa<sup>16</sup> y que por consiguiente valida la PCR para la detección del microorganismo.

Diversos estudios han reportado que aproximadamente cerca del 60-70% de los aislados de *H. pylori* provenientes de países de oeste son *cagA+*,<sup>17</sup> datos que son congruentes con lo reportado para aislados colombianos.<sup>8</sup> La caracterización de *H. pylori* en base al gen *cagA* realizada en este estudio (43%) mostró una frecuencia más baja a la reportada para Colombia (60-70%).

Una vez genotipificadas las muestras, se procedió a determinar si la presencia del gen blanco podía estar relacionada con el desarrollo de alguna de las patologías incluidas en el estudio<sup>5</sup> (gastritis no atrófica, gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal y displasia, o carcinoma), debido a que se ha descrito que en las poblaciones de países de oeste, personas que portan cepas *cagA*+ presentan mayor riesgo de desarrollar gastritis atrófica, adenocarcinoma gástrico y úlcera péptica (especialmente duodenal).<sup>4</sup>

Al realizar un análisis de regresión multinomial para comprobar el efecto de la presencia del factor de virulencia *cagA* sobre la presentación de diversas patologías, se evidenció que el único efecto que alcanza un nivel de significancia marginal es el de la presencia del gen sobre la frecuencia de presentación de gastritis atrófica.

Aunque la cantidad de datos incluidos no fue suficiente para que el efecto no fuera marginal, la figura 2 muestra claramente el patrón entre la relación de la presencia del gen y la frecuencia de presentación, evidenciándose que el comportamiento para Gastritis no atrófica y Metaplasia intestinal y Displasia (Patologías 1 y 3) es similar y su presentación independiente de la presencia del gen. En contraposición, al observar la segunda patología (correspondiente a Gastritis Atrófica Multifocal) se evidencia claramente que el hecho de portar cepas *cagA*+ aumenta la frecuencia de presentación de la afección (Figura 2).

Para el caso de cáncer gástrico, que es otra de las patologías asociadas con la presencia del gen, no se puede inferir nada debido al bajo número de pacientes que presentaban la afección.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

A los participantes del proyecto: Universidad del Tolima, y miembros del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

## REFERENCIAS

1. Suerbaum S and Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med. 2002; 347(15): 1175-86.
2. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Correa P, Ordoñez N. Seroprevalencia de anticuerpos anti *Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. Colomb Med. 2000; 31: 122-30.
3. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock RE, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. Infect Immun. 2000; 68(7): 4155-68.
4. Blaser MJ & Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001; 107(7): 767-73.
5. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996; 20(10): 1161-81.
6. Thoreson ACE, Borre MB, Andersen LP, Elsborg L, Holck S, Conway P, et al. Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995; 10: 325-34.
7. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230(4732): 1350-4.
8. Quiroga AJ, Citty DM y Bravo MM. Frecuencia de los genotipos babA2, oipA y cagE de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. Biomedica. 2005; 25: 325-34.
9. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colomb Med. 2003; 34: 124-31.
10. Lundin A, Bjorkholm B, Kupersmidt I, Unemo M, Nilsson P, Andersson DI, et al. Slow genetic divergence of *Helicobacter pylori* strains during long-term colonization. Infect Immun. 2005; 73(8): 4818-22.



11. Joo M, Kwak JE, Chang SH, Kim H, Chi JG, Kim K, et al. *Helicobacter heilmannii*-associated Gastritis: Clinicopathologic Findings and Comparison with *Helicobacter pylori*-associated Gastritis. J Korean Med Sci. 2007; 22: 63-9.
12. Toyokawa T, Yokota K, Mizuno M, Fujinami Y, Takenaka R, Okada H, et al. Characterization of elongated *Helicobacter pylori* isolated from a patient with gastric-mucosa associated lymphoid-tissue lymphoma. J Med Microbiol. 2004; 53: 207-12.
13. McNulty C and Wyatt J. *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol. 1999; 52: 338-44.
14. Wilcox M, Dent T, Hunter J, Gray J, Brown D, Wight D, et al. Accuracy of serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection-a comparison of eight kits. J Clin Pathol. 1996; 49(5): 373-6.
15. Logan R and Walker M. ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. BMJ. 2001; 323: 920-2.
16. Landis JR and Koch GG. An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers. Biometrics 1977; 33(2): 363-74.
17. Chang Y, Wang L, Lee M, Cheng C, Wu C and Shiau M. Genotypic Characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* from Biopsy Specimens of Patients with Gastroduodenal Diseases. Mt Sinai J Med. 2006; 73(3): 622-6.

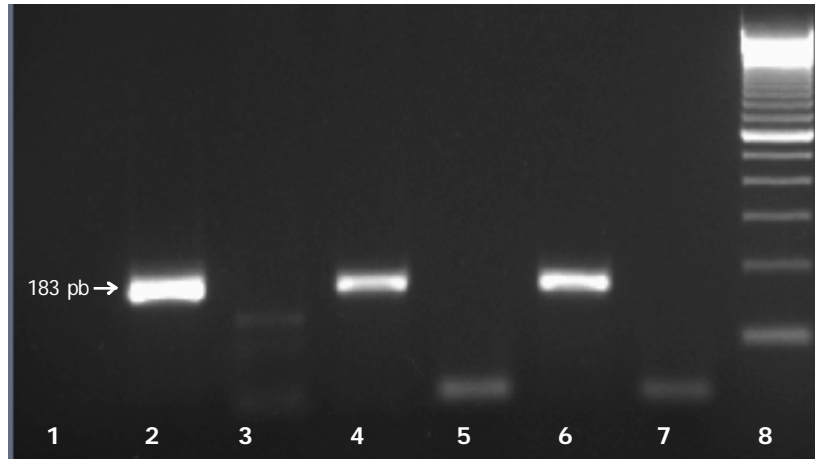


Figura 1. Amplificación del gen *cagA* de *H. pylori*. Los pozos corresponden a 1: Blanco de reacción, 2: Control positivo, 3: Paciente 2, 4: Paciente 3, 5: Paciente 4, 6: Paciente 5, 7: Paciente 52 y 8: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).

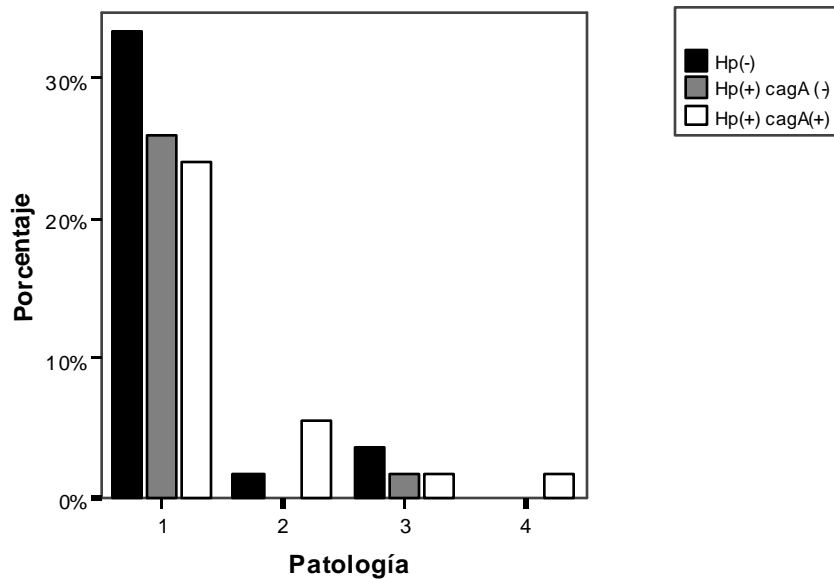


Figura 2. Efecto de la presencia del gen *cagA* en la frecuencia de presentación de las patologías incluidas en el estudio y comparación con cepas *cagA*- y *H. pylori*-. Los números en el eje X corresponden a 1: Gastritis no atrofica, 2: Gastritis atrofica multifocal, 3: Metaplasia intestinal y Displasia, 4: Carcinoma

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección y caracterización de *H. pylori*, tamaño de amplicón y concentración de agarosa utilizada para la resolución de los productos.

Gen	Primer	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb) producto	%Agarosa (p/v)	Referencia
ADNr 16S	ACT-1	CTT GCT AGA GTG CTG ATT A	537	1.5%	6
	ACT-2	TCC CAC ACT CTA GAA TAG T			
$\beta$ -globina	PCO3	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	110	2.0%	7
	PCO4	ACA CAA ACT GTG TTC ACT AGC			
cagA	cagAF	TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG	183	2.0%	8
	cagAR	CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C			

Tabla 2. Resultados reportados tras el análisis histológico y molecular de las 60 muestras de tejido gástrico humano obtenidos de pacientes residentes en el Tolima

Patología	Población n (%)	Bacilo Tipo <i>H. pylori</i> n (%)	Detección Molecular n (%)	cagA + n
Gastritis no atrófica	45 (75)	34 (75.55 )	26 (57.78)	13
Gastritis atrófica multifocal	4 (6.67)	3 (75)	3 (75)	3
Metaplasia intestinal y Displasia	4 (6.67)	4 (100)	2 (50)	1
Carcinoma	1 (1.67)	0 (0)	1 (100)	1
No patología	2 (3.33)	0 (0)	2 (100)	0
No determinado	4 (6.67)	0 (0)	3 (75)	0
Total	60 (100)	41 (68.33)	37 (61.67)	16 (43.24)*

\*Dos de las muestras positivas para la presencia del gen *cagA* fueron reportadas como negativas para la presencia del gen ADNr 16S.

Tabla 3. Concordancia de los resultados obtenidos a partir de la detección histológica (prueba de oro) y la amplificación por PCR: resultados obtenidos (a) y resultados esperados (b).

a)	Histología		
	Positiva	Negativa	Total
PCR			
Positiva	29	8	37
Negativa	12	11	23
Total	41	19	60