

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
CIUDAD UNIVERSITARIA

22

DIVERSIDAD GENETICA DE *vacA* EN CEPAS DE
Helicobacter pylori Y SU ASOCIACION CON LA
VACUOLIZACION EN CELULAS HeLa.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A

M. EN C. MARIA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA

COMITE ASESOR: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL
DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
DR. GEORGE DREYFUS CORTEZ

MEXICO, D. F.

2000

23/9/2000



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Medicina
Ciudad Universitaria**

**DIVERSIDAD GENETICA DE *vacA* EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* Y SU
ASOCIACION CON LA VACUOLIZACION EN CELULAS HeLa.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A

M en C. Maria del Rosario Morales Espinosa

**Comité Asesor: Dra. Yolanda López Vidal
Dr. Alejandro Cravioto Quintana
Dr. George Dreyfus Cortez**

**México, D:F:
2000**

INDICE

Abreviaturas.....	3
Indice de tablas.....	5
Indice de figuras.....	6
Resumen español.....	7
Resumen Ingles.....	8
1. Introducción.....	10
1.1 Etiología.....	10
1.2 Epidemiología.....	11
1.3 Patogénesis.....	13
2. Objetivos.....	33
2.1 Objetivo general.....	33
2.2 Objetivos particulares.....	33
3. Material y Métodos.....	34
3.1 Cultivo primario.....	34
3.2 Identificación del microorganismo.....	35
3.3 Recuperación de las cepas de <i>H. pylori</i> y extracción de ácidos nucleicos.....	35
3.4 Tipificación del gen <i>vacA</i> en su secuencia señal y región media.....	36
3.5 Obtención de los sobrenadante de las cepas y su valoración para actividad citotóxica en células HeLa.....	36
4. Resultados.....	38
4.1 Genotipificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> de los cultivos primarios.....	38
4.2 Actividad citotóxica vacuolizante de cepas de <i>H. pylori</i> de los cultivos primarios..	38
4.3 Actividad citotóxica vacuolizante de las colonias individuales de <i>H. pylori</i> aisladas a partir de los cultivos primarios.....	42

4.4 Genotipificación del gen <i>vacA</i> de las colonias individuales de <i>H. pylori</i> aisladas a partir de los cultivos primarios.....	42
4.5 Secuenciación de la secuencia señal y de la región media del gen <i>vacA</i> en cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes mexicanos que no fueron genotipificadas con los iniciadores específicos.....	45
4.6 Análisis de las secuencias de nucleótidos de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes mexicanos.....	50
4.7 Análisis de secuencias de nucleótidos de la región media del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes mexicanos.....	53
4.8 Caracterización de una nueva familia de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> denominada s1d.	57
5. Discusión.....	61
6. Conclusiones.....	74
7. Perspectivas.....	76
8. Bibliografía.....	77
9. Publicación.....	86

ABREVIATURAS

A	Adenina
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa V	Enzima ATPasa de tipo vacuolar
C	Citosina
<i>cagA</i>	Gen <i>cagA</i> (gen de la proteína asociada a la citotoxina)
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
Cl ⁻	Cloro
CO ₂	Bióxido de carbono
C-terminal	Región carboxilo terminal
DNA	Acido desoxirribonucléico
EGF	Factor del desarrollo epidermal
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a anticuerpo
G	Guanina
G+C	Contenido moléculas guanina y citosina en DNA
GTP	Guanosin trifosfato
H ⁺	Hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IS605	Secuencia de Inserción 605
IS606	Secuencia de Inserción 606
kb	Kilo bases
kDa	Kilo daltones
Le	Antígeno de Lewis
LPS	Lipopolisacárido
Ni ²⁺	Níquel
nm	nanómetro
N-terminal	Región amino terminal
O ₂	Oxígeno
PAI- <i>cag</i>	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Concentración de iones hidrógeno

RAPD	Polimorfismo de la amplificación del DNA al azar
SFA	Suero fetal bovino
T	Timina
TAE	Tris ácido acético EDTA
Tox-	Cepas de <i>H. pylori</i> sin actividad citotóxica
Tox+	Cepas de <i>H. pylori</i> con actividad citotóxica
UreA	Enzima ureasa (subunidad A)
UreB	Enzima ureasa (subunidad B)
μl	Microlitro
<i>vacA</i>	Gen <i>vacA</i> (gen de la citotoxina vacuolizante)
VacA	Proteína de la citotoxina vacuolizante

INDICE DE TABLAS

1. Iniciadores específicos para genotipificar por PCR las familias de la secuencia señal s1a, s1b y s2 y de la región media m1 y m2 del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	25
2. Distribución geográfica de la frecuencia de alelos de secuencia señal y región media del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i>	27
3. Distribución de genotipos identificados a partir de cultivos primarios de <i>H. pylori</i> en pacientes con enfermedad ácido-péptica.....	39
4. Genotipos de los genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> y su actividad citotóxica vacuolizante del cultivo primario de pacientes mexicanos con enfermedad ácido péptica.....	40
5. Genotipos de <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> cuyo cultivo primario presentó alta actividad citotóxica.....	43
6. Genotipos de <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> cuyo cultivo primario no presentó actividad citotóxica.....	44
7. Genotipos de <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de aislamientos de colonias individuales de <i>H. pylori</i> de pacientes con infección múltiple.....	46
8. Iniciadores conservados para la amplificación de la región media del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	47
9. Juego de iniciadores que amplifican la secuencia señal y la región media del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> derivados de las secuencias de nucleótidos de la cepa 60190.....	47

INDICE DE FIGURAS

1. Variación de fase del lipopolisacárido de <i>H. pylori</i>	15
2. Representación esquemática de PAI-cag en el cromosoma de <i>H.pylori</i>	17
3. Representación esquemática de los diferentes tipos de región 3' del gen <i>cagA</i> de <i>H.pylori</i>	19
4. Comparación de las secuencias de nucleótidos de la proteína VacA con actividad citotóxica y de la proteína sin actividad.....	21
5. Secuencia de nucleótidos de las familias (s1a, s1b y s2) de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H.pylori</i>	22
6. Esquema del gen <i>vacA</i> y de citotoxina vacuolizante de <i>H. pylori</i>	23
7. Modelo de la secreción extracelular de la citotoxina vacuolizante de <i>H. pylori</i>	28
8. Modelo tridimensional de VacA	29
9. Alineación parcial de nucleótidos de la secuencia señal de seis cepas mexicanas de <i>H. pylori</i>	49
10. Sustitución de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS1-F que caracteriza a la familia de secuencia señal s1a.....	51
11. Sustitución de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS3-F que caracteriza a la familia de secuencia señal s1b.....	52
12. Sustitución de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS2-F que caracteriza a la familia de secuencia señal s2.....	54
13. Alineación de nucleótidos de la región media tipo m1 y m2 del gen <i>vacA</i> de cepas mexicanas de <i>H. pylori</i>	55
14. Alineación de nucleótidos de la región media tipo m2 del gen <i>vacA</i> de una cepa mexicana de <i>H. pylori</i>	58
15. Genotipificación por PCR de la secuencia señal s1d del gen <i>vacA</i> de cepas mexicanas de <i>H. pylori</i>	60

RESUMEN

Helicobacter pylori es el agente etiológico de la úlcera péptica y es factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico. Un factor de virulencia importante es la producción de la citotoxina vacuolizante, responsable de la formación de vacuolas en la célula epitelial gástrica. La citotoxina vacuolizante es codificada por el gen *vacA* el cual presenta gran variabilidad, clasificando a su secuencia señal en tres familias (s1a, s1b y s2) y en dos a la región media (m1y m2). Objetivo: En este trabajo se determinó la diversidad genética del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad ácido-péptica y su asociación con la actividad citotóxica en células HeLa. Métodos: Se tipificó el gen *vacA* de 400 cepas aisladas de tres grupos de pacientes (úlceras duodenal, úlcera gástrica y gastritis) por la reacción en cadena de la polimerasa e iniciadores específicos para cada una de las familias del gen, se valoró la actividad citotóxica en ensayo de células HeLa y se realizó la secuenciación de la secuencia señal de ocho cepas y de la región media de otras cuatro. Resultados y conclusiones: El 60% de los pacientes presentaron infección múltiple con genotipos diferentes de *vacA*. El alelo s1b/m1 fue más frecuente en nuestros pacientes. El análisis de las secuencias de nucleótidos de la región secuencia señal determinó otro tipo de familia que se denominó s1d. El tipo de alelo de *vacA* no tuvo relación con la actividad citotóxica y el cuadro clínico del paciente.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is the main cause of duodenal and gastric ulceration and is an important risk factor for the development of distal gastric adenocarcinoma and gastric lymphoma. However, most people infected with *H. pylori* do not develop these conditions in their lifetimes. One factor that affect who develops disease is bacterial virulence. Two bacterial virulence determinants linked with disease are the possession of a pathogenicity island, for which the gene *cagA* (cytotoxin-associated gene A) is a marker, and production of a cytotoxin which induces vacuolation of cultured epithelial cell *in vitro*. Although all *H. pylori* strains possess the gene encoding the cytotoxin, *vacA* only about 40% of U.S. strains express HeLa cell vacuolating activity *in vitro*. Analysis of *vacA* from different U.S. strains shows that alleles differ, particularly in their midregions, and these alleles may be one of two types (m1 or m2). The alleles in their signal sequence regions also differ, and there may be one of three types (s1a, s1b or s2). All combinations of *vacA* signal sequence and midregions allele types have been described except s2/m1. In a U.S. study, the *vacA* genotype was associated with cytotoxin activity *in vitro* (s1a>s1b>s2 and m1>m2) and with peptic ulceration (s1a>s1b> or s2). Other preliminary studies have supported the finding that *vacA* s2 strains are rarely associated with ulcer but have also found that such strains are uncommon in many populations.

H. pylori virulence determinants have not previously been studied in detail in Latin Americans with *H. pylori* infections. In this study we aimed to assess the *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori* strains infecting Mexican patients. We characterized the *vacA* (vacuolating cytotoxin gene A) and *cagA* (cytotoxin-associated gene A) types of more than 400 single-colony isolates from 20 patients in Mexico City. For 17 patients *H. pylori* strains of two or more different *vacA* genotypes were isolated from gastric biopsy specimens, indicating infection

with two or more strains of *H. pylori*. The most frequent *vacA* genotype was s1b/m1. *vacA* diversity was more marked than that described previously, in that isolates from seven patients had untypeable *vacA* midregions and isolated from nine patients had type s1 signal sequence coding regions with could not be further subtyped. Previously undescribed *vacA* s2/m1 strains were found in five patients. All patients were infected with *cagA*-positive strains, but occasionally, these coexisted with small numbers of *cagA*-negative strains. We made the sequencing of untypeable *vacA* signal sequence and midregions strains and found that these strains presented several base-pairs substitutions within the binding site for each s1a, s1b or s2 specific sense primer. With the sequence analysis of the Mexican strains we detected a new signal sequence family that called s1d. In conclusion, coinfection with multiple *H. pylori* strains is common in Mexico, and *vacA* in these strains is genetically more diverse than has been described in other populations.

INTRODUCCION

1.1 Etiología.

Helicobacter pylori conocido con anterioridad como *Campylobacter pylori* o *pyloridis* fue aislado por primera vez de humanos en 1982 (98). Esta bacteria coloniza el estómago del hombre, permaneciendo en la mucosa gástrica por años o décadas. Las personas infectadas con este organismo tienen una inflamación crónica superficial difusa que involucra tanto al antro como al fondo gástrico; la asociación de *H. pylori* con diferentes patologías gástricas es altamente significativa ^{4,11,12,17,20,42,67,84}.

H. pylori es un microorganismo gram-negativo, curvo, espirilado, que mide aproximadamente 3.5 por 0.5 micrómetros, posee múltiples flagelos en uno de sus polos (de 5 a 6) lo que lo hace altamente móvil ^{11,41}. Para su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrimentos como: peptona triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales como cloruro de sodio y bisulfito de sodio ^{11,45}, suplementados con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o ambos. Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono; la producción de amonio es un mecanismo importante para la sobrevivencia de la bacteria en un ambiente con pH tan ácido, presente en el jugo gástrico ^{31,78}.

En la actualidad se reconoce a *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis atrófica crónica tipo B; se considera que tiene una participación importante en la patogénesis de la úlcera péptica ^{4,12,20,34,36,41,67,79,99} y últimamente se le ha considerado como un cancerígeno de primer orden para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma primario de estómago ^{10,12,17,20,35,42,62,99}.

1.2 Epidemiología.

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la infección por *H. pylori* está presente en la población mundial ¹⁵. Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente. Por ejemplo, en los Estados Unidos la incidencia anual de infección ocurre entre el 0.5% y el 1% para menores de 10 años y la infección aumenta hasta en un 50% en adultos, con un promedio de edad de 60 años ^{24,33a,78}. Por otro lado, se ha observado que entre el grupo de afro-americanos, hispanos e indios nativos de ese país, la infección por el microorganismo se presenta en edades tempranas y la transmisión intrafamiliar es alta, observándose una asociación con bajo nivel socioeconómico, prácticas de higiene deficientes y hacinamiento ¹⁵.

Por el contrario, se estima que en los países en desarrollo la mayoría de las personas (el 80% aproximadamente) se infectan con *H. pylori* a una edad promedio de 10 años; fenómeno que al parecer está relacionado con los factores anteriormente señalados ^{15,90}.

En países de Latinoamérica como Costa Rica y Brasil se reporta una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *H. pylori* por cada 100 000 habitantes. En algunos países como en México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo ⁴². En un estudio seroepidemiológico realizado en 1997 se trabajó con un banco de sueros representativo de la población de todos los estados de la República Mexicana (11,605 sueros) procedentes de personas cuya edad fluctuó entre 1 a 90 años ⁹⁰. Los resultados mostraron que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaban anticuerpos contra *H. pylori* y que la seropositividad aumentó hasta un 50% en los niños de 10 años de edad, lo que indicaba que la infección por el microorganismo en nuestro país se adquiere a edades tempranas. La tasa de seropositividad fue aproximadamente del 5% anual durante los primeros 10 años de la vida y aumentó en un 80% en los adultos jóvenes entre los 18 y 20 años de edad ⁹⁰.

En la actualidad no se conoce un reservorio no humano, lo que hace suponer que la infección es específica para el hombre, aunque se ha documentado la infección experimental por *H. pylori* en primates ^{15,30}, los cuales desarrollan un cuadro clínico de gastritis y úlcera muy parecido al del humano. Los mecanismos específicos de transmisión de la bacteria siguen sin determinarse, pero por lo común de la infección y su amplia distribución se postula que ocurre de persona-persona, por las vías oral-oral y oral-fecal ¹⁵.

H. pylori es el agente etiológico en un 70% a un 80% de la forma más común de inflamación gástrica crónica denominada gastritis atrófica crónica tipo B ^{7,11,12,20,34,36,42,67,70}. La enfermedad involucra el antro y el fondo del estómago, con una imagen histológica que incluye con frecuencia infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinófilos; este

proceso inflamatorio al parecer es más importante en el antro que en el cuerpo^{3,6,58,66}. *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica permaneciendo por años e incluso por décadas en la mayoría de los casos^{6,11}, con mínima sintomatología para el paciente. Sin embargo en algunos casos se han descrito cambios morfológicos importantes en mucosa gástrica que van desde un proceso inflamatorio leve, hasta el desarrollo de una gastritis que evoluciona a una úlcera, con lesiones atróficas que pueden terminar en metaplasia, displasia y finalmente en un adenocarcinoma^{6,7,10,17,20,34,36,42,52,63,75,87}

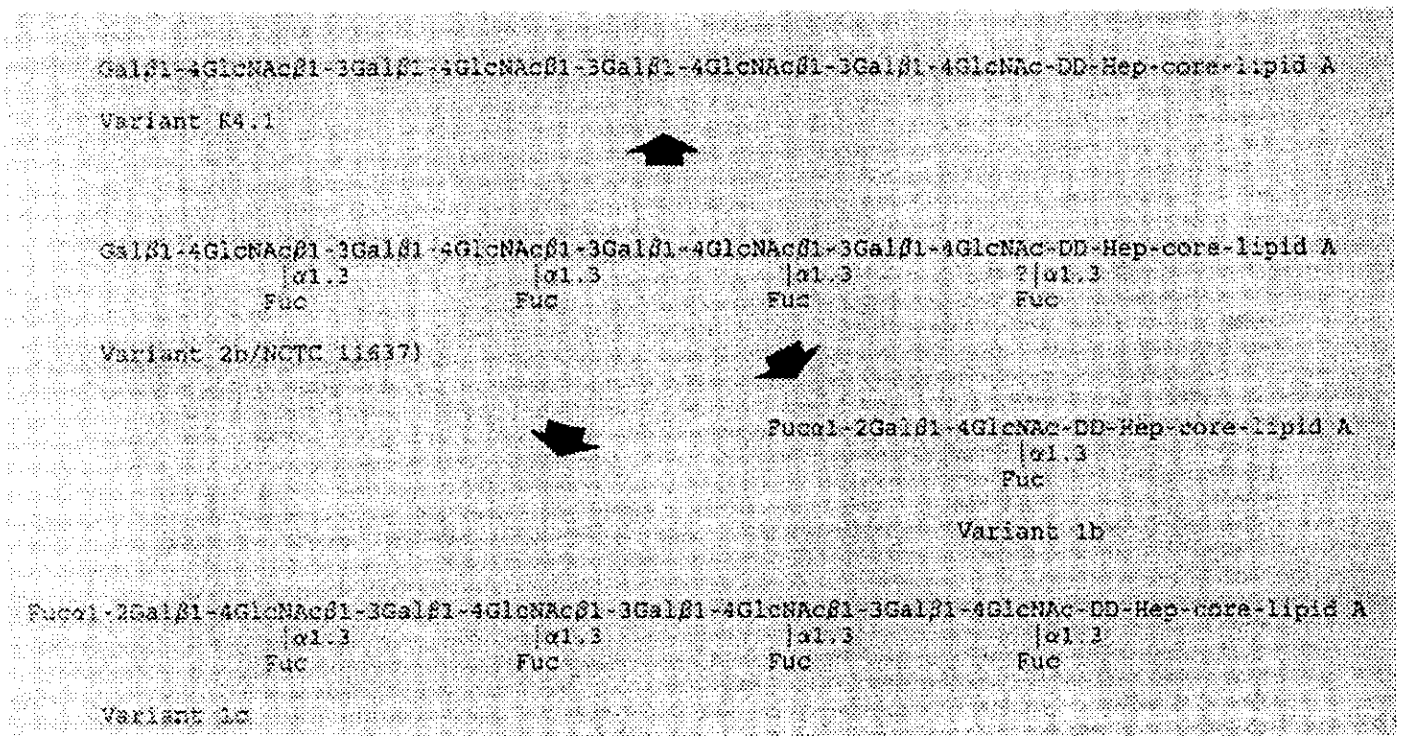
1.3 Patogénesis.

A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, no todas las personas infectadas por esta bacteria desarrollan una enfermedad, al parecer el tipo de cepa bacteriana que se encuentra colonizando la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad^{3,6,7,8,16,36,44,81,88,99,103}. Se han propuesto varios mecanismos de virulencia para *H. pylori*, uno de ellos es la producción de ureasa^{28,31,39,50,60,79}. Esta enzima se caracteriza por tener un peso molecular de 550 kDa y está formada por dos subunidades UreA y UreB; es una de las proteínas más abundantes, ya que constituye el 5% del total de proteínas que origina el microorganismo. La ureasa hidroliza la urea, necesita que dos iones de nickel (Ni^{2+}) se fijen en su sitio activo reduciendo amonio y bióxido de carbono. El amonio es un agente neutralizante del ácido hidrociorhídrico del estómago, que ocasiona transitoriamente aclorhídria con un pH gástrico neutro. Este proceso permite que *H. pylori* se mueva rápidamente y atraviese la capa de moco para llegar al epitelio gástrico^{3,58,60}. Estudios con cerdos gnotobióticos^{32,60} indican que cepas mutantes de *H. pylori* que

son incapaces de producir ureasa, pierden la habilidad de colonizar el estómago, lo que sugiere que la producción de ureasa participa en la colonización de la mucosa gástrica y en la sobrevivencia del microorganismo en el pH ácido del estómago. Más aún, la ureasa *per se* y el amonio como producto final del desdoblamiento, tienen una función importante en la inflamación induciendo la respuesta inmune, ya que el amonio actúa como factor quiomiotáctico que activa a los monócitos y leucocitos polimorfonucleares para liberar citocinas y ocasiona una respuesta inflamatoria localizada con daño del tejido del epitelio gástrico ^{3,8,58,60}.

Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que posee en su antígeno "O" los carbohidratos de Lewis "x" (Le^x) o Lewis "y" (Le^y) o ambos ^{1,2,8,52,58,66}. En un trabajo reciente se demostró que la estructura del LPS de la cepa NCTC 11637 es similar al antígeno Lewis "x", presente en el grupo sanguíneo tipo O ² y en la superficie de las células epiteliales gástricas ^{1,1a,2,52}. La cepa MO19 tiene un LPS tipo Lewis "y" ¹ y la cepa P 466, expresa tanto Lewis "x" y Lewis "y" ¹. Los niveles de expresión de estos antígenos (Le) son diferentes entre cepas y muestran variación de fase estimulada por el tipo de antígeno de Lewis que se exprese en la superficie de las células epiteliales ^{1,2,8,52,60,76}. Los antígenos Lewis son glicoconjugados con diferente número de residuos de fucosa y pueden ser de 4 tipos: Le^a, Le^b, Le^x y Le^y (Figura 1). Los antígenos Lewis tienen una participación dual en la patogénesis; (i) por un lado, producen un mimetismo molecular, que posiblemente ayuda al microorganismo a evadir la respuesta inmune en el momento de la colonización en el estómago y con ello favorece su permanencia por tiempo prolongado en el nicho gástrico ^{8,58,60,66,76} y (ii) por el otro la inducción de una respuesta autoinmune contra los antígenos Lewis que expresa *H. pylori* y que son compartidos por las células eucariotas contribuyendo al daño directo o indirecto ^{3,8,58,66,76}.

Figura 1. Variación de fase del lipopolisacárido de *H. pylori* (el antígeno de Lewis variante 2b) que por condiciones químicas o físicas éste puede variar al tipo 1, 1b y 1c dependiendo de la ganancia o pérdida de residuo(s) de fucosa.

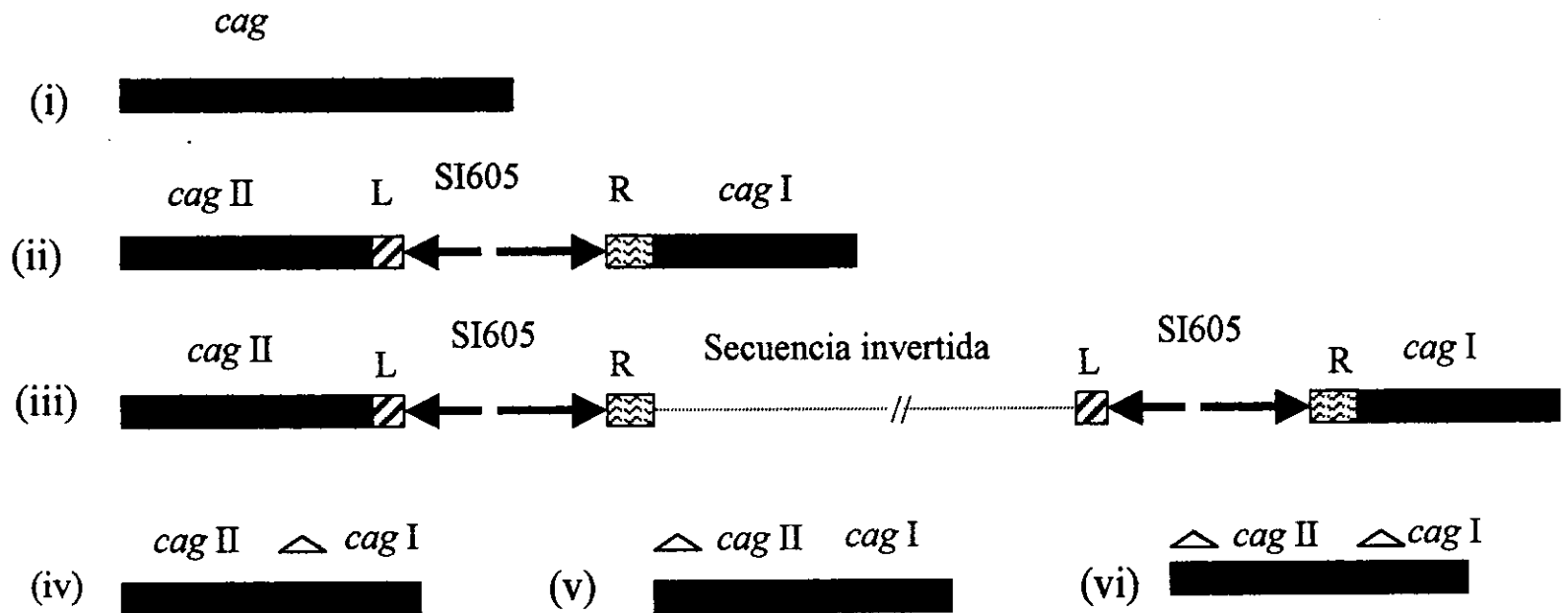


Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por genes localizados en una isla de patogenicidad denominada *cag* (PAI-*cag*)^{8,16,19,39,40,44,50,60}. Esta isla tiene un tamaño aproximado de 40 kb, con alrededor de 40 genes. PAI-*cag* presenta características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia*. Las características de la isla de patogenicidad de *H. pylori*^{39,44,60} son las siguientes: (i) el contenido de G+C varía de 35% para la PAI-*cag* y de 39% para el cromosoma bacteriano; (ii) contiene genes putativos de virulencia y genes que codifican para proteínas del sistema de secreción tipo IV; (iii) en algunas cepas presenta una o dos secuencias de inserción (IS605 y IS606); (iv) en otras cepas la isla está flanqueada por secuencias repetidas directas, las cuales participan importantemente en la integración de la isla dentro del genoma bacteriano.

La PAI-*cag* puede estar organizada de forma diferente dependiendo de la cepa que se estudie (figura 2): (i) La isla puede estar continua en una misma región; (ii) o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II por una secuencia de inserción (IS605); (iii) o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II por secuencias del cromosoma bacteriano, flanqueado por una secuencia de inserción (IS605); y (iv)-(vi) que una o ambas regiones (*cagl* y/o *cagII*) de la isla presenten pérdidas parciales de nucleótidos. Estas variaciones en la estructura de PAI-*cag* pudieran explicar la existencia de cepas PAI-*cag*⁻ y cepas PAI-*cag*⁺^{16,19,33,39,50,60}.

El gen *cagA* codifica para una proteína de membrana externa denominada Proteína Asociada a la Citotoxina (CagA),^{18,24,91} con un peso molecular que varía entre 120 y 140 kDa, altamente inmunogénica y cuya función se desconoce. Sin embargo, la detección de anticuerpos contra CagA de *H. pylori* está bien documentada^{22,24,33,70}. En el estudio realizado por Cover y col., proponen que la expresión del gen *cgA* sea considerado un

Figura 2. Representación esquemática de las organizaciones de PAI-*cag* en el cromosoma de *H. pylori*



(i): PAI-*cag* continua. (ii): PAI-*cag* dividida en dos segmentos por una secuencia de inserción SI605.
 (iii): PAI-*cag* dividida en dos segmentos por DNA cromosomal flanqueada por SI605.
 (iv) – (vi): segmentos con pérdidas parciales de *cag* I o *cag* II, o ambos. L y R extremos izquierdo y derecho respectivamente del elemento de inserción SI605.

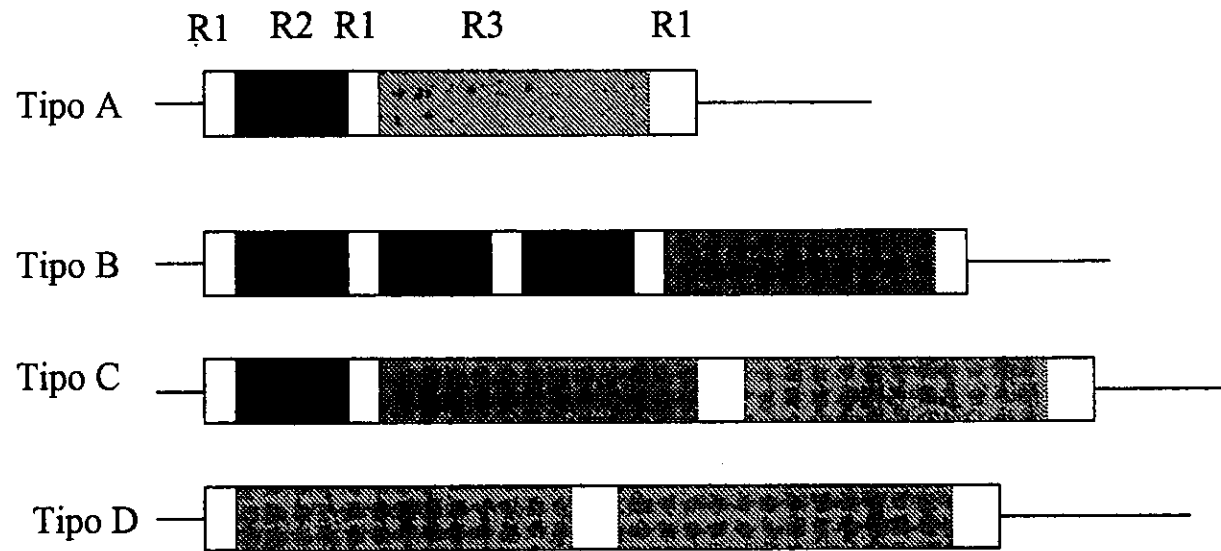
marcador de virulencia ^{18,22,24,59}. Se detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG por ELISA contra CagA en pacientes con úlcera duodenal en un 87.5%, con úlcera gástrica en un 76% y con dispepsia no ulcerosa en un 56.4%, con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ para pacientes infectados con cepas CagA + y úlcera péptica ^{22,33,67,70,81,87}.

En pacientes infectados con cepas que tienen el gen *cagA* y expresan la proteína CagA, se aprecia una asociación con el desarrollo de gastritis activa crónica, gastritis atrófica, úlcera péptica y aumenta el riesgo para desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico ^{10,33,57,67,70,81,84,87,99,95,96}. Las infecciones con cepas que carecen de la expresión de esta proteína se han asociado con patologías menos graves. En contraste, estudios hechos en poblaciones de Japón, Corea y China han reportado que más del 90% de las cepas son *cagA*-positivas, independientemente del estado clínico de los pacientes ^{47,57,62,70,84,87}.

El análisis de nucleótidos del gen *cagA*, ha mostrado que la región 5' está altamente conservada, mientras que la región 3' del gen presenta un número variable de secuencias repetidas y que, al transcribirse, determina el tamaño de la proteína CagA ^{60,101}. El análisis de del extremo 3' del gen *cagA* en 155 cepas *cagA*-positivas, identificó con base a su secuencia y organización estructural, cuatro alelos de *cagA* designados como tipos A, B, C y D (figura 3) ^{60,91,101}. Las cepas tipo C se han asociado con mayores niveles de anticuerpos anti-CagA en pacientes con gastritis atrófica severa o con cáncer gástrico.

La producción de una citotoxina vacuolizante (VacA) es, sin lugar a dudas, otro factor de virulencia importante de *H. pylori*. VacA ^{9,14,21,26,32,34,45,55,61,72,73,80} es responsable de la

Figura 3. Representación esquemática de los diferentes tipos de la región 3' (tipos A, B, C y D) del gen *cagA* de *H. pylori*



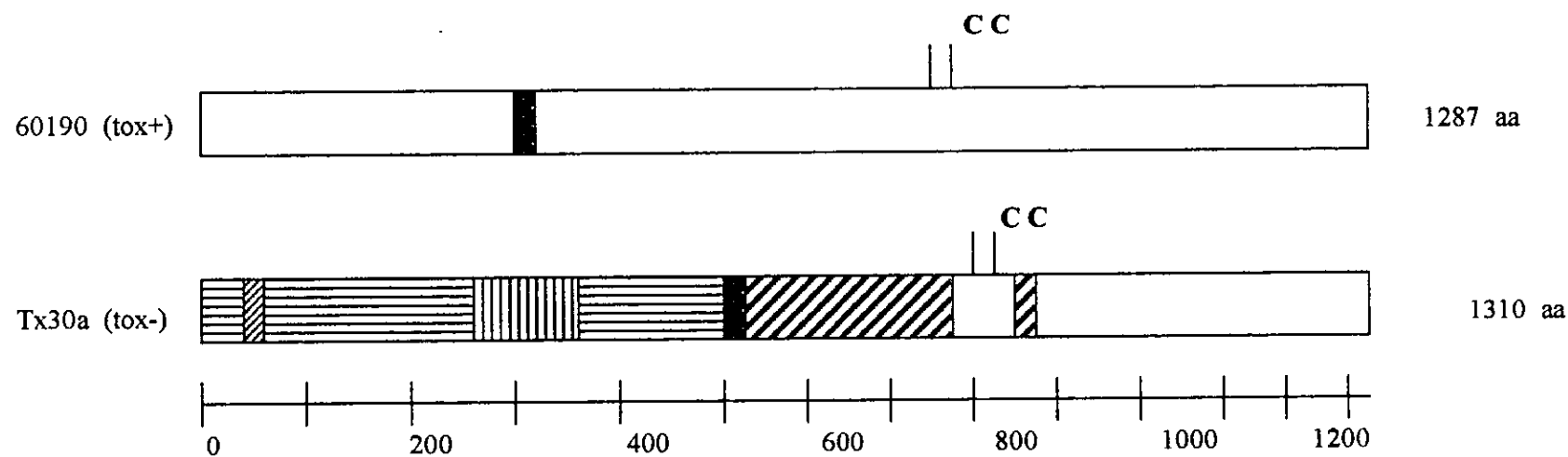
R1; secuencias repetidas de 15 pb. **R2**; secuencias repetidas de 42 pb, **R3**; secuencias repetidas de 147 pb. La secuencia de aa deducida de la región R3 de la proteína CagA, es diferente con respecto al dominio de 15 aa de longitud, entre aislamientos japoneses y otras cepas de *H. pylori* de otras áreas geográficas.

formación *in vivo* de vacuolas en células del epitelio gástrico, así como en diferentes líneas celulares *in vitro*. La administración oral de la citotoxina a ratones lactantes es capaz de producir degeneración de la mucosa gástrica^{80,88}.

La citotoxina vacuolizante está codificada por el gen *vacA* que es constitutivo y se encuentra en una sola copia en el cromosoma de *H. pylori*. El gen *vacA* tiene aproximadamente 3864 pb, presenta 5 marcos de lectura abierta, sólo un marco de lectura es el adecuado para la codificación la citotoxina vacuolizante^{8,27,39, 60,80,82,91}.

Desde 1994 se realizaron los primeros estudios de secuenciación completa del gen *vacA* en la cepa de *H. pylori* (60190 tox+) y en la cepa 87-203 (tox-). El análisis de un fragmento del gen *vacA* de 1541 pb mostró una homología del 64.8% entre las secuencias de nucleótidos de la cepa tox+ y la cepa tox-^{4,27,37,60,80}. Se identificó además una región de 567 pb aproximadamente, localizada a la derecha del gen *vacA*, que correspondió al gen del RNAt de la cisteína-sintetasa^{8,27,39, 60,80,82,91}, homólogo al de *E. coli*. En 1995 se analizó una región de 0.73 kb en 10 cepas tipo de *H. pylori*, la cual correspondió a la región media del gen *vacA*⁴. Esta región media mostró una identidad nucleotídica del 70.4% entre las cepas tox+ y las cepas tox- y una identidad en aminoácidos del 58.7% (figuras 4 y 6). Con base en sus secuencias las cepas se clasificaron en dos familias de alelos; alelo tipo m1 (para cepas con actividad citotóxica) y alelo tipo m2 (para cepas sin actividad citotóxica). Se analizó también la secuencia de un fragmento de 0.5 kb, que correspondía a la región de la secuencia señal del gen *vacA*, con diferencias importantes entre las cepas tox+ y tox-. Con estos resultados se clasificó a las cepas en tres familias de alelos; alelo tipo s1a, tipo s1b y s2 (figuras 5 y 6)⁴.

Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína VacA con actividad citotóxica (*Helicobacter pylori* cepa 60190) y de la proteína VacA sin actividad citotóxica (*Helicobacter pylori* Tx30a)



La mayor homología se observa en la región carboxilo-terminal y la mayor diversidad se aprecia en la región media. ■ : inserción de 20 aa en la cepa 60190 y de 23 aa en la cepa Tx30a. CC: par de residuos de cisteína. Porcentaje de identidad en aa □ > 90%; ▨ 80 a 90%; ▤ 70 a 80%; ▩ < 70%.

Figura 5. Secuencia de Nucleótidos de las familias (s1a, s1b y s2) de la secuencia señal del gen *vacA*, de cepas de *H. pylori*.

Cepas

Tipo s1a

60190 atggaaatacaacaacacaccgcaaaatcaatcgccctctggtttctctttagtaggagcattggtcagcatcacaccgcaacaaagtcatgccgccttt
 11638c.....a.....
 185-44a.....
 87-226t.....
 93-68t.....

Tipo s1b

* * * * * * *

87-29 atggaaatacaacaacacaccgcaaaatcaatcgccctttagtttctctttagcaggagcgttgattagcgcataaccgcaagagagtcatgccgccttt
 86-385c.....a.....
 87-81c.....a.....
 84-183g.....g.....c.....g.....

Tipo s2

Tx30a atggaaatacaacaacacaccgcaaaatcaatcgccctattatttctctcgttttagtgggggtgtaatgggcaccgaactggggctaacacgccaatgatccatacacagcgagagtcgcgctttt
 87-203c.....c.....a.....t.....
 86313t.....c.....c.....a.....a.....t.....c.....c.....

*; Indican la diferencia de nucleótidos entre las secuencias de *Helicobacter pylori* tipo s1a y tipo s1b.

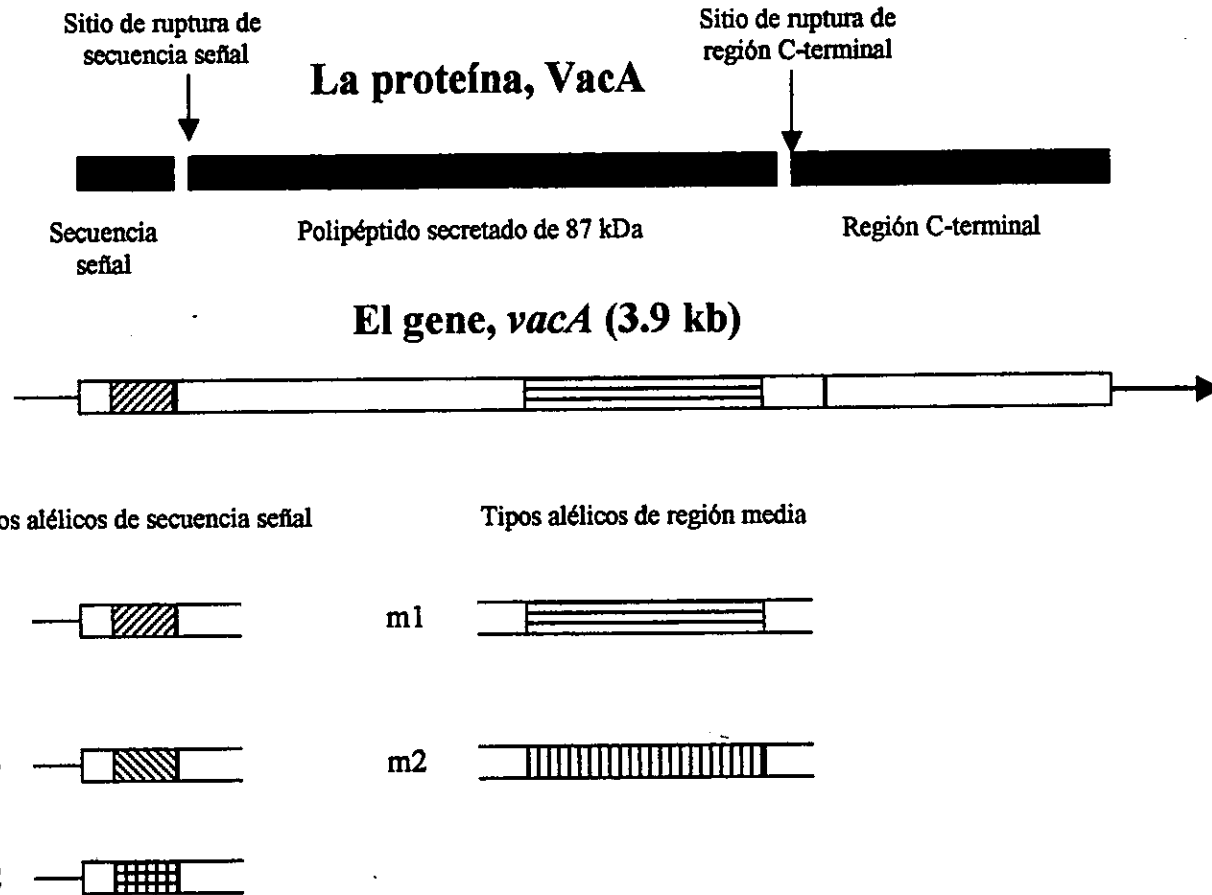


Figura 6. Esquema del gen *vacA* y de la citotoxina vacuolizante (VacA) de *H. pylori*.

En 1995 Atherton y col.⁴ realizaron la caracterización del gen *vacA* de 59 cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes con diferentes patologías (úlceras pépticas, gastritis y asintomáticos) en los Estados Unidos. Utilizando iniciadores específicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (tabla 1) amplificaron la región secuencia señal (s1a, s1b, s2) y la región media (m1 y m2) de cada una de las cepas de los pacientes estudiados, reportando que los pacientes presentaron cepas con los genotipos s1a/m1, s1b/m2, s1b/m1, s1b/m2 y s2/m2, no encontrando pacientes con cepas con el genotipo s2/m1. Al estudiar la actividad citotóxica en monocapas de células HeLa, de los sobrenadantes de cada una de las cepas aisladas de su población de estudio, observaron que las cepas presentaban diferente actividad citotóxica, clasificándolas en: alta, media, y nula actividad vacuolizante^{4,45,55}. En este mismo estudio, los autores observaron también una asociación significativa entre el genotipo de *vacA* y la actividad vacuolizante, reportando que las cepas con genotipo s1a/m1 eran las que presentaban mayor actividad citotóxica; que las cepas con genotipo s1b/m1, s1a/m2 y s1b/m2 presentaban una actividad entre media y baja; mientras las cepas con el genotipo s2/m2 no presentaban actividad citotóxica. Reportaron además que las cepas s1a/m1 se aislaban con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica, que las cepas tipo s1b/m1 se encontraban fundamentalmente en muestras de pacientes con gastritis; mientras que las cepas s2/m2 se aislaban en mayor número de pacientes asintomáticos^{4,6,7}.

A pesar de que este sistema de genotipificación de *vacA* ha sido exitoso para el estudio de *H. pylori* aislado de pacientes en los Estados Unidos y algunos países de Europa, la dicotomía m1/m2 no parece ser suficiente para clasificar cepas provenientes de países de Asia y, probablemente, de otras partes del mundo^{5,43,47,48,70,71,92,93}. En Alemania se reporta un estudio⁴³ de 30 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con gastritis crónica activa, úlcera péptica y cáncer gástrico en el que sólo tres de ellas no pudieron caracterizarse con

Tabla 1. Iniciadores específicos para genotipificar por PCR las familias de la secuencia señal s1a,s1b y s2 y la región media m1 ym2 el gen *vacA* de cepas *Helicobacter pylori*

Familia	Iniciador	Secuencia de Nucleótidos	Localización Tamaño de Producto
m1	VA3-F	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G	2741-3030 (290 pb)
	VA3-R	CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	
m2	VA4-F	GGA GGC CCA GGA AAC ATT G	976-1327 (352pb)
	VA4-R	CAT AAC TAG CGC CTT GCA G	
S1			797-1055 (259pb)
S1a	VA1-R	CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	866-1055 (190 pb)
	VA1-R	CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	
S1b			(187pb)
S2	VA1-R	CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	371-569 (199 pb)

los iniciadores específicos ⁴ en la región media del gen *vacA*. Al hacer el análisis de nucleótidos de la región media de estas tres cepas los autores encontraron una diferencia de nucleótidos de un 9.3% cuando se comparó con la secuencia de región media de una cepa tipo m1 (NCTC 11638) y hasta una diferencia de 29% cuando se comparó con una cepa tipo m2 (Tx30a). A esta nueva región media se le denominó tipo m3 ^{43,81,85}. Al igual que en Alemania, estudios en Bélgica ^{93,94} han mostrado una nueva región media para el gen *vacA*, designada como m1a y otra región media tipo m1-m2 en cepas aisladas de pacientes chinos ^{65,66}. En estos reportes de Japón, Tailandia, Hong Kong, Holanda, Italia, Francia, Australia y otros más ^{5,43,47,48,65,66,70,71,81,85,92,93} (tabla 2), donde la caracterización completa de la región secuencia señal o la región media del gen *vacA* no se realizó completamente, se tuvo la necesidad de secuenciar las cepas no caracterizadas y diseñar nuevos iniciadores para caracterizar su población de estudio.

La citotoxina *VacA* se sintetiza como una protoxina de 140 kDa, la cual contiene tres dominios funcionales: a) una secuencia señal N-terminal de 33 aminoácidos (péptido líder de 3 kDa); b) la citotoxina madura de 87 kDa y; c) un dominio C-terminal de 50 kDa asociado a la membrana externa ^{21,56,64,80,82,97} (figura 7). Para ser excretada la protoxina presenta ruptura tanto en su porción amino terminal (péptido señal) como en su región carboxilo terminal quedando un monómero de aproximadamente 95 kDa para formar una toxina madura constituida por 6 ó 7 monómeros que, al unirse, lleva acabo un rearrreglo estructural semejando una flor de 6 ó 7 pétalos con un centro (anillo) de 30 nm de diámetro ^{13, 25,29, 54,56,103} (Figura 8). Cada monómero presenta una asa expuesta flexible, propensa a una ruptura proteolítica que la divide en dos subunidades: una de 37 kDa y otra de 58 kDa ^{13,25,29,56,59,64,82}. Se desconoce, sin embargo, si esta ruptura es producida por la misma toxina o si existen proteasas externas responsables de la hidrólisis asociadas con la superficie

Tabla 2 . Distribución geográfica de la frecuencia de tipos de alelos de secuencia señal y región media del gen *vacA* de cepas de *Helicobacter pylori*

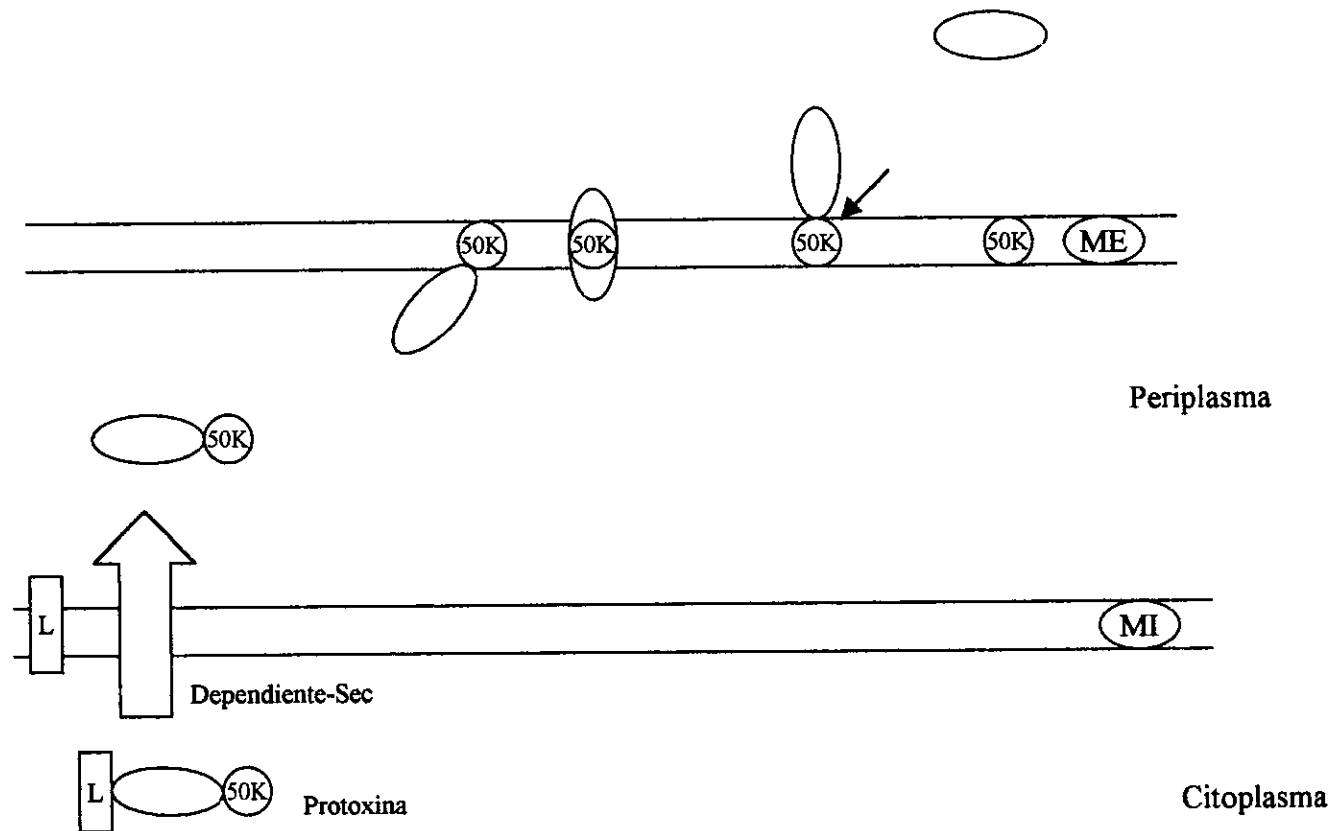
Localización Geográfica*	Total de Cepas	s1a		s1b		s1c			s2	Múltiples genotipos**			Sin tipificar
		m1	m2a	m1	m2a	m1	m2a	m2b	m2a	s	m	s+m	
Norte y Este de Europa	231	77	74	7	8	4	0	0	34	11	10	5	1
Francia e Italia	90	16	13	19	13	0	0	0	20	4	4	0	1
Portugal y España	101	4	2	40	7	0	0	0	7	12	7	22	0
Norte América	73	7	15	19	4	0	0	0	16	1	5	6	0
Centro y América del Sur	105	0	0	66	8	1	0	0	5	3	16	6	0
Este de Asia	74	7	6	1	2	27	19	8	1	0	3	0	0
Australia	28	6	5	2	1	2	0	0	8	2	2	0	0
Norte de Africa(Egipto)	33	2	5	2	3	0	0	0	16	4	0	1	0
Total	735	119	120	156	46	34	19	8	107	37	47	40	2

*Norte y Este de Europa: Incluye República Checa, Alemania, Hungría, Holanda, Polonia, Rumania, Suiza, y Reino Unido.

Norte América : Canadá y Estados Unidos. Este de Asia: China, Hong Kong, Japón y Tailandia. Centro y América del Sur: Costa Rica, Brasil, Colombia y Perú.

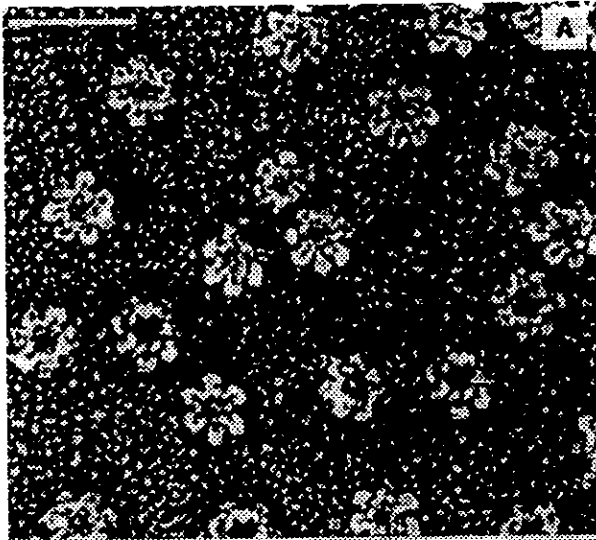
** Estas cepas de *Helicobacter pylori* amplificaron para mas un tipo de secuencia señal y/o región media.

Figura 7. Modelo de secreción extracelular de la citotoxina vacuolizante de *H. pylori*

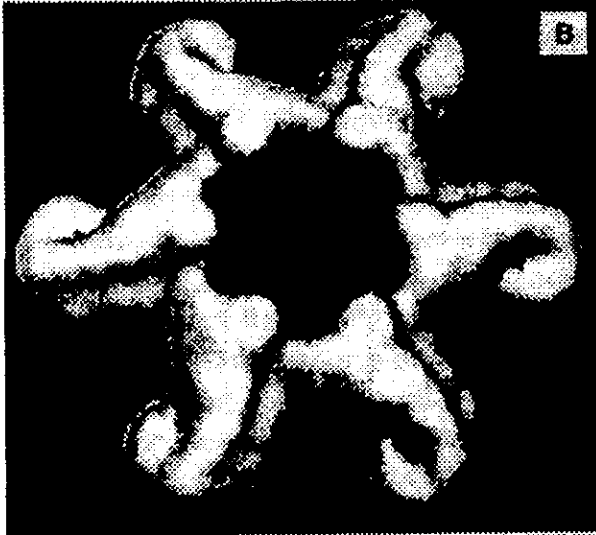


El gen *vacA* codifica para una protoxina de 139.6 kDa que consta de: L; un péptido líder 3kDa, la citotoxina de 87 kDa, y un dominio de 50kDa asociado a membrana externa (ME). El precursor pasa a través de la membrana interna (MI) vía su péptido líder, seguido de una ruta de transporte dependiente de sistema de secreción. Para la translocación de la ME el dominio C-terminal de 50 kDa se inserta dentro de ME y se transloca la porción de la citotoxina hacia el medio extracelular, la ruptura proteolítica (flecha) da como resultado la liberación de la toxina activa de 87 kDa.

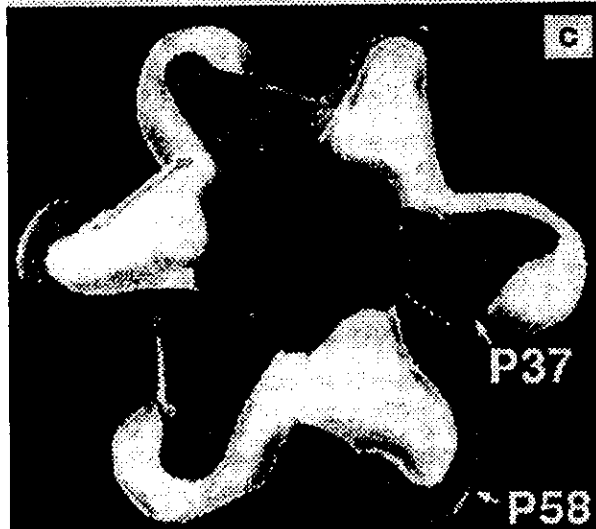
Figura 8. VacA de *Helicobacter pylori*



Micrografía electrónica de la citotoxina vacuolizante.



Vista superior tridimensional de la citotoxina vacuolizante nativa.



Módulo de la posible interacción entre 6 monómeros (formados por dos subunidades, una de 37kDa y otra de 58 kDa, la línea punteada representa el asa expuesta que une a las 2 subunidades), formando la estructura oligomérica de la citotoxina vacuolizante.

bacteriana. También se desconoce si es necesario el procesamiento de las dos subunidades para la actividad tóxica. Cuando se expone VacA a pH ácido o a bases débiles como cloruro de amonio, se ha observado que ocurre una separación de los monómeros, acompañada por un aumento en la actividad vacuolizante en monocapas de células HeLa^{9,14,21,25,29,64}. Estudios recientes han mostrado que la subunidad B de la citotoxina VacA es la responsable del reconocimiento del receptor en la superficie de células epiteliales, aunque necesita de la interacción de ambas subunidades para que la toxina se interne y actúe. Estudios *in vitro*^{38,61,64} han demostrado que VacA se une a la célula por la interacción con receptores específicos y que esta unión depende de la concentración de la citotoxina, así como de la saturación de los receptores en la superficie celular. La citotoxina se interna al citosol, al parecer por una cinética comparable con la endocitosis mediada por receptor. Se ha propuesto que el receptor del factor de desarrollo epidermal (EGF) y que una proteína de 140 kDa son los receptores para VacA^{83,100}.

Se han reportado tres mecanismos de acción de la citotoxina vacuolizante. (i) La formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, que se originan a nivel perinuclear hasta llenar completamente el citosol de la célula lo que origina su muerte^{9,14,21,26,29,45,55,72,73,74}. Las membranas de las vacuolas inducidas por la citotoxina tienen un alto contenido de una proteína pequeña ligadora de GTP, denominada Rab 7, la cual está asociada a compartimientos de endosoma tardíos y de una glicoproteína de membrana denominada Lgp 110 que está relacionada con membranas de lisosomas. Lo anterior determina que estas vacuolas estén formadas por un híbrido de membranas de endosomas tardíos y de lisosomas^{72,73,74}. El lumen de las grandes vacuolas inducidas por VacA, tanto en el citoplasma de células de cultivo, como en el de células epiteliales gástricas, se acidifica

por la actividad de una bomba de protones gracias a una ATP-asa de tipo vacuolar unida a la membrana de estas vesículas ^{26,72,73,74}. La ATP-asa V está presente en varios compartimientos intracelulares de células eucarióticas que participan en eventos diferentes de las vías endocíticas y exocíticas. Este complejo (ATP-asa-bomba de protones) unido a la membrana, hidroliza ATP dentro del lumen de las membranas que delimitan a los compartimientos. La citotoxina VacA es capaz de alterar el tráfico de membranas a nivel endosoma-prelisosoma de manera tal que el tráfico de proteínas, de ligandos y el procesamiento de antígenos dependientes de ligandos se vean alterados y de causar un deterioro en la degradación proteolítica dentro de los lisosomas, ocasionando una disfunción letal para la célula. (ii) Otro mecanismo de acción independiente de la formación de vacuolas de VacA es el aumento en la permeabilidad de células polarizadas *In vitro* al paso de moléculas de bajo peso molecular ^{77,80a,86,89}, un fenómeno que, al parecer, aumenta el flujo de nutrimentos del interior de la célula hacia la submucosa favoreciendo la sobrevivencia de *H. pylori*. La adherencia de VacA a las células polarizadas de las monocapas da como resultado la disminución de la resistencia trans-epitelial a través de las células. Existen evidencias que muestran que el efecto de VacA sobre la disminución de la resistencia trans-epitelial corresponde a un aumento de la permeabilidad intracelular y se debe a que la citotoxina activa permanece asociada a la bacteria ^{77,80a,86,89}. (iii) Otro mecanismo que se le ha atribuido a la citotoxina es la formación de canales a través de la capa de lípidos de la membrana celular. Ciertos estudios han mostrado que la citotoxina se activa por un pH ácido, formando canales selectivos de baja conductividad de aniones y dependientes del voltaje. Esta permeabilidad propiciada por los canales favorece a los aniones con respecto a los cationes, facilitando la entrada de Cl⁻ y HCO₃⁻ y menos eficientemente de ácidos carboxílicos, de piruvato y gluconato ^{77,80a,86,89}. La citotoxina es capaz de interactuar con la bicapa lipídica y formar estructuras compatibles con poros hexaméricos; ^{77,86,103} en este caso, al parecer, es

necesaria la presencia de ambas subunidades (P37 y p58) para la formación de los canales, donde las dos subunidades presentan cambios configuracionales necesarios que permiten a la citotóxina insertarse en la bicapa lipídica. El aumento en la conductividad de iones en las membranas endosomales activa la ATPasa V electrogénica favoreciendo el flujo de H^+ y Cl^- del citosol al lumen del endosoma, ocasionando cambios osmóticos que aumentan la entrada de agua y, por consiguiente, un hinchamiento del compartimiento endosomal ^{77,80*,86,89,103}.

Todos los hallazgos señalados anteriormente indican que la citotóxina vacuolizante es un factor de virulencia importante en la patogénesis de la enfermedad gástrica en el humano. Las cepas de *H. pylori* que expresan la proteína asociada a la citotóxina y que son productoras de la citotóxina vacuolizante con alta actividad biológica, se han aislado más frecuentemente de pacientes con úlcera péptica, que de pacientes con gastritis crónica, como lo refieren diferentes estudios, donde pacientes con niveles altos de anticuerpos contra VacA y CagA muestran patologías gástricas severas y tienen mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma y linfoma gástrico ^{4,6,9,20,21,22,23,33,34,36,43,59,63,81,87,99,102}.

En México no existen estudios sobre la caracterización del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas localmente que muestren cual o cuales de sus genotipos se encuentran con mayor frecuencia y si alguno de ellos predomina en relación con tipos específicos de cuadros clínicos relacionado con su actividad citotóxica vacuolizante.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la diversidad genética del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad ácido-péptica y su asociación con la actividad citotóxica en células HeLa.

2.2 Objetivos Particulares

2.2.1. Determinar en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad ácido-péptica en México, los tipos del gen *vacA* con base en la caracterización de la región secuencia señal (s1a, s1b y s2) y en la región media (m1 y m2).

2.2.2. Determinar la asociación de los genotipos encontrados en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes en México, con su capacidad para causar vacuolización de células HeLa .

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Inmunopatogénesis Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

3.1 Cultivo primario.

Se trabajó con cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas obtenidas de 20 pacientes con diferentes patologías (6 pacientes con úlcera duodenal, 6 con úlcera gástrica y 8 con gastritis). Los pacientes tuvieron una edad promedio de 54 años (intervalo de 30 a 80 años), que acudieron al servicio de Gastroenterología del Hospital Central de Especialidades del Sur de Petróleos Mexicanos.

Se obtuvieron, en colaboración con un médico gastroenterólogo en la unidad de endoscopia, 3 biopsias por paciente, 2 provenientes de antro y una de cuerpo gástrico, las cuales se transportaron al laboratorio de Inmunopatogénesis Molecular para su procesamiento, en medio de transporte de Stuart, en un tiempo no mayor de dos horas. Las biopsias se procesaron independientemente con el siguiente protocolo:

A su arribo al laboratorio se homogeneizó la biopsia en 200 µl de solución salina isotónica y el volumen se dividió en alícuotas de 100 µl, las cuales se mantuvieron a -70°C hasta su uso. A partir de una de las alícuotas se hicieron tres diluciones (1:10, 1:100,

1:1000). Cada una de estas diluciones se inoculó en placas de agar Casman suplementado con 10% de sangre de caballo desfibrinada y antibióticos (trimetoprim 6 µg/ml, vancomicina 6 µg/ml y anfotericina B 5 µg/ml). Las placas de agar se incubaron a 37° C en jarras de anaerobiosis con un sobre campy-pack Plus BBL (generador de atmósfera de microaerofilia 10% de CO₂, 5% de O₂ y 85% N) durante 5 a 7 días. Al término de este tiempo se analizaron las placas para determinar la presencia de *H. pylori* en el crecimiento primario y, de existir, se seleccionaron al azar un promedio de 10 colonias aisladas que se cultivaron en agar Casman ya descrito previamente.

3.2 Identificación del microorganismo

La identificación de *H. pylori* se realizó a través del análisis de la morfología de colonias, de tinción de Gram y por características bioquímicas. Se seleccionaron para estudio colonias pequeñas, lisas, convexas, translúcidas, con apariencia de gotas de rocío, con bordes regulares. A las colonias seleccionadas se les realizó frotis para tinción de Gram y se analizaron para detectar bacilos gram-negativos pequeños, pleomórficos (bacilos en espiral, bacilos en forma de coma) característicos de *H. pylori*. Para confirmar la presencia del microorganismo se realizaron pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa y catalasa, que son positivas para *H. pylori*.^{41,46} El almacenamiento de las cepas se realizó a -70° C en crioviales con medio de caldo Brucela, suplementado con 10% de SFB y 15% de glicerol.

3.3 Recuperación de las cepas de *H. pylori* y extracción de ácidos nucleicos

Las cepas de *H. pylori* se cultivaron por separado en Agar Casman bajo las condiciones previamente descritas. Se cosechó todo el crecimiento de la placa y la extracción del DNA cromosomal se realizó utilizando el método modificado de tiocianato de guanidina, EDTA y sarcocinato (GES).

3.4 Tipificación del gen *vacA* en su secuencia señal y región media.

Se genotipificó cada cepa de *H. pylori* de acuerdo con la familia de la secuencia señal: **s1a**, **s1b** y **s2** y a la de región media: **m1** y **m2** del gen *vacA*, por el método de la PCR utilizando iniciadores específicos para cada región (tabla 1).⁴ La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 480, bajo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización a 94°C por un minuto; temperatura de alineación a 52°C por un minuto; temperatura de extensión a 72°C por un minuto. El proceso se repitió durante 35 ciclos.

Los productos amplificados se estudiaron por electroforesis en cámaras horizontales en geles de agarosa al 1%, con buffer TAE pH 8. Los productos de PCR se corrieron en paralelo con un marcador de peso molecular de 100 pb y con los productos amplificados de las cepas control para cada una de las familias del gen *vacA*.⁴ Los geles se tiñeron con bromuro de etidio.

3.5 Obtención de los sobrenadantes de las cepas y su valoración para actividad citotóxica en células HeLa.

Las cepas de *H. pylori* se cultivaron por separado en caldo Brucela suplementado con SFB, los sobrenadantes se obtuvieron bajo el protocolo descrito por Cover y col.^{22,34,45}

Se hicieron diluciones seriadas de 1:10 a 1:360 de cada uno de los sobrenadantes y se inocularon por duplicado en placas de 96 pozos con una monocapa de células HeLa al 80% de confluencia celular. Las placas se incubaron a 37°C por 24 y 48 horas en 5% de CO₂. Como controles positivos y negativos para cada ensayo se usaron sobrenadantes obtenidos de las cepas tipo (cepa 8823 con alta actividad citotóxica; 84-183 con media actividad y 8822 sin actividad citotóxica)^{4,22,34,45}.

La actividad citotóxica de las cepas de *H. pylori*, se interpretó de la siguiente manera: alta actividad citotóxica, cuando en aproximadamente 100 células, se observó que más del 80% de éstas presentaban vacuolas en su citoplasma; actividad citotóxica media, cuando más del 30% de las células presentaron vacuolas y; sin actividad, cuando no se observaron células vacuolizadas.

RESULTADOS

4.1 Genotipificación del gen *vacA* de *H. pylori* de los cultivos primarios

El 60% de todos los pacientes estudiados presentaron infección múltiple en antro y cuerpo o en ambos, con cepas de *H. pylori* con variación alelica del gen *vacA* (s1a/m1, s1a/m2, s1b/m1, s1b/m2, s2/m1 y s2/m2). La secuencia señal tipo s1b se presentó con mayor frecuencia en el 80% (16 de 20) de los pacientes tanto en antro como en cuerpo y sin asociación a algún cuadro clínico. En el 45% (9 de 20) de los pacientes se aislaron cepas con el genotipo s2. Sólo el 10% (2 de 20) tuvieron cepas con el genotipo s1a (tabla 3). El 45% de los pacientes presentó en antro y cuerpo cepas de *H. pylori* con región media genotipo m1 y m2. En general el 95% de los pacientes presentaron cepas con genotipo m1 y al parecer sin asociarse al cuadro clínico. El 50% de los pacientes tuvieron además cepas de genotipo m2 (tabla 3 y 4).

4.2 Actividad citotóxica vacuolizante de las cepas de *H. pylori* de los cultivos primarios

De los 40 sobrenadantes de cultivos primarios de *H. pylori* obtenidos a partir de las muestras de antro y de cuerpo de los 20 pacientes estudiados y que se utilizaron para el ensayo de citotoxicidad vacuolizante en células HeLa, se encontró que el 10% de ellos presentaron alta actividad vacuolizante; el 72.5% con media actividad y el 17.5% sin actividad. Estos datos no mostraron alguna asociación entre el genotipo de *vacA* con la actividad citotóxica y el cuadro clínico del paciente (tabla 4).

Tabla 3. Distribución de genotipos identificados a partir de cultivos primarios de *H. pylori* en pacientes con enfermedad ácido-péptica.

Cuadro Clínico	No. de pacientes	Sitio de aislamiento	Tipo de secuencia señal				Tipo de región media		Total
			s1a	s1b	s2	ss	m1	m2	
DNU	8	antro		6		2	7	3	18
		cuerpo	5	2	2		7	4	20
UG	6	antro	1	5	1		6	2	15
		cuerpo1	5	2			6	2	16
UP	6	antro	1	5	4		6	2	18
		cuerpo1	5	2			6	2	16
Total	20		4	31	11	4	38	15	103

DNU; Dispepsia no ulcerosa. UG; úlcera gástrica sangrante. UP; úlcera péptica.
ss; secuencia señal sin tipificar.

Tabla 4. Genotipos de los genes *vacA* y *cagA* de cepas de *H. pylori*, y su actividad citotóxica vacuolizante del crecimiento primario de pacientes mexicanos con enfermedad ácido péptica

No. paciente	Diagnóstico endoscópico	Tipo sitio	Tipo <i>cagA</i>	Genotipos de <i>vacA</i>		Títulos Actividad citotóxica	Títulos de Ac. neutralizantes
				seq señal	región media		
1	No úlcera	a	+	s1b	m1,m2	1.3	1.3
			+	s1b	m1,m2	1.3	1.3
2	No úlcera	a	+	s1b	m1,m2	1.3	1.3
			+	s1b,s2	m1	1.3	1.3
3	UG	a	+	s1b	m1,m2	1.6	1.6
			+	s1b,s2	m1,m2	1.3	1.3
4	UP	a	+	s1b,s2	m1,m2	1.3	0.7
			+	s1b,s2	m1,m2	1.3	1.3
5	UP	a	+	s1b,s2	m1	1.6	1.9
			+	s1b,s2	m1	2.2	*
6	UP	a	+	s1b,s2	m1	2.2	2.2
			+	s1b	m1	0.7	1.3
7	No úlcera	a	+	s1b	m1	2.2	2.2
			+	s1b	m1	1.6	1.6
8	No úlcera	a	+	s1b	m1	1.3	1.6
			+	s1b	m1,m2	b	**
9	UP	a	+	s1b,s2	m1,m2	b	**
			+	s1b	m1	1.3	1.3
10	UP	a	+	s1b	m1	0.7	0.7
			+	s1b	m1	0.7	0.7
11	UG	a	+	s1b	m1	1.6	1.6
			+	s1b	m1	1.6	1.6
12	UG	a	+	s1b,s2	m1	b	**
			+	s1b	m1	1.6	1.6
13	UG	a	+	s1b	m1,m2	b	**
			+	s1b,s2	m1,m2	b	**
14	UG	a	+	s1b	m1	1.6	1.3
			+	s1b	m1	1.6	1.9
15	No úlcera	a	+	s1	m1	1.3	1.6
			+	s1	m1	1.3	1.9
16	No úlcera	a	+	s1b	m1	1.6	1.6
			+	s1	m1	1.3	1.3
17	No úlcera	a	+	s1b	m1	1.9	1.3
			+	s1b	m1,m2	1.6	1.6

18	UP	a	+	s1a	m1	1.3	1.3
		c	+	s1a	m1,m2	1.3	1.3
19	UG	a	+	s1a	m1	2.2	2.2
		c	+	s1a	m1	1.6	1.6
20	No úlcera	a	+	s2	m2	b	**
		c	+	s2	m2	b	**

a, antro. c, cuerpo. NR, no realizado. UP, úlcera péptica. UG, úlcera gástrica.

*, La actividad vacuolizante de estas muestras no pudieron ser neutralizadas por sueros homólogos.

b, Estas muestras no causaron vacuolización en células HeLa.

**, Como estas muestras no causaron vacuolización los ensayos de neutralización no fueron hechos.

1, expresado como diluciones \log_{10} .

De los 4 sobrenadantes con actividad citotóxica alta, dos de éstos provenían de pacientes con úlcera péptica (tabla 5), de los que se aislaron cepas de *H. pylori* con alelos múltiples de *vacA*. Siete sobrenadantes de 5 pacientes con diferente cuadro clínico no presentaron actividad vacuolizante (tabla 6).

4.3 Actividad citotóxica vacuolizante de las colonias individuales de *H. pylori* aisladas a partir de los cultivos primarios

A partir de los cultivos primarios se seleccionaron al menos 5 colonias tanto de antro como de cuerpo por paciente. De cada una se ensayó el sobrenadante en células HeLa para caracterizar su actividad citotóxica. Algunas cepas con el genotipo s1b/m1 presentaron diversidad en la actividad vacuolizante, mientras que 2 cepas con genotipo s2/m2 y s2/m1 presentaron alta actividad citotóxica

4.4 Genotipificación del gen *vacA* de colonias individuales de *H. pylori* aisladas a partir de los cultivos primarios.

La infección múltiple con cepas de *Helicobacter pylori* con alelos de *vacA* diferentes, se corroboró al caracterizar entre 9 y 12 colonias aisladas de cada cultivo primario de antro y de cuerpo para cada paciente. La genotipificación de 400 colonias a través de *vacA*, mostró que el 75% (15/20) de los pacientes presentó más de un alelo de *vacA* por cultivo (tabla 7).

Tabla 5. Genotipos de *vacA* de cepas de *H. pylori* cuyo sobrenadante del cultivo primario presentó alta actividad citotóxica.

No. de Pacientes	Cuadro clínico	Sitio de aislamiento	Genotipos presentes en el cultivo primario con alta actividad citotóxica	
			paciente No. 1	paciente no. 2
1	DNU	antro	s1b/m1	
1	UG	antro	s1a/m1	
2	UP	antro cuerpo	s1b/m1; s2/m1	s1b/m1; s2/m1

DNU; Dispepsia no ulcerosa. UG; úlcera gástrica sangrante. UP; úlcera péptica.

Tabla 6. Genotipos de *vacA* de cepas de *H. pylori* cuyo sobrenadante del cultivo primario no presentó actividad citotóxica.

No. de pacientes	Cuadro clínico	Sitio de aislamiento	Genotipos presentes en el cultivo primario sin actividad citotóxica	
			paciente No. 1	paciente no. 2
2	DNU	antro		s2/m2
		cuerpo	s1b/m1; s1b/m2	s2/m2
2	UG	antro	s1b/m1; s2/m1	s1b/m1; s1b/m2
		cuerpo		s1b/m1; s2/m2
1	UP	antro	s1b/m1; s2/m2	

DNU; Dispepsia no ulcerosa. UG; úlcera gástrica sangrante. UP; úlcera péptica.

El genotipo de *vacA* de *H. pylori* que se detectó con mayor frecuencia fue s1b/m1. El 11.5% (46 de 400 colonias) del total de las colonias estudiadas no se tipificaron en su secuencia señal y el 2.75% (11 de 400 colonias) en su región media (tabla 7). En cinco pacientes se caracterizaron cepas con el genotipo s2/m1 (4). No existió asociación de los genotipos de *vacA* con el cuadro clínico del paciente.

Los iniciadores conservados VA1-F y VA1-R (tabla1) se utilizaron para caracterizar la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori* que no fueron tipificadas y se amplificó por PCR dos fragmentos que diferencian por tamaño la secuencia señal (s1 de 259 pb y s2 de 286 pb).⁴ De las 46 cepas no caracterizadas, 42 fueron del tipo s1 y 4 fueron del tipo s2.

La caracterización completa de la región media de *vacA* de las cepas no genotipificadas se llevó a cabo con los iniciadores conservados VAG-F y VAG-R⁵, amplificando dos productos de PCR de tamaño diferente correspondiente a m1 y a m2 (para m1 un producto de 567 pb y para m2 de 642 pb) (Tabla 8). De las 11 cepas estudiadas, 10 fueron genotipo m1 y una cepa aislada de un paciente con gastritis presentó amplificación para m1 y m2.

4.5 Secuenciación de la secuencia señal y de la región media del gen *vacA*, de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos que no fueron genotipificadas con los iniciadores específicos.

Tabla 7. Genotipos *cagA* y *vacA* de aislamientos de colonias individuales de *H. pylori* de pacientes con infección múltiple^a

No. de paciente	Sitio ^b	No. de colonias probadas	No. de colonias <i>cagA</i> positivas	Tipos de Alelos de <i>vacA</i> detectados (No. de aislamientos)
1	a	10	8 ^c	s1b/m1(8), s1b/m2(2)
	c	10	10	s1b/m1(9), s1b/m2(1)
2	a	9	9	s1b/m1(5), s1b/m2(4)
	c	10	9 ^c	s1b/m1(6), s2/m1(1), s1/m1(2), s1b/m0(1)
3	a	10	10	s1b/m1(6), s2/m1(2), s1/m1(2)
	c	10	10	s1b/m1(7), s2/m1(2), s1b/m2(1)
4	a	11	11	s1b/m1(10), s2/m2(1)
	c	10	10	s1b/m1(8), s2/m2 (2)
5	a	10	10	s1b/m1(9), s2/m1(1)
	c	11	10 ^f	s1b/m1(8), s2/m1(2), s1b/m0(1)
6	a	11	11	s1b/m1(7), s2/m1(3), s1/m1(1)
8	c	10	10	s1b/m1(7), s1b/m2(3)
9	a	10	10	s1/m1(6), s1b/m2(1), s2/m2(3)
12	a	10	10	s1b/m1(9), s2/m1(1)
13	a	10	10	s1b/m1(8), s1b/m2(2)
	c	10	10	s1b/m1(6), s1b/m2(2), s2/m2(2)
14	c	10	10	s1b/m1(8), s1/m1(2)
15	a	10	10	s1/m1(9), s1/m0(1)
16	a	10	10	s1b/m1(6), s1/m1(4)
	c	10	8 ^g	s1b/m1(8), s1/m1(2)
17	a	10	10	s1b/m1(8), s1/m1(1), s1b/m0(1)
	c	10	10	s1b/m1(8), s1/m1(1), s1b/m2(1)
18	c	10	8 ^g	s1a/m1(3), s1a/m2(4), s1/m1(3)
19	a	12	12	s1a/m1(7), s1a/m0(2), s1/m1(3)
	c	10	10	s1a/m1(7), s1/m1(3)
20	a	10	7 ^h	s2/m2(7), s1/m2(2), s2/m0(1)

^aResultado por biopsia de paciente con genotipos múltiples de *vacA*

^b a, antro; c, cuerpo.

^c La colonia *cagA* – fue genotipo de *vacA* s1b/m1.

^d Cuando el tipo alélico de *vacA* es designado s1 es porque no se determinó el subtipo s1a ó s1b.

^e Cuando el tipo alélico de *vacA* es designado m0, la región media no se determinó.

^f La colonia *cagA*- fue genotipo de *vacA* s2/m1.

^g Las colonias *cagA*- fueron genotipo de *vacA* s1/m1

^h Una colonia *cagA*- fue genotipo de *vacA* s2/m0 y dos fueron *vacA* s2/m2

Tabla 8. Iniciadores conservados para la amplificación de la región media del gen *vacA* de *H. pylori*.

Iniciador	Secuencia	Localización	Tamaño de producto	Cepa de referencia
VAG-F	5' CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG 3'	1278-1844	567 pb	60190
VAG-R	5' GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG 3'	1254-1895	642 pb	TX30a

Tabla 9. Juego de iniciadores que amplifican la secuencia señal y la región media del gen *vacA* de *H. pylori*, derivados de la secuencia de nucleótidos de la cepa 60190

Iniciador	Secuencia de nucleótidos	Posición y Tamaño de producto
ss CYSS RME	5' CGC TTT GAT GGA CAC CCC CAC AA 3' 5' CCA ATC CCA ACC TCC ATC AAT CT 3'	519-1141 623 pb
m vacM-F vacM-R	5' GCT CAT TAC GGC TTC CAC TAA TGT 3' 5' GCG GTT ATT GTT GTT ATA AAG GGC 3'	2392-3097 706 pb

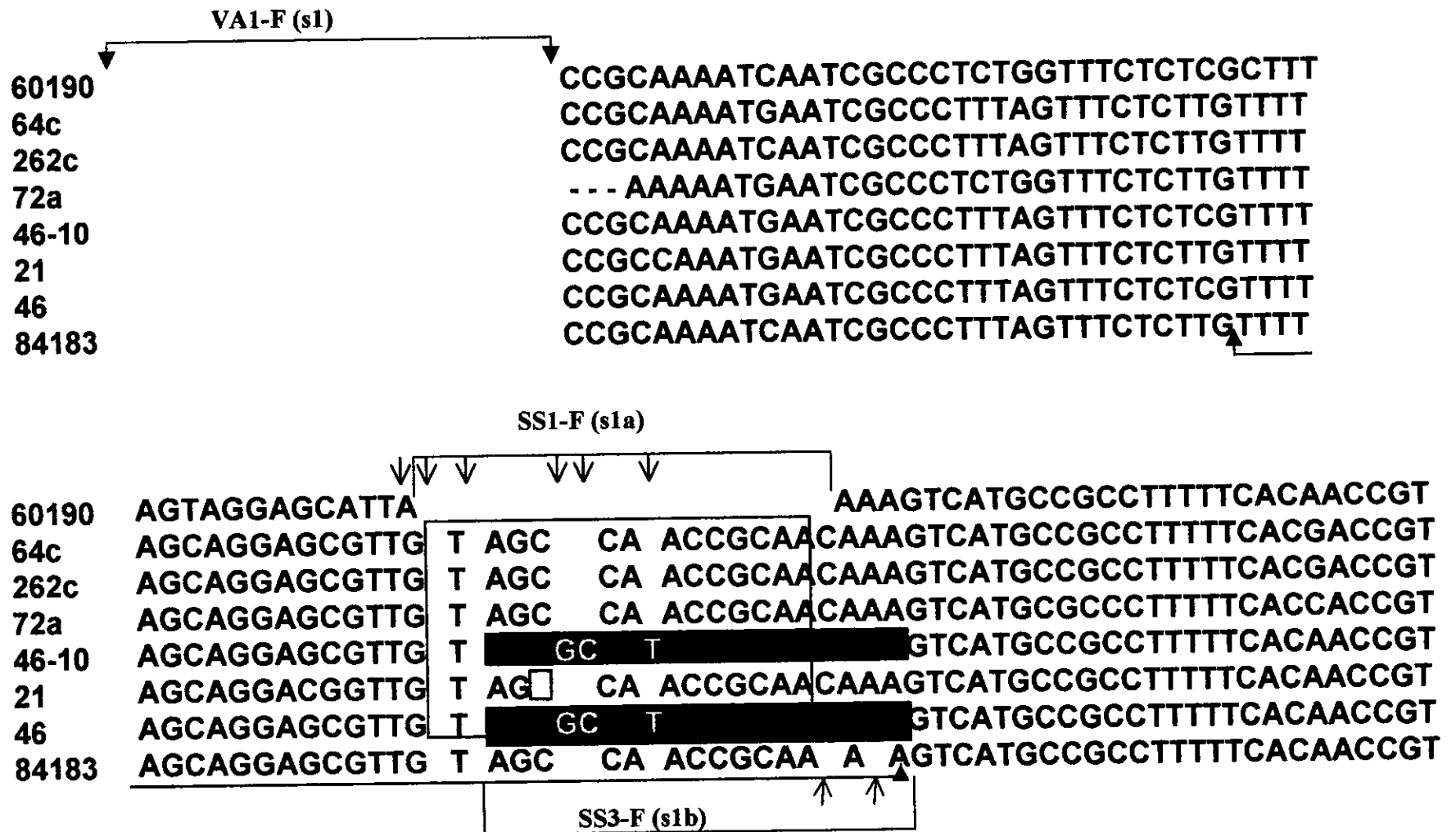
Para estudios de secuenciación se eligieron seis cepas de *H. pylori* tipificadas como s1: dos fueron de pacientes con úlcera péptica (cepa 46-10 y 46); dos de pacientes con úlcera gástrica (64C y 262C); y dos más de pacientes con gastritis (72a, y 21). Otra característica que se consideró fue que presentaran diferente actividad citotóxica de media a sin actividad. Se eligieron dos cepas tipificadas como s2: una cepa fue de un paciente con úlcera gástrica (1C) y otra fue de un paciente con gastritis (128). Además, se secuenciaron tres cepas caracterizadas como región media tipo m1: una cepa de un paciente con úlcera péptica (46M); una de úlcera gástrica (10M) y una más de un paciente con gastritis (21M). Se eligió la cepa 128M de un paciente con gastritis que presentó por PCR amplificaciones de la región media tipo m1 y m2.

Con la secuencia de nucleótidos (reportada previamente) para la cepa de *H. pylori* 60138 se diseñó el iniciador RME (reverso) posición 1124-1141 pb, que se utilizó con el iniciador CYSS^{4,23}(tabla 9) y se amplificó un fragmento de 623 pb que comprende toda la región de secuencia señal. Además, se usaron los iniciadores vacM-F y vacM-R^{4,23} (tabla 9) para amplificar un fragmento de 706 pb que comprende a la región media del gen *vacA*.

Los productos de PCR de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos fueron preparadas para secuenciación usando el protocolo de Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ABI PRISM™ BIG DYE™ (PE Applied Biosystems) y secuenciadas en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 373.

La alineación de la secuencias se hizo junto a las cepas tipo ATCC11638 (secuencia señal tipo s1a); 84-183 (tipo s1b) y Tx30 (tipo s2) y el análisis se llevó a cabo con el programa PRIMER (figura 9).

Figura 9. Alineación parcial de nucleótidos de la región secuencia señal de seis cepas mexicanas de *Helicobacter pylori* y cepas de referencia 11638 y 84183



Las flechas indican las sustituciones de bases presentes en el sitio de complementaridad para los iniciadores que caracterizan a las familias secuencia señal tipo s1a (cepa 60190) y tipo s1b (cepa 84183) del gen vacA.

4.6 Análisis de secuencias de nucleótidos de la secuencia señal del gen *vacA* de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos

El análisis de la secuencia de nucleótidos de las cepas mexicanas tipo s1 con la cepa ATCC 60190, mostró una similitud de 88.61% a 93.16%.

La mayoría de las cepas mexicanas presentan en el extremo 5' de la región secuencia señal del gen *vacA*, una región homóloga de 36 pb con la cepa de referencia 84-183. Sin embargo se observó que nuestras cepas presentan varias sustituciones de bases en el sitio de reconocimiento de los iniciadores específicos: SS1-F (secuencia referida de la cepa tipo de *H. pylori* ATCC 11638), SS3-F (cepa 84-183) y SS2-F (cepa Tx30a) (tabla1), que caracterizan a las familias s1a, s1b y s2, respectivamente (figura 9).

De las cepas mexicanas parecidas al genotipo s1, cinco de ellas (las cepas 64C, 262C, 72a, 46-10, y 46) presentaron 5 sustituciones de bases de nucleótidos de; G, C, A, T y C por A, T, G, C y T, respectivamente. La cepa 21 presentó 6 sustituciones de bases; G, C, C, A, T y C por A, T, T, G, C y T, respectivamente, al sitio complementario de la secuencia del iniciador específico SS1-F que caracteriza a la familia secuencia señal tipo s1a (figura 10).

Además, las cepas 64C, 262C, 72a, 46-10 y 46 mostraron 2 sustituciones de bases de G y G por C y A, respectivamente y la cepa 21 presentó una sustitución más, de C por T hacia el extremo 5' en relación a la complementaridad de las secuencias del iniciador SS3-F que caracteriza la familia secuencia señal tipo s1b (figura 11).

Figura 10. Sustituciones de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS1-F que caracteriza la secuencia señal tipo s1a del gen *vacA* de *H. pylori*

cepa									
60190	CATTA								AAAGTC
64C	C	TT	T	AGC	CA	ACCGCAACAAAGTC			
262C	C	TT	T	AGC	CA	ACCGCAACAAAGTC			
72a	C	TT	T	AGC	CA	ACCGCAACAAAGTC			
46-10	C	TT	T	AGC	CA	ACCGCAACAAAGTC			
21		TT	T	AG	CA	ACCGCAACAAAGTC			
46		TT	T	AGC	CA	ACCGCAACAAAGTC			

Figura 11. Sustituciones de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS3-F que caracteriza la secuencia señal tipo s1b del gen *vacA* de *H. pylori*

cepa			
84-183	CGTTGATT		GTC
64C	CGTTGATTAGCGCCATACCGCAA	A	AGTC
262C	CGTTGATTAGCGCCATACCGCAA	A	AGTC
72a	CGTTGATTAGCGCCATACCGCAA	A	AGTC
46-10	CGTTGATTAGCGCCATACCGCAA	A	AGTC
21	GTTGATTAG	GCCATACCGCAA	A AGTC
46	CGTTGATTAGCGCCATACCGCAA	A	AGTC

La alineación de las secuencias tipo s2 de las cepas mexicanas, determinó una identidad entre el 93.70% al 95.19% con respecto a la cepa de *H. pylori* Tx30a. La cepa 1C presentó en el sitio de complementariedad de la secuencia del iniciador SS2-F dos sustituciones de bases de C y T por T y C, respectivamente, una de las sustituciones se localizó hacia el extremo 3' y la otra en la parte media de las secuencias del iniciador. Finalmente, la cepa 128 presentó sólo una sustitución de base de T por C (figura 12).

4.7 Análisis de las secuencias de nucleótidos de la región media del gen *vacA* de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos.

El análisis de las secuencias de la región media de las cepas mexicanas de *H. pylori*: 46M, 21M y 10M similares al genotipo m1 mostraron una identidad entre el 96.33% al 98.27% con respecto a la cepa ATCC11638 (figura 13). El análisis de la cepa 128M (que amplificó por PCR ambas regiones m1 y m2), presentó una homología del 67.19% con respecto a la cepa ATCC 11638 (m1), y del 84.35% con respecto a las cepas ATCC 87203 y Tx30a (m2) (figura 13).

Dos de las cepas mexicanas tipo m1 (46M y 10M) presentaron una sustitución de base de G por A en relación a la secuencia del iniciador VA3-F que caracteriza a este tipo de familia (figura 13).

La cepa 128 presentó 11 sustituciones de bases de G, G, G, T C, A, A, T G, G y T por A, A, A, C A, G, C, C, A, A y G, en relación a la secuencia del iniciador VA3-F (forward) (figura 13) y. Además, presentó 4 sustituciones de bases de G, A, G y T por A, G, A y C, con

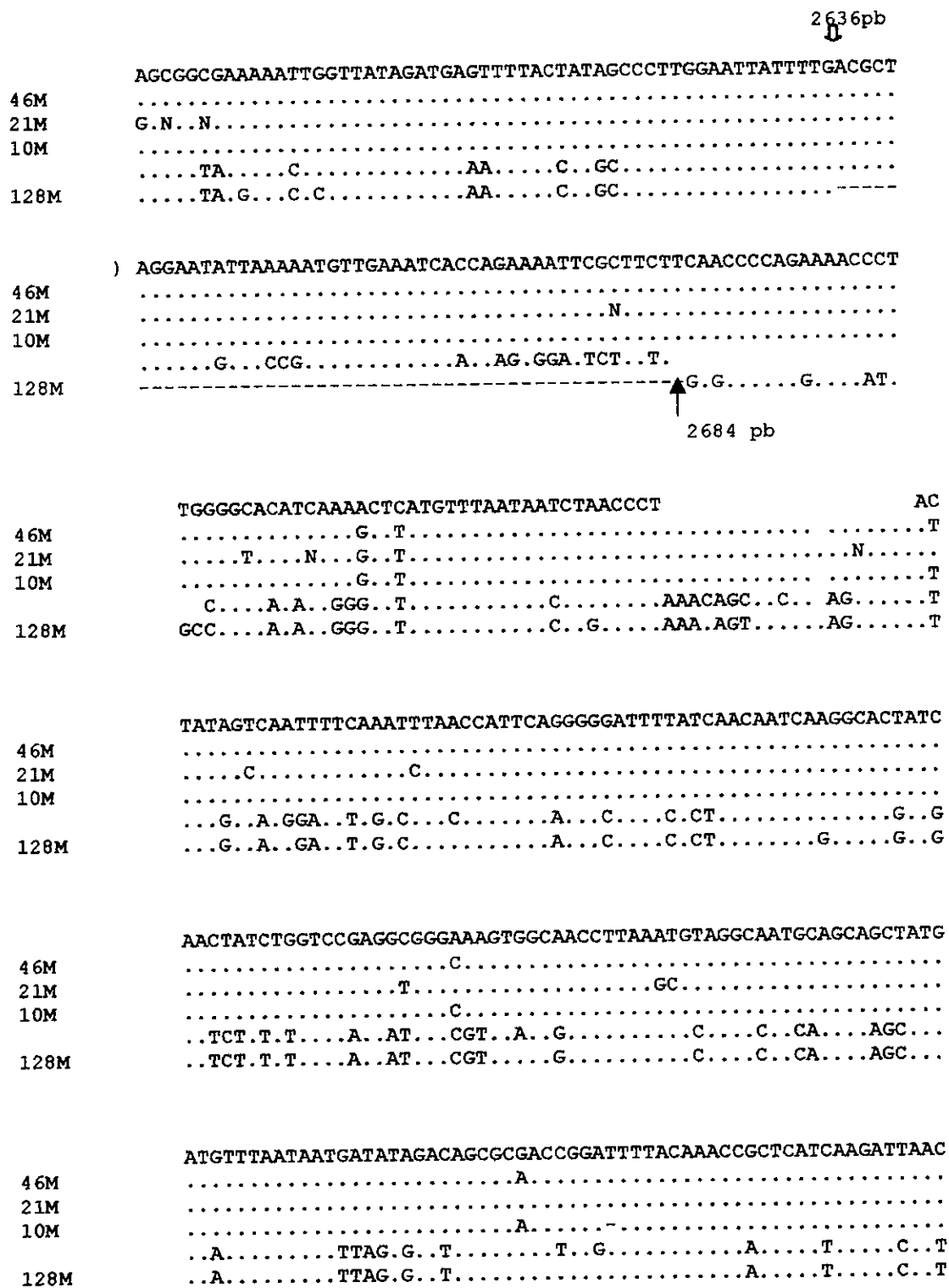
Figura 12. Sustituciones de nucleótidos en el sitio de complementaridad para el iniciador SS2-F que caracteriza la secuencia señal tipo s2 del gen *vacA* de *H. pylori*

cepa

84-183

```
AGCGCCATAC . . . . . CGCAACAAAGT
GGCACCGAACTGGGG                      CCATA
GGCACCGAACTAGGGGCTAACACGCCAAA  GATCCATA
GGCACCGAACTAGGGGCTAA  ACGCCAAA  GATCCATA
```

Figura 13. Alineación de nucleótidos de la región media del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* de 4 cepas mexicanas y de dos cepas de referencia la 60190 y 87203.



```

AGCGCTCAAGATCTCATTAAAAATACAGAGCATGTTTTATTGAAAGCGAAAATCATG--
46M      ..T.....
21M      .....A.....
10M      ..T.....
128M     .A.....A.....C.....A..A.....G.....G.CG..A.....AT
         .A.....A.C....C.....A..A.....G.....CG..A.....AT

```

```

-----GTTATGGTAAT-----
46M      -----
21M      -----
10M      -----
128M     ) TATAATTTAGTGGGAGTGCAAGGCGCTA.....AC...A.....G..A.C.ACA.....
         TATAATTTAGTGGGAGTGCAAGGCGCTA.....A.TC.A.....G..A.C.ACA.....

```

```

46M      .-.
21M      ---
10M      .-.
87203 (m2) CT.
128M     ---

```

La cepa 128 presenta una delección de 48 pb (posición del 2636 al 26849) en relación con las demás cepas. Los iniciadores específicos para caracterizar por familia m1 (VA3F y VA3R) y m2 (VA4F) la región media del gen *vacA* y sus secuencias se escribieron en color rojo.

una inserción de tres bases (A, C y A) con respecto a la secuencias del iniciador VA3-R (reverso), que caracterizan la región media tipo m1 del gen *vacA* de *H. pylori* (cepa tipo ATCC 11638) (Figura 13).

Al comparar las secuencias de esta misma cepa (128) con cepas tipo m2 (Tx30a y 87203), se observó la pérdida de una base (G) al inicio de las secuencias en el sitio para el iniciador VA4-F con respecto a ambas cepas tipo 87203 y TX30a (figura 14). Además, el análisis de la secuencia de nucleótidos de la región media de esta cepa, mostró una mutación que comprende una delección de 48 pb, que va del nucleótido 2636 al 2684 con relación a la región media de las cepas estudiadas y de las cepas de referencia 60190, 87203 y TX30a (figuras 13 y 14).

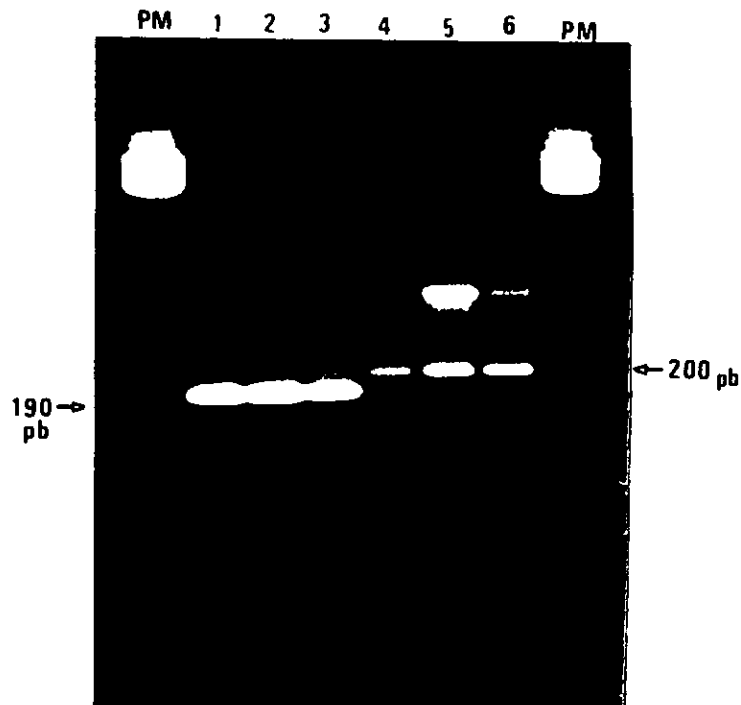
4.8 Caracterización de una nueva familia de la secuencia señal del gen *vacA* de *H. pylori* denominada tipo **s1d**.

Con el análisis de las secuencias de nucleótidos de la región secuencia señal de las cepas *H. pylori* aisladas en México, se diseñó un nuevo iniciador denominado SS5-F (forward) (5' ATT AGC GCC.ATA CCG CAA C 3') posición 866-1055 (figura 9), con el fin de usarlo, para completar la caracterización de la secuencia señal de las cepas que no fueron caracterizadas con los iniciadores específicos propuestos por Atherton⁴.

Con el uso del nuevo iniciador SS5-F y el iniciador VA1-R se amplificó por PCR una región de aproximadamente 190 pb (tabla 1). Las cuarenta y seis cepas mexicanas (11.5%) no caracterizadas con los iniciadores específicos, pudieron ser caracterizadas como una

nueva familia secuencia señal, denominada secuencia señal tipo s1d (figura 15). Las condiciones para amplificación por PCR, fueron las mismas que se utilizaron para la caracterización de las otras familias de la secuencia señal del gen *vacA*.

Figura 15. Tipificación por PCR de la secuencia señal tipo s1d del gen *vacA* de *H. pylori* en cepas mexicanas.



Las primeras tres bandas corresponden a amplificaciones hechas a partir de DNA de cepas con los iniciadores SS5-F (forward) y VA1-R (producto de amplificación de 190 pb).

Las segundas tres bandas corresponden a amplificaciones hechas a partir de DNA de biopsias con los mismos iniciadores (producto de amplificación de 200 pb).

Las bandas de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 123 pb.

DISCUSIÓN

Este estudio muestra el perfil de los genotipos, basados en el gen que codifica para la citotoxina vacuolizante (*vacA*) de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad ácido péptica en México. El primer hallazgo fue la descripción de la infección múltiple por *H. pylori* en la mayoría de los pacientes estudiados. Este hallazgo se apoya en la amplificación de más de un tipo de secuencia señal (s1a,s1b y s2) y de más de una región media (m1 y m2), a partir de reacciones de PCR con iniciadores específicos del cultivo primario de biopsias obtenidas del antro y del cuerpo de 20 pacientes.

Existen reportes a nivel mundial ^{43,51,65,92,95} que documentan la existencia de infecciones múltiples, sin embargo, es un fenómeno poco frecuente. Como lo evidencian los diferentes trabajos hechos por Van Doorn y col. que investigaron la distribución geográfica de los alelos de *vacA* en cepas aisladas de diferentes países del mundo, mediante el estudio por el método de hibridación reversa (PCR-LiPA) de 735 cultivos de *H. pylori* provenientes de 24 países^{92,93,94} concluyendo que el 16.9% de los cultivos presentaron genotipos múltiples de *vacA*. Sin embargo, la prevalencia de cultivos con múltiples alelos de *vacA* fue variable entre los países, encontrando infección múltiple con cepas de genotipos diferentes en el 10.6% de los cultivos aislados de pacientes del norte de Europa, Francia e Italia; en el 44.5% de los cultivos de pacientes de Portugal y en el 23.8% de los cultivos de pacientes de América del Sur (Perú, Brasil y Colombia). Los autores describen el fenómeno de infección múltiple con la detección de diferentes genotipos de *vacA* a partir del cultivo primario en un sólo paciente, pero no seleccionan colonias individuales ni determinan la proporción de genotipos de *vacA* en la población de *H. pylori* que está infectando al paciente.

Otros autores como Strobel y col.⁸⁵ en Alemania caracterizan por PCR e iniciadores específicos las familias de ambas regiones del gen *vacA* de 158 cepas de *H. pylori* procedentes de 106 pacientes con úlcera duodenal y de 52 pacientes con gastritis, reportando sólo a un paciente con úlcera duodenal con infección múltiple en antro y en cuerpo, por cepas con más de un tipo de secuencia señal (s1a y s2), pero solo un tipo de región media (m2). Mukhopadhyay y col.⁶⁵ en Calcuta, India estudiaron a 78 pacientes; 55 pacientes con úlcera péptica y de 23 pacientes con gastritis, caracterizando las cepas por diferentes métodos moleculares tales como: RAPD, detección de la isla de patogenicidad-*cag* y la genotipificación del gen *vacA*. La existencia de infección múltiple se determinó en 14 pacientes por RAPD; en otros 11 pacientes por la detección de cepas con y sin la isla de patogenicidad-*cag* y en 4 pacientes con la presencia de cepas con genotipos de *vacA* s1 y s2. Sin embargo, no se realizó la caracterización por familias s1a y s1b, ni se encontró asociación del genotipo con úlcera péptica, pero sí se halló una clara asociación de las cepas tipo s1 con la presencia de la isla de patogenicidad *cagA*.

Otros trabajos documentan la infección múltiple con base en la caracterización del gen *cagA* por PCR e iniciadores específicos, por hibridación de colonias y por *southern blot* con sondas específicas.^{7a,91a,99} Estos trabajos reportan pacientes colonizados con cepas de *H. pylori* *cag*- y *cag*+. Finalmente otras evidencias de infección múltiple están basadas en los diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana a metronidazol, reportándose que en algunos paciente se identifican cepas sensibles y cepas resistentes a este antimicrobiano, en un mismo cultivo^{41a}.

A diferencia de la menor frecuencia de infección múltiple documentada en trabajos previamente citados, en el presente estudio se encontró que el 60% de nuestros pacientes presentaron infección múltiple con cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA*, sugiriendo que en la población estudiada en México, la infección múltiple sea común. A partir de este hallazgo y con la exposición de los primeros reportes presentados en congresos nacionales e internacionales por nuestro grupo, otros investigadores en nuestro país, como el de González y col (Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI), realizaron la caracterización individual de colonias aisladas del cultivo primario de cada uno de sus pacientes en estudio, encontrando que de su población de niños y adultos, el 95% de los pacientes con úlcera duodenal, el 37% con gastritis y el 52% de niños con dolor abdominal crónico recurrente, presentaron infección con cepas de genotipos de *vacA* diferentes (comunicación personal). Este fenómeno de infección múltiple en pacientes mexicanos observado por nuestro grupo, parece ser un fenómeno que ocurre frecuentemente. Un factor de riesgo probablemente importante sea la edad de los pacientes, como es el caso de nuestra población de estudio, donde los pacientes tienen un intervalo de edad entre los 40 y 80 años que presentan probablemente colonización crónica por *H. pylori*, permitiendo a la bacteria tener variaciones genéticas por recombinación u otros mecanismos dando origen a otros genotipos, o bien que estos pacientes hallan estado expuestos a infecciones por tipos de cepas diferentes a lo largo de su vida. A diferencia de otros

En éste estudios, se caracterizaron los cultivos primarios de *H. pylori* y las colonias individuales aisladas a partir de los cultivos primarios de cada paciente, para la identificación de las familias de las regiones del gen *vacA* por PCR y los iniciadores específicos propuestos por Atherton y col.⁴ La caracterización de los cultivos primarios y de las colonias individuales aisladas en nuestra población nos permitió: determinar la frecuencia real de infección múltiple

por genotipos diferentes de *vacA*, conocer que alelos de *vacA* se encuentran infectando a nuestros pacientes y conocer la proporción de cada uno de los genotipos de *vacA* de las cepas de *H. pylori* que están infectando a los pacientes.

Además, con la caracterización individual de las colonias por PCR se encontraron cepas de *H. pylori* que no pudieron ser caracterizadas en una o ambas regiones del gen *vacA*, lo que indicó que estas cepas presentaban mayor diversidad en su secuencia de nucleótidos en ambas regiones del gen que codifica para la citotoxina vacuolizante y que no habían sido descritas. Con base en los hallazgos reportados anteriormente se expone la conveniencia de caracterizar cierto número de colonias individuales (por lo menos 10 colonias por paciente) en poblaciones como la nuestra, para determinar la frecuencia de infección por cepas múltiples.

El hecho que no existan más trabajos que reporten la infección múltiple con *H. pylori* de genotipos diferentes de *vacA*, se debe probablemente a que: (i) la mayoría de los autores trabajaron con una colonia procedente del cultivo primario y se aduce como representativa de la infección, infiriendo que para un estómago una cepa, como fue previamente descrito por Blaser y col^{11,12,20} quienes no realizan la caracterización de colonias individuales; (ii) o que los métodos empleados para determinar la variación alélica del gen *vacA* no sean los adecuados por la baja sensibilidad del mismo; tal es el caso de los estudios realizados por Van Doorn y col⁹⁴ que utilizó el método de hibridación reversa utilizando el DNA del cultivo primario donde probablemente sólo sean detectados los genotipos con mayor número de copias, ignorando a las colonias que no pueden ser caracterizadas con este método; (iii) o que la historia de la infección por *H. pylori* sea diferente en países desarrollados, con respecto a los países en vías de desarrollo, ya que está documentado que los factores de

riesgo como el nivel socio-económico, las prácticas de higiene, el hacinamiento, el tabaquismo, el consumo alto de sal en la dieta, entre otros ^{7,8,15,17,51}, así como también, factores del huésped como la predisposición genética, el tipo de complejo mayor de histocompatibilidad y el tipo de antígeno Lewis,^{1,1a,2} etc., influyen en la infección y determinan el desarrollo de la enfermedad; (iii) por último, se deben realizar estudios en poblaciones de países como el nuestro para explicar la alta frecuencia de infección múltiple y cuáles son los factores de riesgos que nos predisponen a este fenómeno y que probablemente determinen el desarrollo del cuadro clínico.

La razón por que la infección múltiple fue más frecuente en pacientes mexicanos, no es clara. La coexistencia de cepas con genotipo diferente de *vacA* en pacientes adultos, pudiera explicarse porque, durante su niñez estos individuos fueron infectados por un tipo de cepa y que la persistencia del microorganismo en la mucosa del estómago, incluso por muchos años, ha propiciado rearrreglos genéticos, ^{8,19,50,51,51a,60,92,93} que han favorecido una mayor diversidad de genotipos de *vacA* como un proceso de adaptación natural al huésped y a su medio; o alternativamente que desde el inicio de la infección la población de *H. pylori* ha sido diversa, explicando su interacción de diferentes maneras. Primero, que cepas de *H. pylori* de genotipos diferentes de *vacA* en una misma población no tengan competencia entre ellas, permitiendo la libre sobrevivencia de todas las cepas con genotipo diferente. Segundo, que algunas cepas con determinados genotipos puedan conferir ventajas sobre otras, favoreciendo el predominio de un tipo de cepa en la población o en un nicho ecológico determinado. Tercero, que la interacción de cepas de genotipos diferentes en una población favorezca un sinergismo entre ellas, determinando el desarrollo de la enfermedad. Cuarto, que se presente una reinfección continua con cepas de genotipo diferente a lo largo de la vida.

La consideración de coexistencia e infección múltiple, puede tener implicaciones clínicas y epidemiológicas importantes; una de ellas sería predecir el pronóstico del paciente dependiendo del genotipo de la cepa o cepas que se encuentran colonizando la mucosa gástrica. Atherton y col⁷. señalan que el tipo de secuencia señal (s1a >s1b) del gen *vacA* es responsable del grado de inflamación (infiltración de neutrofilos y de linfocitos) en mucosa gástrica y el tipo de región media (m1) es responsable del daño a el tejido epitelial (degeneración epitelial, depleción de moco y erosiones microscópicas en el tejido).^{3,6,7} En un estudio realizado en Estados Unidos se encontró que el 90% de los pacientes con úlcera duodenal tuvieron cepas tipo s1, donde los pacientes infectados con cepas tipo s1a de *vacA* presentaron mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica que pacientes con cepas tipo s1b y mucho menos probable cuando presentaron cepas s2, las que se aislaron en mayor frecuencia de pacientes asintomáticos. De igual manera, otros estudios realizados en Alemania, el Reino Unido y Holanda han reportado que los pacientes con úlcera péptica tuvieron cepas tipo s1 y que las cepas tipo s2 fueron raras en estas poblaciones. En general hasta ahora, los resultados obtenidos sugieren que las cepas tipo s2 de *vacA* no son ulcerogénicas o tienen una participación mínima en el desarrollo de la úlcera péptica, a diferencia de las cepas tipo s1a.

Probablemente la distinción entre cepas tipo s1a y tipo s1b puede ser principalmente académica: ya que en términos prácticos todas las cepas tipo s1 son potencialmente ulcerogénicas. Sin embargo, el principal problema con la tipificación de *vacA* es que los métodos moleculares usados como; PCR e hibridación con sondas específicas de DNA son usualmente realizados en investigación. Quizás la detección de anticuerpos contra la toxina es más simple pero su relevancia no es clara, ya que la producción de anticuerpos no

correlaciona bien con la actividad *in vitro* de la toxina producida por la cepa infectante y su relación con los genotipos de *vacA* es desconocida.

Otra implicación importante es el éxito del tratamiento del paciente con infección múltiple. Se ha reportado que las cepas tipo s1/m1 son más sensibles a la terapia con antibióticos, por estar más expuestas a éste, en un tejido con mayor grado de inflamación y depleción de la capa de moco gástrico, donde el antibiótico puede alcanzar mayor concentración. Por el contrario, las cepas tipo s2/m2 son más resistentes al tratamiento, evento que no es claro, probablemente por encontrarse en un nicho ecológico casi normal, donde la capa de moco esta casi intacta.⁹⁵

A pesar del gran número de publicaciones relacionadas a la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la erradicación de la infección por *H. pylori*, aún continúan interrogantes importantes, como son, (i) diferenciar oportunamente la reinfección de la ineficacia de la erradicación de la infección por cepas resistentes y (ii) si se debería de considerar el diagnóstico y el tratamiento de los miembros de la familia ya que frecuentemente el tratamiento es personal y se omite investigar a otros miembros de la familia que pudieran presenten síntomas similares. Es claro que la participación de la familia del enfermo en la transmisión vertical es un factor de riesgo importante para perpetuar la infección.

En cuanto a la distribución de los genotipos *vacA*, el genotipo secuencia señal s1b de *H. pylori* estuvo presente en el 80% de los pacientes estudiados, el genotipo s2 en el 45% de éstos y el genotipo s1a en el 10%. Nuestros hallazgos son comparables con los reportados en otros países de América Latina, como son: Costa Rica, Colombia y Perú⁹² donde el genotipo predominante fue s1b con el 98.6%, mientras que ninguno de ellos reportó cepas

con el genotipo s1a. Estudios realizados en Portugal y España^{92,93} han reportado resultados similares, donde las cepas con el genotipo s1b fueron aisladas más frecuentemente en el 88.7%, a diferencia del genotipo s1a con el 11.3%.

En contraste con estudios de otras poblaciones con características étnicas diferentes, como son la anglosajona y la asiática⁹², el genotipo predominante ha sido s1a para anglosajona y el tipo s1c para la asiática con un 78.6% y un 77.1%, respectivamente. Los resultados anteriores sugieren una distribución de genotipos por región geográfica y por raza étnica. Una posible explicación sobre la distribución de genotipos de *vacA* en las poblaciones y áreas geográficas diferentes sería; que la infección esta relacionada con una cepa ancestral que ha afectado a poblaciones con antecedentes históricos, genéticos, socioeconómicos y culturales comunes. Esta hipótesis se apoya con los trabajos realizados por Kersulyte y col.⁵¹ y por Van Doorn y col.⁹² quienes realizaron la caracterización de los genes *cagA* y *vacA* por secuenciación y por PCR con iniciadores específicos, además de la caracterización por secuenciación de una región de DNA localizada en el extremo 3' de la isla de patogenicidad *cag* de 500 cepas de *H. pylori* procedentes de España, Perú, Guatemala, África, Louisiana, Missouri, Ohio, Tennessee, China, Hong Kong, Japón, Calcuta, Suecia y Lituania. Las secuencias de nucleótidos del gen *cagA* y el genotipo m1 de *vacA* de las cepas de *H. pylori* de los pacientes de Perú tuvieron una alta homología con las cepas de los pacientes de España, no así con las cepas de pacientes de Asia y del norte de Europa. Lo anterior sugirió que las cepas de *H. pylori* fueron diseminadas del continente Europeo hacia el continente Americano a partir de su descubrimiento.

Lo que sugiere que esta cepa ancestral (de un solo genotipo) a través del tiempo bajo presiones haya originado genotipos diversos, como el resultado de adaptaciones a un huésped con características y medio ambiente particulares.

Además, en este trabajo, se ha mostrado que las cepas de *H. pylori* aisladas del grupo de estudio son más diversas en la región secuencia señal y en la región media del gen *vacA*. Esto lo señala el análisis de secuencia de nucleótidos y la falta de caracterización de alelos de *vacA* con los iniciadores específicos para cada región (previamente descritos) ⁴; además de la detección por primera vez del genotipo s2/m1.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas mexicanas no caracterizadas en la secuencia señal y en la región media del gen *vacA*, mostraron varias sustituciones en los sitios de reconocimiento para los iniciadores específicos para una o ambas regiones, razón que nos explica la falta de amplificación con los iniciadores propuestos por Atherton ⁴, mostrando la variación genética por la sustitución de bases, probablemente en el proceso de recombinación, que sugiere la existencia de expansión clonal en poblaciones de *H. pylori*. Estos resultados se apoyan con los de otros investigadores que describen variación genética en el gen *vacA* en sus poblaciones. Strobel y col. ⁸⁵ caracterizó en Alemania 158 aislamientos de *H. pylori*, procedentes de pacientes con úlcera péptica. En el 18% no determinó el tipo de región media con los iniciadores propuestos por Atherton. La secuenciación de esta región en sus cepas reveló varias sustituciones de bases en el sitio de reconocimiento de los iniciadores con relación a las regiones medias tipo m1 y tipo m2, sin embargo estas cepas presentaron una alta homología entre ellas, permitiendo clasificarlas en una nueva subfamilia denominada región media tipo m1a. Por otro lado Van Doorn y col. ⁹³ realizaron un estudio de la expansión en la diversidad alélica del gen *vacA* con el análisis

filogenético de 98 cepas de *H. pylori* provenientes de diferentes partes del mundo, determinando por secuenciación la existencia de una nueva familia de la secuencia señal que denominó s1c. Esta nueva familia muestra homología con fragmentos del tipo s1a y del tipo s1b considerándola una recombinante de estos dos subtipos que estuvo presente casi exclusivamente en pacientes del Este de Asia. Además, el análisis de la región media de estas cepas, reveló dentro de la familia tipo m2 un nuevo subtipo designado m2b.

En el caso de las cepas mexicanas, nuestros resultados mostraron que el 11.5% de las cepas no fueron caracterizadas en la región secuencia señal y el 2.75% en la región media utilizando los iniciadores propuestos por Atherton ⁴. El análisis de secuencia de nucleótidos de la región secuencia señal de las cepas mexicanas no tipificadas en esta región mostró, sustituciones de bases en el sitio de reconocimiento de los iniciadores específicos para las familias s1a, s1b, s1c y s2 permitiendo agrupar a nuestras cepas de *H. pylori* en un nuevo tipo de familia de secuencia señal la que se designó s1d.

El análisis de secuencia de la región media mostró que la mayoría de las cepas presentan una alta homología con las cepas tipo m1. Sin embargo, una cepa tipo m2 presentó una delección de 48 pares de bases (que involucran a 16 aa) en la región media con respecto a la cepas de referencia Tx30a y 87-203. Contrariamente a lo reportado por Ji y col.⁴⁹ quienes reportan que las cepas tipo m2, presentan una inserción de 21 aa, que no presentan las cepas tipo m1 en su región media que es lo que determina la diferencia fenotípica (actividad vacuolizante) entre ellas.

Con la delección presente en la región media tipo m2 del gen *vacA* de nuestra cepa (128) no podría aclarar si hay o no alguna implicación fenotípica que repercuta de alguna

manera con la actividad, pues la delección se encuentra fuera de la región reportada como importante para la actividad citotóxica.

Ultimamente, Pagliaccia y col. han reportado que la falta de actividad de la citotoxina vacuolizante de las cepas tipo m2 en células HeLa, es por falta de expresión de receptores específicos para el tipo de citotoxina en ésta línea celular y no debido a que la citotoxina carezca de actividad. Cuando se inoculó la citotoxina tipo m2 en la línea celular RK13 se observó efecto vacuolizante, semejante a la citotoxina de las cepas tipo m1^{69a}, sugiriendo que la actividad citotóxica es específica del receptor expresado en las células. Sin embargo, se desconoce cual es el receptor específico para cada tipo de citotoxina vacuolizante y en que tipo de célula esta presente. Si esto es cierto, el conocer el receptor específico nos permitiría determinar que tipo de epitelio además del epitelio gástrico sería propicio para la colonización de *H. pylori* y su posible asociación con otras enfermedades.

La mayoría de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de *H. pylori* con el genotipo s1b/m1 presentaron actividad citotóxica media en los ensayos con células HeLa. Estos resultados fueron comparables a lo descrito previamente⁴, donde se asocia los genotipos tipo s1b/m1, s1b/m2 y s1a/m2 a media y baja actividad citotóxica vacuolizante. Los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de *H. pylori* con el genotipo s2/m2 no presentaron actividad vacuolizante, resultados comparables con estudios previos⁴.

Sin embargo en nuestro estudio, hubo tres sobrenadantes de cepas con genotipo s1b/m1 y dos de cepas con genotipo s2/m2, que presentaron alta actividad citotóxica, contrario a lo mencionado anteriormente. No sabríamos explicar claramente porque los sobrenadantes de cepas de estos genotipos (s1b/m1 y s2/m2) de *H. pylori* aisladas de

nuestros pacientes presentaron actividad alta, ó porque hubo dos sobrenadantes de cepas s1b/m1 que no presentaron actividad citotóxica, probablemente estas cepas en sus secuencias de nucleótidos del gen *vacA* presenten sustituciones que originen una proteína con actividad diferente a la esperada

Estudios posteriores deberán de realizarse con la finalidad de determinar la secuenciación completa del gen *vacA* de cada una de las cepas mexicanas de *Helicobacter pylori*, y deducir la secuencia de aminoácidos y determinar con técnicas moleculares los aa importantes involucrados en la actividad vacuolizante. Generar una proteína no citotóxica capaz de reconocer receptores e inducir la respuesta inmune que neutralice la actividad citotóxica vacuolizante de las cepas de *H. pylori* más frecuentes en nuestra población.

La ausencia de asociación entre el genotipo de las cepas con la actividad citotóxica y el cuadro clínico del paciente, sugiere que más de un factor de virulencia está involucrado en el desarrollo de enfermedad además, que debe de considerarse a otros factores de riesgo del huésped y del ambiente.

Debido a la alta frecuencia de infección múltiple por cepas de *H. pylori* con genotipos diferentes en algunos pacientes, medidas preventivas deberían de tener mayor atención. Deberá de considerarse el desarrollo de una vacuna efectiva contra factores específicos de patogenicidad, como es la citotoxina vacuolizante, que tiene actividades biológicas diversas e importante en la patología de la úlcera péptica y participa en el desarrollo de enfermedades más graves, como el adenocarcinoma y linfoma gástrico. En términos de vacunación, además, se requiere de un inmunógeno polivalente que otorgue protección por un período prolongado (quizás años), ya que probablemente en nuestro medio la infección múltiple por *H*

pylori es debido a exposiciones constantes a lo largo de la vida con cepas de genotipos diferentes.

CONCLUSIONES.

La infección múltiple con cepas de *H. pylori* de diversos genotipos de *vacA* fue evidenciada con la caracterización de colonias individuales de cada uno de los pacientes estudiados.

Con base a los resultados obtenidos podemos decir que en un individuo coexisten cepas de diferente genotipo y que la hipótesis de “ una cepa un estómago” es nula.

La distribución de los genotipos de *vacA* en los tres grupos de pacientes: úlcera péptica, úlcera gástrica y gastritis, no presentó diferencias significativas.

El genotipo de *vacA* más predominante en nuestros tres grupos de estudio fue s1b/m1 seguido de s1b/m2, s2/m2 y muy raramente el genotipo s1a/m1. Por primera vez se detectó el genotipo s2/m1.

La actividad citotóxica vacuolizante de las cepas aisladas de los pacientes fue variable, no se encontró asociación entre el genotipo de *vacA* ni el cuadro clínico del paciente.

Algunas cepas de *H. pylori* del genotipo s1b/m1 mostraron actividad citotóxica diversa, aunque en mayor frecuencia estas cepas mostraron actividad citotóxica media. Además 2 cepas con genotipo s2/m2 presentaron actividad citotóxica alta.

La falta de caracterización como s1a, s1b, s2, m1 y m2 del gen *vacA* en algunas cepas de *H. pylori*, fue debido a la presencia de sustituciones de nucleótidos en el sitio complementario de la secuencia del iniciador específico para cada una de las familias.

Se caracterizó y determinó una nueva secuencia señal del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, que se denominó s1d.

A diferencia de la secuencia señal de las cepas mexicanas, en la región media se encontró menos sustituciones de nucleótidos en la secuencia de bases en el sitio de complementariedad para los iniciadores específicos que caracterizan las familias m1 y m2.

PERSPECTIVAS

Deberá de determinarse si la infección múltiple y la heterogenicidad entre las cepas que infectan a un individuo son o no son factores de riesgo para determinar el desarrollo o severidad de la enfermedad.

Deberá de estudiarse con el uso de diversas técnicas moleculares (DGGE, TTGE, RFLP, secuenciación, mutaciones dirigidas etc.) el gen completo para establecer una clasificación del gen *vacA* diferente a la propuesta por Atherton, que nos permita asociar la variabilidad de éste gen con la actividad vacuolizante de las cepas, probando líneas celulares con diferente sensibilidad para la citotoxina. y encontrar su asociación con el cuadro clínico.

Estudiar si la infección múltiple y la heterogenicidad entre las cepas que infectan a un mismo paciente es por infecciones independientes o por recombinaciones de las cepas a través del tiempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Aspinall GO, Monteiro MA. Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* Strains P466 and MO19: Structures of the O antigen and Core Oligosaccharide Strains. *Biochemistry*. 35: 2498-2504, 1996.
- 1a. Abdulhamid M, Alkout M, Blackwell CC, Weir DM. Increased Inflammatory Responses of Persons of Blood Group O to *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*. 181: 1364-1369, 2000.
2. Aspinall GO, Monteiro MA, Pang H, Walsh EJ, Moran AP. O Antigen Chains in the Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Carbohydr. Lett*. 1: 151-156, 1994.
3. Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Cover TI, Blaser MJ. Density of *Helicobacter pylori* Infection In Vivo as Assessed by Quantitative Culture and Histology. *J Infect Dis*. 174: 552-556, 1996.
4. Atherton J, Cao P, Peek R, Tummuru M, Blaser M, Cover T. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 270: 17771-17777, 1995.
5. Atherton J, Cover T, Twells R, Morales MR, Hawkey C, Blaser M. Simple and Accurate PCR-Based System for Typing Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 37: 2979-2982, 1999.
6. Atherton J, Peek R, Tham K, Cover T, Blaser M. Clinical and Pathological Importance of Heterogeneity In *vacA*, The Vacuolating Cytotoxin Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*. 112: 92-99, 1997.
7. Atherton JC. The Clinical Relevance of Strains Types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 40:701-703, 1997.
- 7a. Akopyants NS, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA Diversity Among Clinical isolates of *Helicobacter pylori* Detected by PCR-based Rapid Fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 20: 5137-5142, 1992.
8. Berg D, Hoffman P, Appelmelk B, Kusters J. The *Helicobacter pylori* Genome Sequence: Genetic Factors for Long Life in the Gastric Mucosa. *Trends Microbiol* 5: 468-473, 1997.
9. Bernard A, Papini E, Filoppis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C. Low pH Activates The Vacuolating Toxin of *Helicobacter pylori*, which Becomes Acid and Pepsin Resistant. *J Biol Chem*. 270: 23937-23940, 1995.
10. Blaser M, Perez-Perez G, Kleanthous H, Cover T, Peek R, Chyou P, Stemmermann G, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* Strains Possessing *cagA* is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Res*. 55: 2111-2115, 1995.
11. Blaser JM. *Helicobacter pylori*. *Princ and Pract Inf Dis*. Update 9: 3-9, 1991.

12. Blaser JM. *Helicobacter pylori* : Its Role in Disease. Clin Infect Dis 15: 386-393, 1992.
13. Burroni D, Lupetti P, Pagliaccia C, Reytrat JM, Dallai R, Rappuoli R, Telford JL. Deletion of the Major Proteolytic Site of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin Does Not Influence Toxin Activity but Favors Assembly of the Toxin into Hexameric Structures. Infect Imm. 66: 5547-5550, 1998.
14. Catrenich C, Chestnut M. Character and Origin of Vacuoles Induced in Mammalian Cells by the Cytotoxin of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 37: 389-395, 1992.
15. Cave DR. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. How Is *Helicobacter pylori* Transmitted?. Gastroenterology. 113: S9-S14. 1997.
16. Cecini S, Lange C, Xiang Z, Cabtree JE, Giara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori*, Encodes Type I-Specific and Disease-Associated Virulence Factors. Proc Natl Acad Sci USA. 93: 14648-14653, 1996.
17. Correa P. A Human Model of Gastric Carcinogenesis. Cancer Res 48: 3554-3360, 1988.
18. Covacci A, Censini S, Bugnoli M. Molecular Characterization of the 128-kDa Immunodominant Antigen of *Helicobacter pylori* Associated with Citotoxicity and Duodenal Ulcer. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 5791-5795, 1993.
19. Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: Molecular Evolution of a Bacterial Quasi-species. Curr Opin Microbiol. 1: 96-102, 1998.
20. Cover T, Blaser M. *Helicobacter pylori* : A Bacteria Cause of Gastritis, Peptic Ulcer Disease and Gastric Cancer. Asm News. 61: 21-26, 1995.
21. Cover T, Blaser M. Purification and Characterization of the Vacuolating Toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol chem.. 267: 10570-10575, 1992.
22. Cover T, C Dooley, M Blaser. Characterization and Human Serologic Response to Proteins in *Helicobacter pylori* Broth Culture Supernatants with Vacuolating Cytotoxin Activity. Infect Immun. 58: 603-616, 1990.
23. Cover T, Cao P, Murthy U, Sipple M, Blaser M. Serum Neutralizing Antibody Response to the Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* . J Clin Inves Inc. 90: 913-918, 1992.
24. Cover T, Glupczynski Y, Lage A, Burette A, Tummuru Mr, Perez-Perez G, Blaser M. Serologic Detection of Infection with *cagA* + *Helicobacter pylori* Strains. J Clin Microbiol. 33:1496-1500, 1995.
25. Cover T, Hanson P, Heuser J. Acid-Induced Dissociation of VacA, The *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin, Reveals Its Pattern of Assembly. J Cell Biol 138: 759-769, 1997.
26. Cover T, Reddy L, Blaser M. Effects of ATPase Inhibitors on the Response of HeLa Cells to *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin. Infect Imm 61: 1427-1431, 1993

27. Cover T, Tummuru M, Cao P, Stuart A, Blaser M. Divergence of Genetic Sequences for the Vacuolating Cytotoxin among *Helicobacter pylori* Strains, J Biol Chem. 269 :10566-10573, 1994.
28. Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Effect of Urease on HeLa Cell Vacuolation Induced by *Helicobacter pylori* Cytotoxin. Infec Immun. 59: 1264-1270. 1991.
29. Cover TL, Vaughn SG, Cao P, Blaser MJ. Potentiation of *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Activity by Nicotine and Other Weak Bases. J Infect Dis 166: 1073-1078, 1992.
30. Dobois A, Berg DE, Incecik ET, Fiala N, Heman-Ackah LM, Perez-Perez GI. Transient and Persistent Infection of Nonhuman Primates with *Helicobacter pylori* : Implications for Human Disease. Infect Immun. 64: 2885-2891, 1996.
31. Dunn B, Campbell G, Perez-Perez G, Blaser M. Purification and Characterization of Urease from *Helicobacter pylori* . J Biol Chem . 265: 9464-9468, 1990.
32. Eaton KA, Cover TL, Tummuru MKR, Blaser MJ, Krakowka S. Role of Vacuolating Cytotoxin in Gastritis Due to *Helicobacter pylori* in Gnotobiotic Piglets. Infec Imm. 65: 3462-3464. 1997.
33. Evans D, Queiroz D, Mendes E, Evans Jr D. *Helicobacter pylori* CagA Status and s and m Alleles of VacA in Isolates from Individuals with a Variety of *H. pylori*. Associated Gastric Diseases. J Clin Microbiol. 36: 3435-3437, 1998.
- 33a. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and Ethnic Differences in *Helicobacter pylori* Infection among Adults in the Unites States. J Infect Dis. 181: 1359-1363, 2000.
34. Figura N, Guglielimiti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno R, Russi M, Quaranta S. Cytotoxin Production by *Campylobacter pylori* Strains Isolated from Patients with Peptic Ulcers and Patients with Chronic Gastritis Only. J Clin Microbiol. 27: 222-226, 1989.
35. Foreman D, Sitas F, Newell D, Stacey A, Boreham J, Peto R, Campbell T, Li J, Chen J. Geographic Association of *Helicobacter pylori* Antibody Prevalence and Gastric Cancer Mortality in Rural China. Int J Cancer. 4: 608-611, 1990.
36. Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E, Janney F, Sobhan M, Ruiz B, Hunter F. High Prevalence and Persistence of Cytotoxin-Positive *Helicobacter pylori* Strains in a Population with High Prevalence of Atrophic Gastritis. Am J Gastroenterol. 87: 1554-1560. 1992.
37. Garner J, Cover T. Analysis of Genetic Diversity in Cytotoxin-Producing and Non-Cytotxin-Producing *Helicobacter pylori* Strains. J Infect Dis. 172:290-293, 1995.
38. Garner J, Cover T. Binding and Internalization of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin by Epithelial Cells. Infect Imm. 64: 4197-4203, 1996.

39. Ge Z, Taylor D, Contributions of Genome Sequencing to Understanding the Biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol.* 53:355-387, 1999.
40. Ge Z, Taylor D. *Helicobacter pylori*-Molecular Genetic and Diagnostic Typing. *British Medical Bol* 54: 31-38, 1998.
41. Goodwin C, Armstrong J, Peters M. Microbiology of *Campylobacter pylori*. in: Blaser M, Ed. *Campylobacter pylori* in Gastritis and Peptic Ulcer Disease. New York: Igaku Shoin Medical Publishers; 1989: 25-49.
- 41a. Graham DY, de Boer WA, Tytgat GN. Choosing the Best Anti- *Helicobacter pylori* Therapy: Effect of Antimicrobial Resistance. *Am J Gastroenterol.* 91: 1072-1076, 1996.
42. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J, Halperin D. The Association of *Helicobacter pylori* with Gastric Cancer and Preneoplastic Gastric Lesions in Chiapas Mexico. *Cancer* 71: 297-301, 1993.
43. Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, Loos M, Maeurer M. *vacA* Genotypes and Genetic Diversity in Clinical Isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagnos Lab Immun.* 5: 139-145, 1998.
44. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity Island of Virulent Bacterial. Structure, Function and Impact on Microbial Evolution. *Molecular Microbiol* 23: 1089-1097, 1997.
45. Harris PR, Cover TL, Crowe DR, Orenstein JM, Graham MF, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* Cytotoxin Induces Vacuolation of Primary Human Mucosal Epithelial Cell. *Infec Immun.* 64: 4867-4871, 1996.
46. Hawrylik S J, Wasilkp D J, Haskell S L, Gootz T D, Lee E S. Bisulfite or Sulfite Inhibits Growth of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 32: 790—792. 1994.
47. Ito Y, Azuma T, Ito S, Miyaji H, Hirai M, Yamazaki Y, Sato F, Kato T, Kohli Y, Kuriyama M. Analysis and Typing of the *vacA* Gene from *cagA*-Positive Strains Of *Helicobacter pylori* Isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 35: 1710-1714 , 1994.
48. Ito Y, Ito T, Ito S, Suto. H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kholi Y, Kuriyama M. Full-Length Sequence Analysis of *vacA* Gene from Cytotoxic and Noncytotoxic *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 178: 1391-8.1998.
49. Ji X, Fernandez T, Burroni D, Pagliaccia C, Atherton JC. Reyrat JM, Rappuoli R, Telford JL. Cell Specificity of *Helicobacter pylori* Cytotoxin Is Determined by a Short Region in the Polymorphic Midregion. *Infect Imm* 68: 3754-57, 2000.
50. Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor D. Variability of Gene Order in Different *Helicobacter pylori* Strains Contributes to Genome Diversity. *Mol Microbiol.* 20: 833-842, 1996.
51. Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatiño B, Su W, Pan Z, García C, Hernández V, Valdez Y, Mistry R.S, Gilman R H, Yuan Y, Gao H, Alarcón T, López Brea M, Nair BG,

- Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BCY, Lam S.K, Olfat FO, Borén T, Engstrand L, Torres O, Schneider R. Differences in Genotypes of *Helicobacter pylori* from Different Human Populations. *J Bacteriology* 182: 3210-3218, 2000.
- 51a. Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of Recombinant Strains of *Helicobacter pylori* During Human Infection. *Molecular Microbiol.* 31: 31-43, 1999.
52. Kobayashi K, Sakamoto J, Kito T, Yamamura Y, Koshikawa T, Fujita M, Watanabe T, Nakazato H. Lewis Blood Group-related Antigen Expression in Normal Gastric Epithelium, Intestinal Metaplasia, Gastric Adenoma, and Gastric Carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 88: 919-924, 1993.
53. Kuipers E.J, Israel D.A, Kusters J.G, Gerrits M.M, Weel J, Van der Ende A, Vander Hulst R. W.M, Wirth H.P, Hook-Nikanne J, Thompson S.A, Blaser M.J. Quasispecies Development of *Helicobacter pylori* Observed in Paired Isolates Obtained Years Apart from the Same Host. *J Infect Dis* 181: 273-82.2000.
54. Lanzavecchia S, Bellon PL. Three-Dimensional Reconstruction of Metal Replicas of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *J Struct Biol.* 121: 9-18, 1998.
55. Leunk R, P Johnson, B David, W Kraft, Dr Morgan . Cytotoxic Activity in Broth-Culture Filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 26: 93-99, 1988.
56. Lupetti P, Heuser J, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PI, Dallai R, Rappuoli, Telford J. Oligomeric and Subunit Structure of *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *J Cell Biol.* 133: 801-807, 1996.
57. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Funai F, Ikenoue T, Kato N, Shiratoni Y, Omata M. Major Virulence Factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* 42: 338-343, 1998.
58. Mai UEH, Perez-Perez GI, Allen JB, Eahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Surface Proteins from *Helicobacter pylori* Exhibit Chemotactic Activity for Human Leukocytes and Are Present in Gastric Mucosa. *J Exp Med.* 175: 517-525, 1992.
59. Manetti R, Massari P, Burrioni D, De Bernard M, Marchini A, Olivieri R, Papani E, Montecucco A, Rappuoli R, Telford J. *Helicobacter pylori* Cytotoxin: Importance of Native Conformation for Induction of Neutralizing Antibodies. *Infect Imm.* 63: 4476-4480, 1995.
60. Marshall DG, Dundon WG, Beesley SM, Smyth C J. *Helicobacter pylori* a Conundrum of Genetic Diversity. *Microbiol.* 144: 2925-2939, 1998.
61. Massari P, Manetti R, Burrioni D, Nuti S, Norais N, Rappuoli R, Telford J. Binding of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin to Target Cells. *Infect Imm.* 66: 3981-3984, 1998.

62. Miehlike S, Kibler K, Kim JG, Figura N, Small SM, Graham D, Go MF. Allelic Variation in the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori* Obtained from Korea Compared to the United States. *Am J Gastroenterol* 91: 1322-1325, 1996.
63. Miehlike S, Meining A, Morgner A, Bayerdörffer E, Lehn N, Stolte M, Graham D, Y, Go M.F. Frequency of *vacA* Genotypes and Cytotoxin Activity in *Helicobacter pylori* Associated with Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *J Clinical Microbiology* 36: 2369-70, 1998.
64. Moll G, Papini E, Colonna R, Burrioni D, Telford J, Rappuoli R, Montecucco C. Lipid Interaction of the 37-kDa and 58-kDa Fragments of The *Helicobacter pylori* Cytotoxin. *Eur J Biochem.* 234: 947-952, 1995.
65. Mukhopadhyay A, Kersulyte D, Jeong J-Y, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya S.K, Azuma T, Balakrish Nair G, Berg D.E. Distinctiveness of Genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J. Bacteriology* 182: 3219-27, 2000.
66. Negrini R, Lisato L, Zanella F, Cavazzini L, Gullini S, Villanacci V, Poiesi C, Albertini A, Ghielmi. *Helicobacter pylori* Infection Induced Antibodies Cross Reacting with Human Gastric Mucosa. *Gastroenterology.* 101: 437-439, 1991.
67. Nomura A, Stemmarmann G, Chyan P, Perez-Perez G, Blaser M. *Helicobacter pylori* Infection and Risk for Duodenal and Gastric Ulceration. *Ann Intern Med.* 120: 977-981, 1994.
68. Ogura K, Kanai F, Maeda S, Yoshida H, Ogura M, Lan Kh, Hirota K, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. High Prevalence of Cytotoxin Positive *Helicobacter pylori* in Patients Unrelated to the Presence of Peptic Ulcer in Japan. *Gut* 41: 463-468, 1997.
69. Pai R, Cover TL, Tarnawski AS. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin (VacA) Disorganizes the Cytoskeletal Architecture of Gastric Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 262:245-250. 1999.
- 69a. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji, Cover TL, Papini F, Rappuoli R, Telford JL, Reytrat JM. The m2 Form of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin Has Cell Type-Specific Vacuolating Activity. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* 95: 10212-10217, 1998.
70. Pan Z, van der Hulst R, Su WM, Feller M, Xiao S, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Equally High Prevalence of Infection With *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese Patients With Peptic Ulcer Diseases and Those With Chronic Gastritis-associated Dyspepsia. *J Clin Microbiol.* 35: 1344-1347, 1997
71. Pan Z, Berg D E, van der Hulst R, Su W, Raudonikiene A, Xiao S, Dankert J, Tytgat G N, Ende A. Prevalence of Vacuolating Cytotoxin Production and Distribution of Distinct *vacA* Alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis.* 178: 1-7, 1998
72. Papini E, Bernard M, Milia E, Bugnoli A, Zerial M, Rappuoli R, Montecucco C. Cellular Vacuoles Induced by *Helicobacter pylori* Originate from Late Endosomal Compartments. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 91: 9720-9724, 1994.

73. Papini E, Gottardi E, Satin B, Bernard M, Massari P, Telford J, Rappuoli R, Sato SB, Montecucco C. The Vacuolar ATPase Proton Pump is Present on Intracellular Vacuoles Induced by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 45: 84-89, 1996.
74. Papini E, Satin B, Bucci C, Bernard M, Telford J, Manetti R, Rappuoli R, Zerial M, Montecucco C. The Small GTP Binding Protein rab7 is Essential for Cellular Vacuolation Induced by *Helicobacter pylori* Cytotoxin. Embo J. 16: 15-24, 1997.
75. Parkin D, E Laara, C Muir . Estimates of the World Wide Frequency of Sixteen Major Cancer in 1980. Int J Cancer. 41: 184-197, 1988.
76. Peek R Jr, Miller G, Tham K, Perez-Perez G, Cover T, Atherton J, Dunn G Blaser M. Detection of *Helicobacter pylori* Gene Expression in Human Gastric Mucosa. J Clin Microbiol. 33: 28-32, 1995.
77. Pelicic V, Reyrat JM, Sartori L, Pagliaccia C, Rappuoli R, Telford JL, Montecucco C, Papini E. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with bacteria increases apithelial permeability independently of its vacuolating activity. Microbiol. 145:2043-2050. 1999.
78. Perez-Perez G, Dworkin B, Blaser M. *Campylobacter pylori* Antibodies in Humans. Ann Intern Med. 109: 11-17, 1988.
79. Perez-Perez G, Olivares A, Cover T, Blaser M. Characteristic of *Helicobacter pylori* Variants Selected for Urease Defficiency. 60: 3658-3663, 1992.
80. Phadnis S, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom T. Pathological Significance and Molecular Characterization of The Vacuolating Toxin Gene of *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 62: 1557-1565, 1994.
- 80a. Reyrat J-M, Pelicic V, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford JL. Towards Deciphering the *Helicobacter pylori* Cytotoxin. Molecular Microbiol. 34: 197-204, 1999.
81. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA Genes and Relationship to VacA and Protein Expression, Cytotoxin Production, and Associated Diseases. J Clin Microbiol. 36: 944-948, 1998.
82. Schmitt W, Haas R. Genetic Analysis of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxic: Structural Similarities with the IgA Protease Type of Exported Protein. Mol Microbiol. 12: 307-319, 1994.
83. Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H. Vacuolation Induce by Cytotoxin from *Helicobacter pylori* is Mediated by the EGF Receptor in HeLa Cell. FEBS Lett 431: 347-350, 1998.
84. Shimiyama T, Fukuda 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 32: 465-468, 1997.

85. Strobel S, Bereswill S, Balig P, Allgaier P, Sonntag HG, Kist M. Identification and Analysis of a New *vacA* Genotype Variant of *Helicobacter pylori* in Different Patient Groups in Germany. *J Clin Microbiol.* 36: 1285-1289, 1998.
86. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of Anion-Selective Channels in the Cell Plasma Membrane by the Toxin *VacA* of *Helicobacter pylori* is Required for Its Biological Activity. *The EMBO J.* 18: 5517-5527. 1999.
87. 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 Ulcer or Non-Ulcer Dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 93: 30-34. 1998.
88. Telford J, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrioni D, Bugnoli M. Gene Structure of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin and Evidence of Its Key Role in Gastric Disease. *J Exp Med* 179: 1653-1658, 1994.
89. Tombola F, Carlesso C, Szabo I, Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Forms Anion-Selective Channels in Planar Lipid Bilayers: Possible Implications for the Mechanism of Cellular Vacuolation. *Biophys J.* 76: 1401-1409. 1999.
90. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *J Infect Dis.* 178: 1089-1094, 1998.
91. Tummuru M, T Cover, M Blaser. Cloning and Expression of High Molecular Weight Major Antigen of *Helicobacter pylori* : Evidence of Linkage to Cytotoxin Production. *Infect Immun.* 61: 1799-1809, 1993.
- 91a. van der Ende A, Rauws EAJ, Feller M, Mulder Cjj, Tytgat GNJ, Dankert J. Heterogeneous *Helicobacter pylori* Isolates from Members of a Family with a History of Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology.* 111: 638-647, 1996.
92. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DMM, Carneiro F, vanderborcht B, Pegado MDGF, Sanna R, Boer W, Schneeberger PM, Correa P, Enders KWNG, Atherton J, Blaser MJ, Quint WGV. Geographic Distribution of *vacA* Allelic Types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 116: 823-830, 1999.
93. van Doorn LJ, Figueiredo C, Cannar, Pena S, Midolop, W, , Atherton J, Blaser M, Quint W. Expanding Allelic Diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol.* 36:2597-2603,1998.
94. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WGV. Typing of *Helicobacter pylori vacA* Genes and Detection of *cagA* Gene by PCR and Reverse Hybridization. *J Clin Microbiol.* 36: 1271-1276, 1998.

95. van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WGV, De Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *VacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*. 46:321-326, 2000.
96. Wang H, Kuo C, Yeh A, Chang P, Wang W. Vacuolating Toxin Production in Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* with Different *vacA* Genotypes. *J Infect Dis*. 178: 207-212, 1998.
97. Wang HJ, Chang PCL, Kuo CH, Tzeng CS, Wnag WC. Characterization of the C-terminal Domain of *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Its Relationship with Extracellular Toxin Production. *Biochem Biophys Res Commun*. 250: 397-402. 1998.
98. Warren JR. The Discovery and Pathology of *Helicobacter pylori*. In Xth Int. Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*: The Logic of Eradication. P.7-13, 1997 Lisboa-Portugal.
99. Weel Jfl. van der Hulst Rwm, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GNI, van der Ende A. The Interrelationship between Cytotoxin-Associated Gene A, Vacuolating Cytotoxin. And *Helicobacter pylori*-Related Diseases. *J Infect Dis*. 173: 1171-1175, 1998.
100. Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Padilla PI, Wada A, Hirayama T. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Binds to the 140-kDa Protein in Human Gastric Cancer Cell Lines AZ-521 and AGS. *Bioch Biophys Res* 238: 629-632, 1997.
101. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Different *H. pylori*-Associated Diseases. *J Clin Microbiol*. 36: 2258-2263, 1998.
102. Yang JC, Wang TH, Wang HJ, Kuo CH, Wang JT, Wang WC. Genetic Analysis of the Cytotoxin-Associated Gene and the Vacuolating Toxin Gene in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Taiwanese Patients. *Am J Gastroenterol*. 92:1316-1321, 1997.
103. Ye D, Willhite C, Blanke SR. Identification of the Minimal Intracellular Vacuolating Domain of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin. *J Biol Chemis*. 274: 9277-9282. 1999.

Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes

ROSARIO MORALES-ESPINOSA,¹ GONZALO CASTILLO-ROJAS,¹ GERARDO GONZALEZ-VALENCIA,¹
SERGIO PONCE DE LEÓN,² ALEJANDRO CRAVIOTO,¹ JOHN C. ATHERTON,³
AND YOLANDA LÓPEZ-VIDAL^{1*}

Department of Microbiology & Parasitology, Faculty of Medicine, UNAM,¹ and Nutrition National Institute "Salvador Zubirán,"² Mexico City, Mexico, and Division of Gastroenterology and Institute of Infections and Immunity, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom³

Received 4 January 1999/Returned for modification 16 March 1999/Accepted 7 June 1999

Helicobacter pylori virulence determinants have not previously been studied in detail in Latin Americans with *H. pylori* infections. We characterized the *vacA* (vacuolating cytotoxin gene A) and *cagA* (cytotoxin-associated gene A) types of more than 400 single-colony isolates from 20 patients in Mexico City. For 17 patients *H. pylori* strains of two or more different *vacA* genotypes were isolated from gastric biopsy specimens, indicating infection with two or more strains of *H. pylori*. The most frequent *vacA* genotype was s1b/m1. *vacA* diversity was more marked than that described previously, in that isolates from seven patients had untypeable *vacA* midregions and isolates from nine patients had type s1 signal sequence coding regions which could not be further subtyped. Previously undescribed *vacA* type s2/m1 strains were found in five patients. All patients were infected with *cagA*-positive strains, but occasionally, these coexisted with small numbers of *cagA*-negative strains. In conclusion, coinfection with multiple *H. pylori* strains is common in Mexico, and *vacA* in these strains is genetically more diverse than has been described in other populations.

Helicobacter pylori infection is the main cause of duodenal and gastric ulceration (4, 25, 27) and is an important risk factor for the development of distal gastric adenocarcinoma and gastric lymphoma (9, 28). However, most people infected with *H. pylori* do not develop these conditions in their lifetimes. One factor that affects who develops disease is bacterial virulence. Two bacterial virulence determinants linked with disease are the possession of a pathogenicity island, for which the gene *cagA* (cytotoxin-associated gene A) is a marker (5, 6, 12), and production of a cytotoxin which induces vacuolation of cultured epithelial cell in vitro (10, 14, 18, 23, 29). Although all *H. pylori* strains possess the gene encoding the cytotoxin, *vacA*, only about 40% of U.S. strains express HeLa cell vacuolating activity in vitro (7, 32). Analysis of *vacA* from different U.S. strains shows that alleles differ, particularly in their midregions, and these alleles may be one of two types (m1 or m2). The alleles in their signal sequence regions also differ, and there may be one of three types (s1a, s1b, or s2). All combinations of *vacA* signal sequence and midregion allele types have been described except s2/m1 (2). In a U.S. study, the *vacA* genotype was associated with cytotoxin activity in vitro (s1a > s1b > s2 and m1 > m2) and with peptic ulceration (s1a > s1b or s2) (2, 3). Other preliminary studies have supported the finding that *vacA* s2 strains are rarely associated with ulcers but have also found that such strains are uncommon in many populations (17, 20).

In this study, we aimed to assess the *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori* strains infecting Mexican patients. It quickly became apparent that these patients were infected with multiple strains with different *vacA* genotypes. In this paper we describe in detail the *vacA* and *cagA* genotypes of the multiple strains infecting Mexican patients and the vacuolating activities

of pooled groups of strains from each patient. Also, we describe strains which cannot be adequately typed by the published PCR-based system and, for the first time, strains with the *vacA* s2/m1 genotype.

MATERIALS AND METHODS

Patient characteristics and gastric biopsy specimen collection. We obtained gastric biopsy specimens from 20 unselected *H. pylori*-infected patients (median age, 54 years; age range, 30 to 66 years) undergoing upper gastrointestinal endoscopy at Hospital de Alta Especialidad de Petroleos Mexicanos, Mexico City, Mexico; 6 of these patients had duodenal ulceration, 6 had gastric ulceration, and 8 had nonulcer dyspepsia. From each patient, one biopsy specimen from each of the gastric antrum and the corpus was placed immediately in Stuart's (16) medium and was transported to the laboratory within 3 h. A second biopsy specimen from each site was placed in 10% formalin saline for later histological examination. This was processed routinely, and adjacent sections were stained with hematoxylin and eosin and a modified Giemsa stain. Between endoscopies, endoscopes and biopsy forceps were cleaned thoroughly with detergent, disinfected by submersion in ethanol for 20 min, and then rinsed in sterile water. Ethical approval for the study was obtained from the South Central Hospital Ethical Committee, and all patients gave written informed consent to participate in the study.

***H. pylori* culture and chromosomal DNA extraction.** *H. pylori* was cultured by smearing biopsy specimens on the surfaces of horse blood agar plates (10% horse blood in Casman agar base [BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.]), which were incubated in 5% oxygen–10% carbon dioxide for 72 h at 37°C for up to 5 days (16, 30). The antral and corpus biopsy specimens were studied separately. Typical colonies were identified as *H. pylori* by morphology following Gram staining (gram-negative spiral or curved rods) and biochemical testing (positive urease, oxidase, and catalase tests). The rest of the colonies were harvested into three batches with a sterile cotton swab. Batch 1 (25% of total colonies) was used for DNA extraction as described previously (1), and this is referred to as the "multiple-colony sample." Batches 2 (25% of colonies) and 3 (50% of colonies) were stored at –70°C in 1.5 ml of brucella broth (BBL Microbiology Systems) with 10% fetal calf serum and 15% glycerol until use. Batch 2 was used for later assessment of vacuolating cytotoxin activity, as described below. Batch 3 was later thawed and recultured on blood agar plates as described above. Between 9 and 12 colonies were picked separately from these plates and were then passed onto individual plates. Chromosomal DNA was extracted from these "single-colony isolates" as described above. Great care was taken at all times not to cross-contaminate samples.

***vacA* and *cagA* genotyping by specific PCR amplification.** The *vacA* signal sequence and midregion were typed by allelic type-specific PCR as described previously (2). In brief, each strain was typed as *vacA* signal region type s1a, s1b,

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology & Parasitology, Faculty of Medicine, Avenida Universidad 3000, Copilco-Universidad, CP. 04510 Mexico City, Mexico. Phone: (525) 616-0844. Fax: (525) 603-2416*51. E-mail: lvidal@servidor.unam.mx.

or s2 by performing three separate PCR assays, each with a different allelic type-specific forward primer (based on the difference in the region encoding the second half of the *vacA* signal sequence) and a common reverse primer. As a check, each strain was also typed with conserved forward and reverse primers designated to amplify a product from all *vacA* alleles, but a larger product was obtained from s2 alleles than from s1a and s1b alleles (the last two alleles cannot be differentiated by this method). Product sizes were differentiated on a 2% agarose gel. The *vacA* midregions were typed as m1 or m2 by performing two separate PCR assays, each with two allelic type-specific primers. Conditions for thermal cycling were 35 cycles of 94°C for 60 s, 52°C for 60 s, and 72°C for 60 s. PCR detection of *cagA* was as described above, except that annealing was at 59°C and a 10-min elongation step was used after the final cycle (22).

Quantitative assessment of vacuolating activity. Stored samples (from batch 2, described above) infected with strains of different *vacA* types (multiple-colony samples) were recultured as described earlier. A swab of multiple colonies was then used to inoculate 25 ml of brucella broth with 10% fetal calf serum. Culture was for 72 h under microaerobic conditions (as described above) with gentle agitation. Culture supernatants were concentrated 40-fold by ultrafiltration as described previously (8, 11). These concentrated culture supernatants were incubated with HeLa cells in twofold serial dilutions from a total of 1:5 to 1:160 as described previously (11, 13, 24). Cells were observed for up to 48 h for the development of vacuoles. The maximum dilution of the sample that produced vacuolation in more than 30% of the HeLa cells was defined as the cytotoxin activity score for a sample. Uninoculated broth was used as a negative control, and broth culture concentrates from strains 60190 (7) and Tx30a (2, 7) were used as positive vacuolating and negative vacuolating controls, respectively.

RESULTS

Histology. *H. pylori* isolates were seen in all antral and all corpus biopsy specimens. All biopsy specimens showed polyphosphonuclear and round cell infiltration.

***vacA* and *cagA* typing of multiple-colony samples.** More than one *vacA* allelic type was identified in 18 of the DNA specimens from the 40 multiple-colony samples and in a total of 13 of 20 patients. For the *vacA* signal region, type s1b alleles were most common and were found in 31 of 40 samples and 16 of 20 patients. Type s2 alleles were found in 12 of 20 samples and 9 of 20 patients, and type s1a alleles were found in both antral and corpus biopsy specimens from 2 of 20 patients (Table 1). In total, 10 of 40 multiple colony samples contained more than one *vacA* signal sequence type and 8 of 20 patients were infected with at least two strains with different *vacA* signal region types. Regarding the *vacA* midregion, type m1 alleles were found in both antral and corpus biopsy specimens from 19 of 20 patients, and type m2 alleles were found in 15 of 40 samples and in 10 of 20 patients. Type m2 alleles were always found with m1 alleles except in one patient whose antrum and corpus were both infected with pure m2 strains. No relationship between *vacA* allelic type and preference for antral or corpus site of gastric colonization was found. No relationship between the sequence of endoscopy and the occurrence of multiple *H. pylori vacA* types was found.

Vacuolating cytotoxin activity of multiple-colony samples. Of the 40 multiple-colony samples assessed for vacuolating cytotoxin activity, broth culture supernatants from 33 caused vacuolation in HeLa cells (Table 1). The seven samples that did not produce vacuolating activity were from five patients infected with strains of different *vacA* types, but all strains had type s2 and/or type m2 *vacA* alleles. Of the 33 cytotoxic samples, supernatants from 4 produced vacuolation in more than 80% of HeLa cells at all dilutions. All four of these samples contained *vacA* s1a or s1b and m1 isolates (Table 1).

***vacA* and *cagA* typing of single-colony isolates.** To try to explain the finding of multiple *vacA* genotypes in single biopsy specimens, we took between 9 and 12 single colonies from both the antrums and the corpora of all 20 patients and typed these single-colony isolates. In 12 of 20 corpus specimens and 14 of 20 antral specimens, we found strains with different *vacA* types, and data for 26 of 40 of these specimens are shown in Table 2. As expected, the single-colony isolates and single *vacA* signal

TABLE 1. *vacA* and *cagA* genotyping and cytotoxic activity based on multiple-colony sweeps from primary culture plates^a

Subject no.	Endoscopic diagnosis	Site	<i>cagA</i> status	<i>vacA</i> allelic type detected		Vacuolating activity titer ^b
				Signal region	Midregion	
1	No ulcer	a	+	s1b	m1, m2	1.3
		c	+	s1b	m1, m2	1.3
2	No ulcer	a	+	s1b	m1, m2	1.3
		c	+	s1b, s2	m1	1.3
3	GU	a	+	s1b	m1, m2	1.6
		c	+	s1b, s2	m1, m2	1.3
4	DU	a	+	s1b, s2	m1, m2	1.3
		c	+	s1b, s2	m1, m2	1.3
5	DU	a	+	s1b, s2	m1	1.6
		c	+	s1b, s2	m1	2.2 ^c
6	DU	a	+	s1b, s2	m1	2.2 ^c
		c	+	s1b	m1	0.7
7	No ulcer	a	+	s1b	m1	2.2 ^c
		c	+	s1b	m1	1.6
8	No ulcer	a	+	s1b	m1	1.3
		c	+	s1b	m1, m2	— ^d
9	DU	a	+	s1b, s2	m1, m2	—
		c	+	s1b	m1	1.3
10	DU	a	+	s1b	m1	0.7
		c	+	s1b	m1	0.7
11	GU	a	+	s1b	m1	1.6
		c	+	s1b	m1	1.6
12	GU	a	+	s1b, s2	m1	—
		c	+	s1b	m1	1.6
13	GU	a	+	s1b	m1, m2	—
		c	+	s1b, s2	m1, m2	—
14	GU	a	+	s1b	m1	1.6
		c	+	s1b	m1	1.6
15	No ulcer	a	+	s1 ^e	m1	1.3
		c	+	s1	m1	1.3
16	No ulcer	a	+	s1b	m1	1.6
		c	+	s1	m1	1.3
17	No ulcer	a	+	s1b	m1	1.9
		c	+	s1b	m1, m2	1.6
18	DU	a	+	s1a	m1	1.3
		c	+	s1a	m1, m2	1.3
19	GU	a	+	s1a	m1	2.2 ^c
		c	+	s1a	m1	1.6
20	No ulcer	a	+	s2	m2	—
		c	+	s2	m2	—

^a Abbreviations: DU, duodenal ulcer; GU, gastric ulcer; a, antrum; c, corpus.

^b Expressed as log₁₀ dilutions of 40-fold-concentrated broth culture supernatants which induced vacuolation in >30% semiconfluent HeLa cells.

^c These samples induced vacuolation in >80% of HeLa cells at all dilutions.

^d —, these samples did not cause HeLa cell vacuolation.

^e When the *vacA* allelic type is designated s1, the s1a and s1b subtypes could not be determined.

TABLE 2. *cagA* and *vacA* genotypes of single-colony isolates from patients with multiple infection^a

Subject no.	Site ^b	No. of colonies tested	No. of <i>cagA</i> -positive colonies	<i>vacA</i> allelic types detected (no. of isolates)
1	a	10	8 ^c	s1b/m1 (8), s1b/m2 (2)
	c	10	10	s1b/m1 (9), s1b/m2 (1)
2	a	9	9	s1b/m1 (5), s1b/m2 (4)
	c	10	9 ^c	s1b/m1 (6), s2/m1 (1), s1 ^d /m1 (2), s1b/m0 ^e (1)
3	a	10	10	s1b/m1 (6), s1b/m2 (2), s1/m1 (2)
	c	10	10	s1b/m1 (7), s2/m1 (2), s1b/m2 (1)
4	a	11	11	s1b/m1 (10), s2/m2 (1)
	c	10	10	s1b/m1 (8), s2/m2 (2)
5	a	10	10	s1b/m1 (9), s2/m1 (1)
	c	11	10 ^f	s1b/m1 (8), s2/m1 (2), s1b/m0 (1)
6	a	11	11	s1b/m1 (7), s2/m1 (3), s1/m1 (1)
8	c	10	10	s1b/m1 (7), s1b/m2 (3)
9	a	10	10	s1b/m1 (6), s1b/m2 (1), s2/m2 (3)
12	a	10	10	s1b/m1 (9), s2/m1 (1)
13	a	10	10	s1b/m1 (8), s1b/m2 (2)
	c	10	10	s1b/m1 (6), s1b/m2 (2), s2/m2 (2)
14	c	10	10	s1b/m1 (8), s1/m1 (2)
15	a	10	10	s1/m1 (9), s1/m0 (1)
16	a	10	10	s1b/m1 (6), s1/m1 (4)
	c	10	8 ^c	s1b/m1 (8), s1/m1 (2)
17	a	10	10	s1b/m1 (8), s1/m1 (1), s1b/m0 (1)
	c	10	10	s1b/m1 (8), s1/m1 (1), s1b/m2 (1)
18	c	10	8 ^c	s1a/m1 (3), s1a/m2 (4), s1/m1 (3)
19	a	12	12	s1a/m1 (7), s1a/m0 (2), s1/m1 (3)
	c	10	10	s1a/m1 (7), s1/m1 (3)
20	a	10	7 ^h	s2/m2 (7), s1/m2 (2), s2/m0 (1)

^a Data for patients or biopsy specimens not infected with strains of multiple type are not included.

^b a, antrum; c, corpus.

^c The *cagA*-negative colonies from these biopsy specimens were *vacA* s1b/m1.

^d When the *vacA* allelic type is designated s1, the s1a and s1b subtypes could not be determined.

^e When the *vacA* allelic type is designated m0, the midregion type could not be determined.

^f The *cagA*-negative colony from this biopsy specimen was *vacA* s2/m1.

^g The *cagA*-negative colonies were *vacA* s1/m1.

^h One *cagA*-negative colony was *vacA* s2/m0 and two were *vacA* s2/m2.

and midregion types, and we assume that they represent single strains. For three patients (patients 7, 10, and 11) colonies of only a single *vacA* signal and midregion type were found in both the antrums and corpora, for three patients colonies of a single type were found in the antrums and mixed colonies were found in the corpora, for five patients mixed colonies were found in the antrums and single *vacA* types were found in the corpora, and for nine patients mixed colonies were found in both the antrums and the corpora. Five patients were infected with strains with the *vacA* s2/m1 genotype, which has not previously been found to occur naturally. By typing single-colony

isolates, we found multiple *vacA* types in five patients in whom this had not been expected from the typing of the multiple-colony samples. Strains which were *vacA* s1 were found in nine patients, but these could not be subtyped as *vacA* s1a or s1b. Strains for which the *vacA* midregion could not be typed as m1 or m2 were found in seven patients. *cagA*-positive strains predominated and were found in both the antrums and corpora of all 20 patients. However, six patients also had low numbers of *cagA*-negative isolates: for four patients in the corpus biopsy specimen and for two patients in the antral biopsy specimen. Overall, infection with two or more strains with different *vacA* genotypes was found in 17 of 20 patients.

DISCUSSION

This paper provides the first detailed description from a developing country of *Helicobacter pylori* typing with the virulence marker genes *vacA* and *cagA*. The first important finding is that single biopsy specimens from Mexican patients are infected with strains of multiple *vacA* types. That our findings were not due to a poor specificity of PCR amplification is confirmed by the finding that single-colony isolates gave single *vacA* signal region and midregion types on every occasion. When biopsy specimens from different gastric sites in the same patient were also considered, all but three of our patients had evidence of infection with two or more strains with different *vacA* genotypes. The methodology that we used will underestimate infections with multiple types of strains, as two biopsy specimens do not adequately sample the whole stomach. Multiple-strain infection is well described in developed countries (15, 19, 21, 26, 31), but it is not clear why it is so much more extensive in Mexican patients. The coexistence of strains with different *vacA* genotypes could be explained in several different ways. First, different *vacA* and *cagA* genotypes might offer no competitive advantage to strains. Second, the different genotypes could confer different advantages that allow the strains to survive in slightly different ecological niches within a gastric biopsy specimen. Finally, multiple continuing infections with strains of different genotypes may be occurring. The final possibility would have important implications for reacquisition of infections after treatment.

In the Mexican context of multiple infections with strains of different *vacA* genotypes, we have shown that there is more diversity in the *vacA* signal and midregions than was described previously (2), in that some strains had *vacA* alleles which were not fully typeable with previously described PCR primers. We also describe, for the first time, alleles with the s2/m1 genotype. This is an important finding, as not being able to find such strains previously had been an argument for clonal expansion of *H. pylori* populations and against the occurrence of recombination between *H. pylori* strains within *vacA* in vivo. The finding of all combinations of the signal sequence and the midregion in *vacA* is much more consistent with the results of multilocus enzyme electrophoresis studies (15), which suggested frequent past recombination between *H. pylori* strains. Recombination within *vacA* may also explain why *vacA* alleles from other strains are not readily typeable, although genetic diversity generated by mutation could explain this equally well.

Analysis of vacuolating cytotoxin activities of the primary cultures of strains of mixed *vacA* types in this study is consistent with the previous description of the different vacuolating activities of strains of different *vacA* genotypes (2, 3). *vacA* s1b/m1 strains are described as having lower vacuolating activity than *vacA* s1a/m1 strains, and the vacuolation in 30 to 80% of HeLa cells described here for most specimens infected with strains of multiple *vacA* types is less than the vacuolation in

>80% described for s1a/m1 strains from the United States (2, 3). Isolates from five patients in this study did not cause vacuolating activity, and all had *vacA* s2 and/or m2 alleles, which have previously been shown to confer little or no vacuolating activity (2). The samples from four patients infected with strains of mixed *vacA* types induced vacuolation in >80% of HeLa cells at all dilutions, and these samples contained s1a or s1b/m1 *vacA* strains, which have previously been shown to be associated with higher levels of cytotoxin activity (2). Heterogeneity between samples in terms of vacuolating activity was evident, but this is to be expected, as there is marked heterogeneity between strains with identical *vacA* genotypes (2), and additionally, the relative contributions of individual strains in these specimens infected with strains of multiple *vacA* types will vary.

This study has important implications for the pathogenesis and clinical management of *H. pylori* infection in Mexico and other developing countries. Studies from the United States that link infection with strains of different *vacA* and *cagA* genotypes with gastroduodenal disease are not directly applicable to populations like that in Mexico, in which infection with multiple strains of different *vacA* and *cagA* genotypes is common. Whether these "virulence markers" have any impact on virulence in this setting remains to be determined. How infections with strains of different genotypes have arisen, in particular, whether they are acquired in childhood or throughout adult life, is also of considerable clinical importance and requires urgent further study. The important implication for treatment would be that antibiotic treatment of *H. pylori* infection would not be an effective clinical strategy in individual patients if they were immediately reinfected with another strain. Furthermore, if vaccines became available, continuing infection in adult life would mean that these would have to provide lifelong protection to be effective and would need to be polyvalent for effective protection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Arturo Ballesteros and Rosa Isabel Amieva-Fernandez for helping with patients and technical support and Gabriela Delgado-Sapien for oligonucleotide synthesis.

This research was funded by grant DGPA IN218698 from Mexico Autonomous National University and CONACYT 27557-M. John C. Atherton was funded by a Clinician Scientist Fellowship from the Medical Research Council of the United Kingdom.

REFERENCES

- Atherton, J. C. 1996. Molecular techniques to detect pathogenic strains of *H. pylori*, p. 133-143. In C. L. Clayton and H. L. T. Mobley (ed.), *Methods in molecular medicine. Helicobacter pylori* protocols. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270:17771-17777.
- Atherton, J. C., R. M. Peek, K. T. Tham, T. L. Cover, and M. J. Blaser. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112:92-99.
- Blaser, M. J. 1991. *Helicobacter pylori*. *Princ. Pract. Infect. Dis. Update* 9:3-9.
- Blaser, M. J., G. I. Pérez-Pérez, H. Kleantous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55:2111-2115.
- Covacci, A., S. Cesini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burrioni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and R. Rappuoli. 1993. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5791-5795.
- Cover, T. L., M. K. R. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 269:10566-10573.
- Cover, T. L., P. Cao, U. K. Murthy, M. S. Sipple, and M. J. Blaser. 1992. Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Invest.* 90:913-918.
- Cover, T. L., and M. J. Blaser. 1995. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *ASM News* 61:21-26.
- Cover, T. L., and M. J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 267:10570-10575.
- Cover, T. L., C. P. Dooley, and M. J. Blaser. 1990. Characterization and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolating cytotoxin activity. *Infect. Immun.* 58:603-616.
- Cover, T. L., Y. Glupczynski, A. P. Lage, A. Burette, M. R. Tummuru, G. I. Pérez-Pérez, and M. J. Blaser. 1995. Serologic detection of infection with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33:1496-1500.
- Figura, N., P. Guglielmetti, A. Rossolini, A. Barberi, G. Cusi, R. A. Musmanno, M. Russi, and S. Quaranta. 1989. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and patients with chronic gastritis only. *J. Clin. Microbiol.* 27:222-226.
- Garner, J. A., and T. L. Cover. 1996. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cell. *Infect. Immun.* 64:4197-4203.
- Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, and J. M. Musser. 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.* 178:3934-3938.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, and M. Peters. 1989. Microbiology of *Campylobacter pylori*, p. 25-49. In M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. Igaku Shoin Medical Publishers, New York, N.Y.
- Han, S. R., H. J. Schreiber, S. Bhak, M. Loos, and M. J. Mæurer. 1998. *vacA* genotypes and diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:139-145.
- Harris, P. R., T. L. Cover, D. R. Crowe, J. M. Orenstein, M. F. Graham, M. J. Blaser, and P. D. Smith. 1996. *Helicobacter pylori* cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* 64:4867-4871.
- Hirschl, A. M., M. Richter, and A. Makrithatis. 1994. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J. Infect. Dis.* 170:473-475.
- Ito, Y., T. Azuma, S. Ito, H. Miyaji, M. Hirai, Y. Yamazaki, F. Sato, T. Kato, Y. Kohli, and M. Kuriyama. 1997. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:1710-1714.
- Jorgensen, M., G. Daskalopoulos, V. Warburton, H. M. Mitchell, and S. L. Hazell. 1996. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. *J. Infect. Dis.* 174:631-635.
- Lage, P. A., E. Godfroid, A. Fauconnier, A. Burette, J. P. Butzler, A. Bollen, and Y. Glupczynski. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:2752-2756.
- Leunk, R. D. 1991. Production of cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev. Infect. Dis.* 13(Suppl.):686-689.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26:93-99.
- Marshall, B. J. 1995. *Helicobacter pylori*. The etiologic agent for peptic ulcer. *JAMA* 274:1064-1066.
- Marshall, D. G., A. Chua, P. W. N. Keeling, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and C. J. Smyth. 1995. Molecular analysis of *Helicobacter pylori* populations in antral biopsies from individual patients using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10:317-324.
- Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, G. I. Pérez-Pérez, and M. J. Blaser. 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann. Intern. Med.* 120:977-981.
- Parkin, D. M., E. Lara, and C. S. Muir. 1988. Estimates of the world wide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer* 41:184-197.
- Phadnis, S. H., D. Iver, L. Janson, S. Normark, and T. U. Westblom. 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62:1557-1565.
- Price, A. B., J. Levi, J. M. Dolby, P. L. Duncombe, A. Smith, J. Clark, and M. L. Stephenson. 1985. *Campylobacter pyloridis* in peptic ulcer disease: microbiology, pathology and scanning electron microscopy. *Gut* 26:1183-1188.
- Taylor, N. S., J. G. Fox, and N. S. Akopyants. 1995. Long-term colonization with single and multiple strain of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 33:918-923.
- Telford, J. L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Comanducci, D. Burrioni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, S. Cesini, A. Covacci, Z. Xiang, E. Papini, C. Montecucco, L. Parente, and R. Rappuoli. 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.