

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Comparación de genes de virulencia entre *Helicobacter pylori* y otras especies de *Helicobacter* en pacientes Ecuatorianos

Favio Roberto Delgado Arcentales

**PhD Antonio Machado
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Maestría de Microbiología

Quito, 05 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO
DE TITULACIÓN

Comparación de genes de virulencia entre *Helicobacter pylori* y otras especies de *Helicobacter* en pacientes Ecuatorianos

Favio Roberto Delgado Arcentales

Firmas

Antonio Machado, PhD

Director del Trabajo de Titulación

Gabriel Trueba Piedrahita, PhD

Miembro del Comité de Tesis

Paul Cárdenas, PhD

Miembro del Comité de Tesis

Hugo Burgos, PhD

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, 05 de diciembre de 2018

© Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombre: Favio Roberto Delgado Arcentales

Código de estudiante: 00131815

C. I.: 1719875781

Lugar, Fecha Quito, 05 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

A mis maestros de vida, mis padres Mónica, Víctor y a mi abuelito César, el esfuerzo fue de ustedes.

A María José Cazares por su amor y empuje

Al Padre de las luces celestes, por todo (Snt 1:17).

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

A mi director de tesis Antonio Machado, Ph.D. por su constante ayuda, paciencia y aporte científico.

A los miembros del tribunal de tesis Gabriel Trueba, Ph.D y Paul Cárdenas, Ph.D quienes han sido mis profesores y me han guiado con su experiencia durante todo este tiempo.

A Pablo Endara, Ph.D, por la guía en el análisis estadístico.

A mis compañeros de investigación por su gran aporte experimental y colaboración: Andrea Dávila, María José Baquero, Mayra Abril y Francisco Canet.

A Daniel Garzón quien ha sido como un hermano para mí.

RESUMEN

Prevalente en más de 4400 millones de personas en el mundo, *H. pylori* es sin duda el principal agente etiológico asociado a gastritis, úlcera gastroduodenal y cáncer gástrico en humanos. Sin embargo, bacterias espirales similares a *H. pylori*, presentes en especies animales, llamadas *Helicobacter no-pylori* (NHPH) se han observado en muestras clínicas humanas. Infecciones con NHPH son acompañadas de erosiones gástricas, úlceras duodenales y gastritis crónica menos severas que la producidas por *H. pylori*. Estudios recientes sugieren que menos del 15% de la población infectada desarrollará complicaciones clínicas y que uno de los elementos que puede explicar estos hallazgos son los factores de virulencia bacterianos encontrados en estas especies. En el presente estudio, se comparó la prevalencia de 7 genes de virulencia: *cagA*, *vacAs1*, *babA2*, *sabA*, *dupA*, *jhp0947* e *iceA1* típicamente encontrados en ciertas cepas de *Helicobacter pylori* y se evaluó en NHPH especies, a través de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La población de estudio estuvo formada por 242 pacientes ecuatorianos con diferentes diagnósticos clínicos, como, por ejemplo, gastritis aguda, gastritis crónica, cáncer gástrico y problemas digestivos agrupados como dispepsia. Como esperado según la literatura científica, se evidenció una mayor prevalencia de *H. pylori* (58.3%) con relación a NHPH (31.4%) y no se observó asociaciones significativas de estos microorganismos a los diagnósticos clínicos reportados. Sin embargo, el análisis de virulencia para *H. pylori* determinó una asociación entre el gen *vacAs1* a gastritis aguda y el gen *iceA1* a pacientes con dispepsia. Con relación a NHPH, se identificó 5 genes de virulencia comúnmente encontrados en *H. pylori* revelando asociaciones significativas de los genes *dupA* y *babA2* a pacientes con dispepsia. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que sugiere la presencia de genes de virulencia de *H. pylori* en NHPH especies en pacientes ecuatorianos.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, *Helicobacter no pylori* (NHPH), virulencia, gastritis aguda, dispepsia, PCR, Ecuador.

ABSTRACT

Prevalent in more than 4400 million people in the world, *H. pylori* is undoubtedly the main etiological agent associated with gastritis, gastroduodenal ulcer and gastric cancer in humans. However, spiral bacteria similar to *H. pylori*, present in animal species, called Non-*pylori Helicobacters* (NHPH) have been observed in human clinical samples. Infections with NHPH are accompanied by gastric erosions, duodenal ulcers and chronic gastritis less severe than those produced by *H. pylori*. Recent studies suggest that less than 15% of the infected population will develop clinical complications and that one of the elements that can explain these findings are the bacterial virulence factors found in these species. In the present study, the prevalence of seven virulence genes was compared: *cagA*, *vacAs1*, *babA2*, *sabA*, *dupA*, *jhp0947* and *iceA1* typically found in certain strains of *Helicobacter pylori* and was evaluated in NHPH species, through reaction assays in polymerase chain (PCR). The study population consisted of 242 Ecuadorian patients with different clinical diagnoses, such as, for example, acute gastritis, chronic gastritis, gastric cancer and digestive problems grouped as dyspepsia. As expected according to the scientific literature, a higher prevalence of *H. pylori* (58.3%) was observed compared to NHPH (31.4%) and no significant associations of these microorganisms were observed with the clinical diagnoses reported. However, the virulence analysis for *H. pylori* determined an association between the *vacAs1* gene to acute gastritis and the *iceA1* gene to patients with dyspepsia. In relation to NHPH, five virulence genes commonly found in *H. pylori* were identified, revealing significant associations of the *dupA* and *babA2* genes to patients with dyspepsia. According our knowledge, this is the first study to suggest the presence of *H. pylori* virulence genes in NHPH species in Ecuadorian patients.

Key words: *Helicobacter pylori*, Non-*pylori Helicobacters* (NHPH), virulence, acute gastritis, dyspepsia, PCR, Ecuador

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	6
PARTE I.....	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
Estado de Arte	11
Epidemiología de <i>H. pylori</i>	11
Epidemiología de <i>Helicobacter no-pylori</i> (NHPH).....	12
Factores de virulencia	13
Diagnóstico clínico	17
Referencias.....	20
PARTE II.....	25
ARTICULO CIENTÍFICO	25
Introducción	27
Materiales y métodos	29
Área de estudio, diseño y selección de pacientes	29
Declaración ética	30
Colección de biopsias gástricas.....	30
Extracción de ADN a partir de biopsias gástricas	30
Diseño de primers para genes de virulencia.....	32
Amplificación por PCR.....	33
Secuenciación de productos de PCR	34
Análisis estadístico	35
Resultados.....	35
Población en estudio	35
Identificación molecular de <i>Helicobacter pylori</i> y NHPH en biopsias gástricas.	36
Prevalencia de <i>H. pylori</i> y NHPH en las porciones de antro y cuerpo gástrico	37
Prevalencia de <i>H. pylori</i> y NHPH en los cuadros clínicos	37
Detección molecular de genes de virulencia en <i>H. pylori</i> y NHPH	38
Asociación entre la prevalencia en genes de virulencia y el diagnóstico clínico en la población en estudio	38
Discusión	40
Conclusiones	50
Referencias.....	52
PARTE III TABLAS Y FIGURAS	58
PARTE IV ANEXOS	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers de PCR para la amplificación de los genes 16srRNA <i>H. pylori</i> , 16SrRNA <i>Helicobacter</i> spp., <i>cagA</i> , <i>vacA (s1)</i> , <i>iceA1</i> , <i>dupA</i> , <i>babA2</i> , <i>sabA</i> y <i>jhp0947</i>	59
Tabla 2. Procedimiento estándar de PCR de los primers utilizados para la detección de genes de virulencia.....	60
Tabla 3. Características demográficas y diagnóstico clínico de la población en estudio ...	60
Tabla 4. Prevalencia de especies <i>Helicobacter</i> en las biopsias gástricas de antro y cuerpo (n=190).....	61
Tabla 5. Prevalencia de <i>H. pylori</i> y NHPH en los diferentes diagnósticos clínicos (n=242).....	61
Tabla 6. Asociación de los genes de virulencia presentes en <i>H. pylori</i> y los diferentes diagnósticos clínicos de la población en estudio (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico).....	62
Tabla 7. Asociación de los genes de virulencia presentes en NHPH y los diferentes diagnósticos clínicos de la población en estudio (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico).....	63
Tabla 8. Prevalencia de genes de virulencia en diversos estudios epidemiológicos en Asia, Europa, África y América.....	64
Tabla A1. Asociación de la presencia de <i>H. pylori</i> y NHPH en los cuadros clínicos presentados por los pacientes (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico)	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patogénesis de la infección de <i>H. pylori</i> y factores de virulencia.....	65
Figura 2. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> y NHPH en la población de estudio (n=242) .	65
Figura 3. Arbol Filogenético región 16S rRNA genero <i>Helicobacter</i>	66
Figura 4. Prevalencia de genes de virulencia en biopsias gástricas positivas para <i>H. pylori</i> y NHPH mediante detección por PCR (n=242).....	67
Figura 1A . Ubicación de la zona hipervariable región 16srRNA en pb.....	70
Figura 2A . Análisis en Primer-BLAST para los primers de <i>Helicobacter</i> sp.....	70
Figura 3A . Análisis en Primer-BLAST para primers de <i>Helicobacter pylori</i>	71

PARTE I
INTRODUCCIÓN GENERAL

Estado de Arte

Epidemiología de *H. pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, ureasa, catalasa y oxidasa positiva de forma espiral con 3 a 5 flagelos para su movimiento. Prevalente en 4.400 millones de personas en el mundo, lo que significa más del 50% de la población mundial (Hooi et al., 2017). Coloniza el estómago de los humanos específicamente en la superficie luminal del epitelio de la mucosa antral y provoca una respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica conocida como gastritis que puede permanecer durante décadas progresando lentamente a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y eventualmente a un carcinoma (Cover, 2016).

La frecuencia de infección varía de una región geográfica a otra, con áreas donde el contagio es precoz en la vida, áreas donde la prevalencia es bastante elevada y áreas donde la infección ha ido disminuyendo gradualmente (Sáenz., 2015). Se han descrito prevalencias elevadas en países en vías de desarrollo (>80%) y prevalencias menores en países industrializados (<40%) (Perez, Rothenbacher, & Brenner, 2004). Se estima que las regiones con mayor tasa de prevalencia sean África (79.1%), América Latina y Caribe (63.4%) y Asia (54.7%), en donde prevalecen los grupos socioeconómicos más bajos; mientras que las tasas de menor prevalencia se registran en América del Norte (37.1%), Europa occidental (34.3%) y Oceanía (24.4%) (Hooi et al., 2017). Con relación a América Latina, un estudio comparó la prevalencia de *H. pylori* en adultos de entre 21-65 años provenientes de 6 países, específicamente: México, Honduras, Costa Rica, Nicaragua, Chile y Colombia; donde se obtuvo prevalencias alrededor del 70.1 hasta 84.6 % (Porrás et al., 2013). Algunos estudios epidemiológicos se han realizado en Ecuador. En 2009, un estudio realizado en 90 pacientes

ecuatorianos determinó una prevalencia del 72.2% a través de una prueba de antígeno para *H. pylori* (Sasaki et al., 2009). Otro estudio ecuatoriano evaluó muestras fecales de 124 niños (6 a 36 meses), reclutados de suburbios pobres de Quito, y detectó que el 61% de los participantes estaban infectados con *H. pylori* (Egorov et al., 2010).

Epidemiología de *Helicobacter no-pylori* (NHPH)

En los últimos años, estudios referentes a enfermedades gástricas han encontrado infecciones humanas con especies de NHPH provenientes de otros animales (Øverby et al., 2017). El nombre *Helicobacter no-pylori* (NHPH) se ha utilizado en los últimos años para abarcar otras especies del género *Helicobacter* (Haesebrouck et al., 2009). Los NHPH son bacterias microaerofilicas catalasa y urea positivas con similitud morfológica y una relación genética estrecha con *H. pylori*. Ciertos estudios con hallazgos en tejidos gástricos humanos asocian a NHPH con erosiones gástricas, gastritis crónica y nodular, ulcera duodenal y linfoma gástrico de MALT (del inglés *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)(Øverby et al., 2017). En 2005, un estudio realizado en 123 pacientes alemanes y belgas positivos para una infección con NHPH evidenció la prevalencia de diversas especies de *Helicobacter*, como *H. suis* (37%), *H. salomonis* (21%), *H. felis* (15%), “*Candidatus Helicobacter Heilmanni*” (no cultivable *in vitro*) (8%) y *H. bizzozeronii* (4%) (Van Den Bulck et al., 2005). Hay varias prevalencias de NHPH en países de occidente y poblaciones orientales, como Japón, China y Tailandia, que reportan tasas de colonización desde 0.1 hasta 6.2% (Bento-Miranda & Figueiredo, 2014; Øverby et al., 2017). Otros estudios relacionan diferentes vías de transmisión con NHPH, como una infección zoonótica, a través del contacto directo con perros, gatos y cerdos (De Bock et al., 2007; Joosten et al., 2013; Ohtani et al., 2008). Sin embargo, estudios en países en desarrollo (como Ecuador), donde la prevalencia de *H. pylori*

es elevada, siguen sin evaluar las prevalencias de NHPH en pacientes con problemas gástricos.

Es interesante que, a pesar de la gran incidencia de infección por *Helicobacter* sp. gástricos a nivel mundial, no todas las personas infectadas por estos patógenos desarrollen una enfermedad gástrica (Mishra, 2013). En pacientes positivos a *H. pylori*, se ha observado que el 10% de pacientes desarrolla ulcera péptica, 1-3% adenocarcinoma gástrico y 0.1% desarrolla linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Peek & Crabtree, 2006). Esto implica una vía multifactorial para el desarrollo de una enfermedad gástrica que puede estar compuesta por factores de virulencia bacterianos, heterogeneidad genética de las cepas de *H. pylori*, predisposición genética del hospedero a una enfermedad específica y factores ambientales o culturales (Cervantes-García, 2016). Con relación a la variabilidad genotípica observada en las cepas de *H. pylori*, factores como su alta tasa de mutación, competencia natural para adquirir ADN desnudo y su frecuencia de recombinación homóloga pueden explicar esta variabilidad de desarrollo de enfermedades gástricas en pacientes positivos a *H. pylori* (Suerbaum & Achtman, 1999; Wirth et al., 2004). Se ha demostrado que varios genes de virulencia de *H. pylori* se encuentran asociados a diferentes diagnósticos clínicos (Peek & Crabtree, 2006).

Factores de virulencia

Varios genes de virulencia se han descrito como factores determinantes en la patogénesis gástrica de *H. pylori* tales como: genes *cagA* y *vacA*, que codifican toxinas y proteínas virulentas en las células epiteliales de la mucosa gástrica (Wen & Moss, 2009a); genes *babA* y *sabA*, que codifican proteínas de la membrana externa (Ansari, et al, 2017); genes *jhp0947* y *dupA*, pertenecientes a la región de plasticidad (Sugimoto, Watada, Woo Jung, Graham, &

Yamaoka, 2012; Talebi Bezmin Abadi, 2014) y últimamente el gen *iceA* que es inducido por el contacto de *H. pylori* con el epitelio gástrico (da Costa, Pereira, & Rabenhorst, 2015) (Ver Figura 1).

H. pylori es una bacteria genéticamente variable, cuya mayor plasticidad genética se encuentra en un segmento de DNA de 40kb conocido como islote o isla de patogenicidad (PAI), el cual codifica para la proteína CagA y otros componentes, como por ejemplo el sistema de secreción tipo IV que permite la exportación de proteínas (como la proteína CagA) al interior de una célula de la mucosa estomacal (Trespacios, Alba, & Otero, 2009). Así, el gen *cagA* es un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad *cag*-PAI. Esta isla de patogenicidad contiene 28 genes que codifican la estructura del sistema de secreción tipo IV (SST4) y la proteína CagA. El sistema SST4 trasloca la proteína CagA dentro de las células del hospedador alterando las funciones celulares y contribuyendo a la malignidad (Olbermann et al., 2010). La proteína CagA sufre fosforilación de tirosina en el motivo Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (Glutamina, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina) llamado motivo EPIYA que reaccionan con ciertas proteínas del hospedador (Bustamante-Rengifo, Matta, Pazos, & Bravo, 2017).

El motivo EPIYA se presenta en número variable en la región C- terminal de CagA. Se han descrito cuatro motivos EPIYA diferentes A,B,C,D que se diferencian entre sí por la secuencia de aminoácidos adyacentes a la secuencia EPIYA (Higashi et al., 2002).

Los motivos EPIYA se han encontrados en aislados de distintas partes del mundo, así EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C en regiones de occidente como Europa, Norte América y Australia; EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-D casi exclusivamente en países asiáticos, donde EPIYA-D es conocido por inducir altos niveles IL-8 (Hatakeyama, 2017). La presencia de *cag*-PAI en comparación a cepas de *H.pylori* *cag*-PAI negativas es asociada a la severidad en

la inflamación de la mucosa gástrica e incremento del riesgo de padecer ulcera péptica y cáncer de estómago (Argent, Hale, El-Omar, & Atherton, 2008; Terry et al., 2005).

El gen *vacA* es un gen cromosómico que no pertenece a la isla de patogenicidad cag-PAI, pero secreta una toxina que ocasiona una variedad de efectos en las células epiteliales incluyendo la formación de vacuolas intracelulares, poros selectivos de anión en la membrana plasmática, permeabilización de la capa epitelial y apoptosis (Schraw, Li, McClain, van der Goot, & Cover, 2002). Su estructura proteica consiste en una región señal (s), una media (m) y una intermedia (i). Las regiones proteicas "s" y "m" se estratifican en los subtipos s1 (a / b) o s2 y m1 o m2, en que las diferentes combinaciones generan proteínas con diferente nivel de citotoxicidad (da Costa et al., 2015). La variante alélica s1 en *vacA* es asociada al riesgo de padecer ulcera péptica y ulcera gástrica (Schraw et al., 2002; Vannarath et al., 2014).

Los genes *sabA* y *babA* pertenecen a un número de genes que codifican cerca de 32 proteínas de membrana externa de *H. pylori* implicadas en la adherencia bacteriana. Muchos de estos genes experimentan variación de fase en la región 5' de modo que no todas las cepas producen proteínas funcionales (Yamaoka et al., 2006).

La adhesina BabA es una proteína de membrana externa codificada por el gen *babA2* que permite la adherencia de *H. pylori* a los antígenos de lewis b (Le^b) que son determinados por el tipo de sangre ABO, carbohidratos fucosilados expresados en el epitelio gástrico y la capa protectora de moco. Variantes alélicas han sido identificadas como *babA1*, *babA2* y *babB*, pero solo *babA2* produce una actividad de unión a Le^b. La presencia de la variante alélica *babA2* en *H. pylori* está asociada con el incremento de inflamación gástrica, gastritis atrófica y el incremento del riesgo de ulcera duodenal y adenocarcinoma. La unión de esta adhesina es probablemente importante en la fase inicial de infección (Con et al., 2010; Paniagua et al., 2009).

Por otro lado, la proteína SabA es una adhesina producida por el gen *sabA*, que se une a la estructura de los carbohidratos antígeno sialil lewis^x (sLe^x y sLe^a) expresados en el epitelio gástrico. La inflamación del tejido gástrico y la transformación maligna promueven la síntesis de glicoconjugados sialilados, en la superficie de células epiteliales (Yamaoka, 2008). Estos glicoconjugados sialilados no han sido encontrados en pacientes sanos. La expresión del gen *SabA* puede responder a condiciones cambiantes en el estómago debido a su variación de fase que permite que *H.pylori* se desprenda de las células gástricas y escape de la respuesta inmunitaria. La producción de la adhesina SabA es asociado con metaplasia intestinal severa, gastritis atrófica y desarrollo de cáncer gástrico (Mahdavi et al., 2002; Y Yamaoka et al., 2006).

Por otra parte, la región de plasticidad es una región de hipervariabilidad en la que se encuentran más del 50% de genes específicos de cada especie *Helicobacter*, que llegaron por eventos de transferencia horizontal y presentan bajo contenido de nucleótidos G+C (Romo-González et al., 2015). En esta región se encuentran el gen *dupA* que es un potencial marcador de ulcera duodenal y un factor protector para el desarrollo de cáncer gástrico y metaplasia intestinal (Zhang et al., 2008). De igual manera, en esta región de plasticidad se localiza el gen *jhp0947* que es parte de una región con numerosos ORF (del inglés Open Reading Frame) que codifican proteínas. Está asociado a ulcera duodenal y carcinoma gástrico y es reconocido como un nuevo marcador de virulencia (Santos, Queiroz, et al., 2003a).

La expresión del gen *iceA* es inducida por el contacto del *H. pylori* con el epitelio gástrico, el cual puede presentar dos alelos *iceA1* e *iceA2* (Yakoob et al., 2015). El alelo *iceA1* es el principal genotipo y aumenta la expresión de IL-8, llevando a una inflamación antral aguda y consecuentemente a la formación de una eventual ulcera péptica. El alelo *iceA2* se ha observado en mayor prevalencia en países occidentales y se ha asociado inversamente con

ulcera péptica (Shiota, Suzuki, & Yamaoka, 2013). En ciertos estudios la presencia de *iceA* no ha sido asociada a cáncer gástrico. Se ha comprobado que *iceA* es independiente de la presencia de los genes *cagA* y *vacA* (Donahue et al., 2000; Huang et al., 2016).

Diagnóstico clínico

En la actualidad, existen numerosas pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas para la detección de *H. pylori* pero ninguna es considerada como gold estándar (Wang et al., 2015). Las técnicas invasivas se realizan una vez extraídas las biopsias gástricas por endoscopia digestiva alta y consisten en análisis histológicos, cultivo, prueba de ureasa rápida y métodos moleculares como PCR y PCR multiplex (Lopes, Vale, & Oleastro, 2014). Las pruebas no invasivas más utilizadas son las pruebas de aliento de urea, las pruebas de antígenos en heces y las pruebas serológicas (Wang et al., 2015). La prueba de aliento de urea, es una prueba no invasiva, rápida, de bajo costo que estima la capacidad del *H. pylori* (ureasa) para convertir la urea en CO₂. Como desventajas posee cierta toxicidad en el cuerpo posterior al ensayo y variabilidad en los resultados en muestras pediátricas, atribuibles a la actividad ureasa de la microbiota bacterial bucal (Frías & Otero, 2017). Mientras que las pruebas de antígenos en heces permiten detectar diferentes tipos de antígenos del *Helicobacter* sp. excretado a través de un ensayo ELISA, basado en anticuerpos monoclonales tipo sándwich (Dominguez et al., 2006). Es una técnica para el diagnóstico primario de infecciones por *H. pylori* aunque no es muy precisa como la prueba de aliento de urea (El-Shabrawi et al., 2018). Además, la precisión del análisis disminuye cuando las muestras fecales son diluidas y debido a cambios de temperatura entre la colección y el análisis (Shimoyama, 2013). Por último, las pruebas serológicas utilizan un kit de prueba ELISA para determinar la respuesta del anticuerpo IgG anti-*Helicobacter* (Kindermann, Konstantopoulos, Lehn, Demmelmair, & Koletzko, 2001).

Es una prueba no invasiva de gran uso debido al bajo costo y facilidad de aplicación. Sin embargo, se ha determinado menos precisa que la prueba de aliento con urea y la prueba con antígenos fecales. Además, la presencia de anticuerpos persistentes limitan la distinción entre una infección activa o pasada (Elwyn et al., 2007). Recientemente ya se comercializan kits de microplacas recubiertos con una mezcla de proteínas bacterianas purificadas con antígenos (Akada et al., 2014), como por ejemplo de las proteínas CagA y VacA. En Ecuador, las técnicas no invasivas son las más empleadas por su bajo costo y la facilidad de análisis. Estudios en muestras fecales y suero han demostrado la utilidad de estas técnicas (Egorov et al., 2010; Sasaki et al., 2009).

Por otra parte, las técnicas moleculares, como por ejemplo PCR, PCR multiplex, PCR en tiempo real e Hibridación *in situ* de fluorescencia de ácido nucleico peptídico (PNA-FISH), proveen una alta sensibilidad y especificidad con relación a otras técnicas (Cerqueira et al., 2013; Matsumoto et al., 2016). Diversos estudios han descrito que su uso es ideal para el análisis de genes de virulencia, mutaciones puntuales y resistencia antimicrobiana (Lopes et al., 2014). Normalmente, los ensayos de reacción en cadena utilizan ciertos genes conservados, como *16SrRNA* y *23SrRNA* (Wang et al., 2015). Para la identificación de NHPH, la técnica molecular más usada en la actualidad es la secuenciación de genes específicos, como los genes *ureA*, *ureB* y *Hsp60*, o zonas variables de los genes *16SrRNA* y *23SrRNA*, que permiten la diferenciación entre especies (Baele et al., 2004; Mikkonen, Kärenlampi, & Hänninen, 2004). Como desventajas en estas técnicas es el elevado costo de equipos, reactivos y la necesidad de personal capacitado para el análisis molecular (Bessède, Arantes, Mégraud, & Coelho, 2017).

En este estudio, se aplicaron técnicas moleculares para la detección de *H. pylori* y NHPH en biopsias gástricas procedentes de 242 pacientes ecuatorianos a través de ensayos de PCR. Se

realizó la secuenciación de algunas muestras positivas para *H. pylori* y NHPH en las zonas V1-V4 del gen *16SrRNA* para la validación preliminar del método PCR utilizado en este estudio. Comparaciones de prevalencias fueron realizadas y se analizó la posible asociación de *H. pylori* y/o de NHPH a los diferentes diagnósticos clínicos presentados. Posteriormente, se detectaron 7 genes de virulencia (*cagA*, *vacA (s1)*, *iceA1*, *dupA*, *babA2*, *sabA* y *jhp0947*) en las muestras positivas para *H. pylori* y a seguir se evaluó su presencia en muestras positivas para NHPH. Hasta al momento, no se conocen datos sobre la existencia de genes de virulencia de *H. pylori* en NHPH en pacientes ecuatorianos. Por último, este estudio preliminar comprueba la necesidad de seguir con investigaciones sobre variaciones genéticas dentro de *Helicobacter* sp. y que podrían explicar los diferentes diagnósticos clínicos evaluados.

Referencias

1. Akada, J., Okuda, M., Hiramoto, N., Kitagawa, T., Zhang, X., Kamei, S., Nakamura, K. (2014). Proteomic Characterization of *Helicobacter pylori* CagA Antigen Recognized by Child Serum Antibodies and Its Epitope Mapping by Peptide Array. *PLoS ONE*, 9(8), e104611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104611>
2. Argent, R. H., Hale, J. L., El-Omar, E. M., & Atherton, J. C. (2008). Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9), 1062–1067. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001818-0>
3. Baele, M., Van den Bulck, K., Decostere, A., Vandamme, P., Hänninen, M.-L., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2004). Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1115–1122. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1115-1122.2004>
4. Bento-Miranda, M., & Figueiredo, C. (2014). *Helicobacter heilmannii* sensu lato: an overview of the infection in humans. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17779–17787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17779>
5. Bessède, E., Arantes, V., Mégraud, F., & Coelho, L. G. (2017). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 22, e12404. <https://doi.org/10.1111/hel.12404>
6. Bustamante-Rengifo, J. A., Matta, A. J., Pazos, A. J., & Bravo, L. E. (2017). Effect of treatment failure on the CagA EPIYA motif in *Helicobacter pylori* strains from Colombian subjects. *World Journal of Gastroenterology*, 23(11), 1980–1989. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i11.1980>
7. Cerqueira, L., Fernandes, R. M., Ferreira, R. M., Oleastro, M., Carneiro, F., Brandao, C., Azevedo, N. F. (2013). Validation of a Fluorescence In Situ Hybridization Method Using Peptide Nucleic Acid Probes for Detection of *Helicobacter pylori* Clarithromycin Resistance in Gastric Biopsy Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1887–1893. <https://doi.org/10.1128/JCM.00302-13>
8. Cervantes-García, E. (2016). *www.medigraphic.org.mx Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 63). Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
9. Con, S. A., Takeuchi, H., Nishioka, M., Morimoto, N., Sugiura, T., Yasuda, N., & Con-Wong, R. (2010). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* babA2 and babA2/B in Costa Rica and Japan. *World Journal of Gastroenterology*, 16(4), 474–478. <https://doi.org/10.3748/WJG.V16.I4.474>
10. Cover, T. L. (2016). *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *MBio*, 7(1), e01869-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01869-15>
11. da Costa, D. M., Pereira, E. dos S., & Rabenhorst, S. H. B. (2015). What exists beyond cagA and vacA? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 21(37), 10563–10572. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10563>
12. De Bock, M., Van den Bulck, K., Hellems, A., Daminet, S., Coche, J.-C., Debongnie, J.-C., ... Ducatelle, R. (2007). Peptic ulcer disease associated with *Helicobacter felis* in a dog owner. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(1), 79–82. <https://doi.org/10.1097/01.meg.0000221856.19201.33>
13. Dominguez, J., Forne, M., Blanco, S., Prat, C., Gali, N., Latorre, I., Ausina, V. (2006). Comparison of a monoclonal with a polyclonal antibody-based enzyme immunoassay

- stool test in diagnosing *Helicobacter pylori* infection before and after eradication therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(12), 1735–1740. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02936.x>
14. Donahue, J. P., Peek, R. M., Van Doorn, L. J., Thompson, S. A., Xu, Q., Blaser, M. J., ... Miller, G. G. (2000). Analysis of *iceA1* transcription in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 5(1), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672045>
 15. Egorov, A. I., Sempértegui, F., Estrella, B., Egas, J., Naumova, E. N., & Griffiths, J. K. (2010). The effect of *Helicobacter pylori* infection on growth velocity in young children from poor urban communities in Ecuador. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(9), e788-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.03.013>
 16. El-Shabrawi, M., El-Aziz, N. A., El-Adly, T. Z., Hassanin, F., Eskander, A., Abou-Zekri, M., ... Meshaal, S. (2018). Stool antigen detection versus ¹³C-urea breath test for non-invasive diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection in a limited resource setting. *Archives of Medical Science : AMS*, 14(1), 69–73. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.61031>
 17. Elwyn, G., Taubert, M., Davies, S., Brown, G., Allison, M., & Phillips, C. (2007). Which test is best for *Helicobacter pylori*? A cost-effectiveness model using decision analysis. *The British Journal of General Practice : The Journal of the Royal College of General Practitioners*, 57(538), 401–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504592>
 18. Frías, J. S., & Otero, W. (2017). *Revista de gastroenterología del Perú órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú. Revista de Gastroenterología del Perú* (Vol. 37). Sociedad de Gastroenterología del Perú. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292017000300009
 19. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 202–23, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00041-08>
 20. Hatakeyama, M. (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 93(4), 196–219. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.013>
 21. Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T., & Hatakeyama, M. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14428–14433. <https://doi.org/10.1073/pnas.222375399>
 22. Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., ... Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
 23. Huang, X., Deng, Z., Zhang, Q., Li, W., Wang, B., & Li, M. (2016). Relationship between the *iceA* gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 1085–1092. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S107991>

24. Joosten, M., Flahou, B., Meyns, T., Smet, A., Arts, J., De Cooman, L., Haesebrouck, F. (2013). Case Report: *Helicobacter suis* Infection in a Pig Veterinarian. *Helicobacter*, 18(5), 392–396. <https://doi.org/10.1111/hel.12054>
25. Kindermann, A., Konstantopoulos, N., Lehn, N., Demmelmair, H., & Koletzko, S. (2001). Evaluation of two commercial enzyme immunoassays, testing immunoglobulin G (IgG) and IgA responses, for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3591–3596. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3591-3596.2001>
26. Lopes, A. I., Vale, F. F., & Oleastro, M. (2014). *Helicobacter pylori* infection - recent developments in diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9299–9313. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9299>
27. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Borén, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5581), 573–578. <https://doi.org/10.1126/science.1069076>
28. Matsumoto, H., Shiotani, A., Nishibayashi, H., Kamada, T., Kimura, T., Fujimura, Y., ... Haruma, K. (2016). Molecular Detection of *H. pylori* Using Adherent Gastric Mucous to Biopsy Forceps. *Helicobacter*, 21(6), 548–553. <https://doi.org/10.1111/hel.12310>
29. Mikkonen, T., Kärenlampi, R. I., & Hänninen, M.-L. (2004). Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(3), 753–758. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02839-0>
30. Mishra, S. (2013). Is *Helicobacter pylori* good or bad? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(3), 301–304. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1773-9>
31. Ohtani, H., Hayashi, H., Higami, Y., Takuma, K., Minami, K., Minami, Y., & Shimokawa, I. (2008). Acute Gastritis Associated With Invading *Helicobacter heilmannii* Organisms From a Previously Homeless Cat. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(2), 216–217. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000248003.95946.92>
32. Olbermann, P., Josenhans, C., Moodley, Y., Uhr, M., Stamer, C., Vauterin, M., ... Linz, B. (2010). A Global Overview of the Genetic and Functional Diversity in the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. *PLoS Genetics*, 6(8), e1001069. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001069>
33. Øverby, A., Murayama, S. Y., Michimae, H., Suzuki, H., Suzuki, M., Serizawa, H., ... Nakamura, M. (2017). Prevalence of Gastric Non-*Helicobacter pylori*-*Helicobacters* in Japanese Patients with Gastric Disease. *Digestion*, 95(1), 61–66. <https://doi.org/10.1159/000452400>
34. Paniagua, G., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J., ... Vaca, S. (2009). Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-14>
35. Peek, R. M., & Crabtree, J. E. (2006). *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *The Journal of Pathology*, 208(2), 233–248. <https://doi.org/10.1002/path.1868>
36. Perez, G. I., Rothenbacher, D., & Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 9(s1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1083->

4389.2004.00248.x

37. Porras, C., Nodora, J., Sexton, R., Ferreccio, C., Jimenez, S., Dominguez, R. L., Herrero, R. (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes & Control: CCC*, 24(2), 209–215. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0117-5>
38. Romo-González, C., Consuelo-Sánchez, A., Camorlinga-Ponce, M., Velázquez-Guadarrama, N., García-Zúñiga, M., Burgueño-Ferreira, J., & Coria-Jiménez, R. (2015). Plasticity Region Genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, and *jhp0949* of *Helicobacter pylori* in Isolates from Mexican Children. *Helicobacter*, 20(3), 231–237. <https://doi.org/10.1111/hel.12194>
39. Sáenz, R. (2015). “HELICOBACTER PYLORI, HOY”. UNA HISTORIA DE 30 AÑOS *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.09.004>
40. Santos, A., Queiroz, D. M. M., Ménard, A., Marais, A., Rocha, G. A., Oliveira, C. A., Mégraud, F. (2003). New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1651–1655. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1651-1655.2003>
41. Sasaki, T., Hirai, I., Izurieta, R., Kwa, B. H., Estevez, E., Saldana, A., Yamamoto, Y. (2009). Analysis of *Helicobacter pylori* Genotype in Stool Specimens of Asymptomatic People. *Laboratory Medicine*, 40(7), 412–414. <https://doi.org/10.1309/LMZ2WWCD2A9MFTNW>
42. Schraw, W., Li, Y., McClain, M. S., van der Goot, F. G., & Cover, T. L. (2002). Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34642–34650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203466200>
43. Shimoyama, T. (2013). Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 19(45), 8188–8191. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i45.8188>
44. Shiota, S., Suzuki, R., & Yamaoka, Y. (2013). The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *Journal of Digestive Diseases*, 14(7), 341–349. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12054>
45. Suerbaum, S., & Achtman, M. (1999). Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. *Trends in Microbiology*, 7(5), 182–184. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01505-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01505-X)
46. Sugimoto, M., Watada, M., Woo Jung, S., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2012). Role of *Helicobacter pylori* Plasticity Region Genes in Development of Gastrointestinal Diseases. <https://doi.org/10.1128/JCM.00906-11>
47. Talebi Bezmin Abadi, A. (2014). The *Helicobacter pylori* dupA: A Novel Biomarker for Digestive Diseases. *Frontiers in Medicine*, 1, 13. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00013>
48. Terry, C. E., McGinnis, L. M., Madigan, K. C., Cao, P., Cover, T. L., Liechti, G. W., Forsyth, M. H. (2005). Genomic Comparison of *cag* pathogenicity island (PAI)-positive and -negative *Helicobacter pylori* strains: identification of novel markers for *cag* PAI-positive strains. *Infection and Immunity*, 73(6), 3794–3798. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3794-3798.2005>
49. Trespacios, A., Alba, A., & Otero, W. (2009). *Revista colombiana de gastroenterología*. *Revista Colombiana de Gastroenterología* (Vol. 24). Asociación

- Colombiana de Gastroenterología. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572009000400009
50. Van Den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Driessen, A., Debongnie, J.-C., Burette, A., Haesebrouck, F. (2005). Identification of Non-*Helicobacter pylori* Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs, and Cats. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 43(5), 2256–2260. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2256-2260.2005>
 51. Vannarath, S., Vilaichone, R., Rasachak, B., Mairiang, P., Yamaoka, Y., Shiota, S., ... Mahachai, V. (2014). Virulence genes of *Helicobacter pylori* in gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in Laos. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(20), 9027–9031. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374247>
 52. Wang, Y.-K., Kuo, F.-C., Liu, C.-J., Wu, M.-C., Shih, H.-Y., Wang, S. S. W., Wu, D.-C. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11221–11235. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>
 53. Wen, S., & Moss, S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.11.016>
 54. Wirth, T., Wang, X., Linz, B., Novick, R. P., Koji Lum, J., Blaser, M., ... Achtman, M. (2004). *Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from Helicobacter pylori: Lessons from Ladakh*. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0306629101
 55. Yakoob, J., Abbas, Z., Khan, R., Salim, S. A., Abrar, A., Awan, S., & Ahmad, Z. (2015). *Helicobacter pylori*: correlation of the virulence marker *iceA* allele with clinical outcome in a high prevalence area. *British Journal of Biomedical Science*, 72(2), 67–73. <https://doi.org/10.1080/09674845.2015.11666799>
 56. Yamaoka, Y. (2008). Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(3), 174–181. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738347>
 57. Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., Graham, D. Y. (2006). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6), 775–781. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.083014>
 58. Zhang, Z., Zheng, Q., Chen, X., Xiao, S., Liu, W., & Lu, H. (2008). The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. *BMC Gastroenterology*, 8, 49. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-49>

PARTE II
ARTICULO CIENTÍFICO

Comparación de genes de virulencia entre *Helicobacter pylori* y otras especies de *Helicobacter* en pacientes Ecuatorianos

Autores: Delgado F¹.; Baquero M¹.; Dávila A.¹; Abarca J².; Calle X³.; Ortega T⁴.; Endara PF^{1,5}; Machado A.^{1,*}

¹ Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito

² Eugenio Espejo Hospital, Quito, Ecuador

³ José Carrasco Arteaga Hospital, Cuenca, Ecuador

⁴ *Sociedad de lucha Contra el Cáncer -SOLCA*, Quito, Ecuador

⁵ Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Pichincha, Ecuador

* Autor correspondiente: amachado@usfq.edu.ec

Introducción

En 2015, se informó que alrededor de 4400 millones de personas en todo el mundo padecían infección por *H. pylori*. Las prevalencias a nivel mundial varían entre países en desarrollo (>80%) y países industrializados (<40%) (Hooi et al., 2017; Perez et al., 2004). Los síntomas clínicos asociados con estas infecciones suelen ser gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Hopkins et al, 2017). Sin embargo, cada vez son más los estudios que señalan la presencia de bacterias espirales similares a *H. pylori*, observadas en otras especies animales, conocidas como *Helicobacter no-pylori* (NHPH) en muestras clínicas humanas (Mladenova-Hristova, Grekova, & Patel, 2017). Infecciones con NHPH son consistentemente acompañadas de erosiones gástricas principalmente en las porciones del antro, y se han asociado a enfermedades como úlceras duodenales y gastritis crónica menos severa que la producida por *H. pylori* (Haesebrouck et al., 2009). Recientemente, se ha sugerido que NHPH podría causar cáncer gástrico en humanos (Lee et al., 2017a). En países europeos (como Polonia y Bulgaria) y poblaciones orientales (como Japón y Tailandia) se han reportado prevalencias desde 0.1 hasta 6.2% (Bento-Miranda & Figueiredo, 2014; Øverby et al., 2017). En China, se demostró que las infecciones con *H. heilmannii* s.l. (no identificado a nivel de especie) presentan prevalencias del 11/9% en pacientes con patologías gástricas, recomendándose considerar a NHPH como agentes etiológicos en el diagnóstico clínico (Liu et al., 2015). Registros de prevalencias en países en desarrollo como Ecuador no se han descrito, en muchos casos, por causa del indudable papel que desempeña *H. pylori* en infecciones gástricas humanas. Es interesante que, a pesar de la gran incidencia de infección por *Helicobacter* gástricos a nivel mundial, no todas las personas infectadas por estos patógenos desarrollen una enfermedad. Se ha descrito que la composición de los factores

de virulencia podría explicar la diversificación de los diagnósticos clínicos asociados (Salimzadeh et al., 2015). Varios genes de virulencia se han descrito como factores determinantes en la patogénesis gástrica de *H. pylori* tales como: genes *cagA* y *vacA*, que codifican toxinas y proteínas virulentas en las células epiteliales de la mucosa gástrica (Wen & Moss, 2009a); genes *babA* y *sabA*, que codifican proteínas de la membrana externa y facilitan su adaptación (Ansari et al., 2017); genes *jhp0947* y *dupA*, pertenecientes a la región de plasticidad asociados a ulcera duodenal (Sugimoto et al., 2012; Talebi Bezmin Abadi, 2014) y últimamente el gen *iceA* que es inducido por el contacto de *H. pylori* con el epitelio gástrico (da Costa et al., 2015).

Hasta el momento no hay datos completos disponibles sobre la abundancia de estos genes de virulencia en otras especies de *Helicobacter* sp. que habitan pacientes ecuatorianos y otras poblaciones a escala global. Datos sobre la prevalencia de *Helicobacter pylori* y NHPH en pacientes ecuatorianos pueden proporcionar una mejor comprensión entre las infecciones gástricas y las características de nicho. Estas inquietudes, así como un trabajo previo enfocado en el estudio epidemiológico en la población ecuatoriana de los factores de riesgo asociados a la infección por *Helicobacter pylori* (datos todavía no publicados), condujeron a la realización del presente estudio. Aquí, se ha utilizado ensayos de PCR para identificar varios genes de virulencia (*cagA*, *vacA (s1)*, *iceA1*, *dupA*, *babA2*, *sabA* y *jhp0947*) después de una identificación molecular previa de *Helicobacter pylori* y NHPH en 242 biopsias gástricas de pacientes ecuatorianos. Para el mejor conocimiento de los autores, este es el primer estudio que analiza la prevalencia de numerosos genes de virulencia entre las especies de *Helicobacter pylori* y NHPH en pacientes ecuatorianos.

Materiales y métodos

Área de estudio, diseño y selección de pacientes

El presente estudio fue realizado en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (IM-USFQ) en el periodo 2015-2017. Se recolectó diversas biopsias gástricas provenientes de 256 pacientes ecuatorianos que acudieron a cuatro centros de gastroenterología para un control de rutina. Los centros colaboradores fueron Hospital Eugenio Espejo (HEE) de Quito, Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) sede Quito, Hospital José Carrasco Arteaga (HJCA) de Cuenca y una Unidad de Diagnóstico Particular (UDP) de Quito.

Todos los participantes fueron voluntarios mayores de edad (≥ 18 años) que acudieron a los centros colaboradores de diferentes regiones del país. Las biopsias gástricas se tomaron del antro y cuerpo del estómago durante las consultas de endoscopia gástrica de rutina y se almacenaron en metanol a -20 °C hasta futuro procesamiento en los laboratorios de investigación del IM-USFQ. Para cada muestra, se incluyó una encuesta de datos epidemiológicos que fueron recopilados por el personal médico colaborador del proyecto de investigación. Además de la edad, sexo y profesión, la encuesta incluyó preguntas relacionadas con hábitos alimenticios, lugar domiciliario, diagnóstico de enfermedades gástricas previas o relacionadas, tipo de tratamiento recibido, así como factores socioeconómicos, entre otros. Los criterios de exclusión de voluntarios fueron pacientes menores de edad, encuestas incompletas por los voluntarios y cualquier paciente que recibió tratamiento antimicrobiano durante los últimos tres meses antes de la encuesta.

Declaración ética

Antes de la recolección de las muestras, todos los pacientes fueron informados de su rol como voluntarios en el presente estudio y se obtuvo su consentimiento informado. Esta investigación fue revisada y aprobada por el comité de bioética de la Universidad de San Francisco de Quito con el código 2014-130M.

Colección de biopsias gástricas

Las biopsias gástricas de las porciones del antro y el cuerpo del estómago fueron recolectadas por los médicos colaboradores (Abarca J., Basantes L., Calle X., Calderon W., Carrera E. y Ortega T.) durante las consultas de endoscopia en los diferentes centros de gastroenterología. Las muestras de antro y cuerpo de cada voluntario fueron colocadas en tubos FALCON® con metanol a 99.9%. Luego se refrigeraron a -20 °C hasta su transporte al IM-USFQ, donde se mantuvieron a esa misma temperatura hasta su posterior análisis molecular.

Extracción de ADN a partir de biopsias gástricas

La extracción del ADN total de las biopsias gástricas se llevó a cabo mediante la técnica CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) (Wilson, 1997; Mejia et al., 2015). Primero, se obtuvo el sedimento celular para cada muestra recolectada del antro y cuerpo del estómago. Específicamente, cada muestra se transfirió a tubos Eppendorf® y se centrifugó a 804,96 g durante 5 min. Para obtener el sedimento celular, se realizó un ciclo de lavado mediante la sustitución del volumen de metanol al 98% y otra centrifugación durante 5 minutos con la posterior eliminación del sobrenadante. A continuación, se añadió el volumen de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7) para realizar una vez más el lavado y la eliminación de los remanentes del sobrenadante.

El sedimento celular se resuspendió en 700 μ l de solución CTAB (2% de CTAB w/v, NaCl 1,4 mM, EDTA 20 mM, HCl 100 mM, pH 8) y se digirió con 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) durante 2 horas a 65 °C.

Luego, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se mezclaron con 700 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 16,110 g y se obtuvo dos fases: la fase inferior orgánica (cloroformo/ isoamilo); y la fase superior o acuosa con el ADN en suspensión. Luego, 500 μ l de la fase superior se transfirió a un nuevo tubo limpio con 50 μ l de acetato de sodio (3M pH 5). A continuación, se agregaron 1000 μ l de etanol al 100% y se guardó cada muestra a -20 °C durante 24 horas para obtener la precipitación del ADN de la solución acuosa. Finalmente, el ADN precipitado se centrifugó a 16,110 g durante 15 minutos descartándose el sobrenadante. El sedimento de ADN se lavó con 1000 μ l de etanol al 70% y se centrifugó durante otros 15 minutos a 16,110 g (Desjardins y Conklin, 2010; Lucena-Aguilar et al., 2016). El sobrenadante se descartó una vez más y la muestra de ADN se resuspendió en 50 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 0,1 mM) que se almacenó a -20 °C hasta futura análisis molecular.

La cuantificación del ADN se realizó a través de un espectrofotómetro Nanodrop 1000 y la calidad del ADN obtenido se verificó de acuerdo con la relación A_{260}/A_{280} y $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ (Lucena-Aguilar et al., 2016). De acuerdo con los valores de concentración de ADN obtenidos por cada muestra, se realizaron diluciones en tampón TE para asegurar una concentración de ADN de 20 ng/ μ l en todas las muestras.

Diseño de primers para genes de virulencia

El diseño de primers *in-silico* para cada gen analizado (*cagA*, *vacA* (s1), *iceA1*, *dupA*, *babA2*, *sabA* y *jhp0947*) se basó en la alineación de secuencias genómicas obtenidas en el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) usando CLUSTAL W2 (EMBL), que demostró regiones comunes conservadas que sirvieron como objetivos para el diseño de primers en el software Primer3 (Marshall, et al., 1999). Los principales criterios de selección para cada par de primers fueron: alta complementariedad y especificidad con la secuencia diana, baja complementariedad con secuencias no diana, similar temperatura de fusión entre primers (Fw/Rw) y ausencia de auto-complementariedad para evitar la formación de dímeros o subproductos no deseados (Machado et al., 2013). Estos criterios se analizaron utilizando el software mFold Web Server (Universidad de Nueva York en Albany), nBLAST (Herramienta de búsqueda básica de alineación local (NCBI) y Probe Match (Universidad del estado de Michigan). Los cebadores utilizados en este estudio fueron sintetizados por Invitrogen (USA). Las propiedades *in silico* del conjunto de cebadores seleccionados, se encuentran en la Tabla No.1. Cada set de primers para la identificación de la región 16S-rRNA de *H.pylori* y NHPH fue sometido a una evaluación de especificidad y sensibilidad a través de cálculos teóricos (Ec.1 y Ec.2) utilizando un análisis en ProbeMatch en la base de datos de RDP II (Ribosomal DataBase Project) (Machado et al., 2013).

$$\text{Ec.1 Sensibilidad} = \frac{ts}{Tts} * 100$$

$$\text{Ec.2 Especificidad} = \frac{nts}{Tnt} * 100$$

El cálculo de sensibilidad teórica se realizó con la ecuación 1, donde t_s representa el número de secuencias blanco 16S detectados por el primer y T_t para el número total de secuencias blanco disponibles en la base de datos RDP II. La especificidad teórica se realizó con la ecuación 2, donde n_{ts} es el número de secuencias 16S no blanco que no son detectadas por los primers diseñados y T_{nt} se refiere al número total de secuencias no blanco disponibles en la base de datos RDP II. La especificidad en el set de primers de cada gen de virulencia se analizó a través de BLASTn y la comprobación del valor de identidad (100%) con secuencias blanco de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, última fecha de acceso, marzo de 2016). Se confirmó que el set de primers seleccionado era específico para la identificación de cada gen blanco y que la interacción con otras bacterias que posiblemente podrían estar presentes en las biopsias gástricas fue nula.

Amplificación por PCR

En primer lugar, se procedió a identificar si las muestras correspondían a *Helicobacter pylori* o NHPH. En este paso inicial, se utilizaron primers que amplificaron la zona hipervariable (V4-V9) de la región 16SrRNA de *H.pylori* y la zona hipervariable (V1-V4) de la región 16S rRNA de NHPH de acuerdo al análisis en Primer-BLAST como se indica en las figuras 1A, 2A y 3A en Anexos. Para *Helicobacter pylori* los primers usados fueron Fw 5'-GCGGGATAGTCAGTCAGGTG-3' y Rw 5'-AAGATTGGCTCCACTTCGCA-3'; mientras que para NHPH, utilizamos los primers Fw 5'-CGGACACACTGGAACTGAGA-3' y Rw 5'-GCCTTCGCAATGAGTATTCC-3', cuando las muestras gástricas fuesen negativas al set de primers específico para *H. pylori*. Posteriormente, las muestras positivas para NHPH y *Helicobacter pylori* fueron evaluadas para la presencia de siete genes de virulencia exactamente: *cagA*, *vacAs1*, *babA2*, *iceA1*, *sabA*, *dupA* y *jhp0947*. De forma general, la

preparación de las muestras para cada corrida de PCR consistió en un volumen final de 20 μ l compuestas por 4 μ l de Buffer verde Go Taq Flexi (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 1.6 μ l de $MgCl_2$ (concentración final 2.0 mM), 0.1 μ l de dNTP Mix (concentración final 0.1 mM), 1.0 μ l de cada cebador de PCR (concentración final de 0.5 μ M), 0.3 μ l de ADN polimerasa GoTaq Flexi (concentración final de 1.5 U) (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 2 μ l del ADN total extraído de cada muestra gástrica y el volumen restante de agua libre de ADN. La metodología de PCR se realizó en un equipo termociclador T100 TM (Bio-Rad, USA) con el procedimiento estándar ilustrado en la Tabla 2. Para determinar el tamaño de las bandas, se usó una escala de tamaño molecular de 100 pb (Promega, USA) y se utilizaron controles positivos y negativos en todos los experimentos. Los productos de la PCR se visualizaron utilizando electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio al 0.1% durante 50 minutos a 220v y 80 amperios. El desarrollo se llevó a cabo en el modelo Universal Hood II con el software Image Lab versión 5.1 (Bio-Rad, USA).

Secuenciación de productos de PCR

Un total de 8 productos de PCR, cuatro positivos para *H. pylori* y cuatro positivos para *Helicobacter* spp. fueron enviados a secuenciar a Functional Biosciences (Madison, Wisconsin, USA.), donde se realizó reacciones de secuenciación de Sanger de la región del gen *16SrRNA* a través de Big Dye V3.1 e instrumentos BO 3730xl. Las secuencias crudas obtenidas se sometieron a los Software de limpieza Pregap4 y de ensamblaje Gap4, donde se obtuvo una secuencia consenso, la misma que fue ingresada en BLAST para la búsqueda de homología con el género *Helicobacter* spp. o la especie *Helicobacter pylori*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico evaluó inicialmente la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en las porciones de antro y cuerpo gástrico, utilizándose la prueba de McNemar para las muestras gástricas emparejadas. A seguir, para medir la asociación de *H. pylori* y NHPH a los cuadros clínicos, así como la asociación de genes de virulencia a los mismos, se empleó el análisis de regresión logística. Valores de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza (IC) del 95% se consideraron estadísticamente significativos. Los odds ratios (OR) encontrados fueron ajustados con las siguientes variables categóricas: sexo; edad; y tratamiento antibiótico. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas a través del software estadístico STATA 13 (StatCorp, College Station, TX, USA).

Resultados

Población en estudio

Un total de 484 muestras procedentes de las porciones del antro y cuerpo gástrico fueron colectadas de 242 pacientes idóneos pertenecientes a 4 unidades de gastroenterología: UDP (n=41), SOLCA (n=92), HEE(n=84) y HJCA (n=25). La población de estudio estuvo compuesta por 159 mujeres (65.7%) y 78 hombres (32.2%) con un rango de edades de 20 hasta 90 años (media 54 ± 18 años). Los pacientes manifestaron estar domiciliados en ciudades pertenecientes a la región sierra (183/242; 75.6%), región costa (47/242; 19.4%) y región amazónica (6/242; 2.48%).

Los datos clínicos determinaron que 31 pacientes (12.8%) presentaron cáncer gástrico, 45 pacientes (18.6%) tenían gastritis aguda, 72 pacientes (29.8%) mostraron gastritis crónica y por último 27 pacientes (11.2%) revelaron otros problemas gástricos como ERGE, dispepsia, pirosis, epigastralgia, distensión abdominal y enfermedades asociadas. Estas patologías

presentes en los 27 pacientes fueron agrupadas dentro de la definición general de dispepsia y se referirá con esta designación en los siguientes apartados. Sin embargo, 57 pacientes (23.6%) no presentaron ningún tipo de problemas de estómago (Tabla 3).

Algunos pacientes (80/242; 33%) con enfermedades gástricas recibieron tratamientos constituidos por antibióticos, como por ejemplo: amoxicilina, claritromicina, metronidazol (28/80; 35%); inhibidores de la bomba de protones (44/80; 55%); e intervenciones más severas (8/80; 10%), como cirugías y quimioterapias. Por el contrario, 148 pacientes (61.2%) mencionaron no recibir ningún tipo de tratamiento y 14 pacientes (5.8%) no presentaron ninguna información de tratamiento clínico en su encuesta por falta de conocimiento.

Identificación molecular de *Helicobacter pylori* y NHPH en biopsias gástricas.

La detección molecular de especies de *Helicobacter* sp. demostró que 141 pacientes (58.3%) fueron positivos para *Helicobacter pylori* y 76 pacientes (31.4%) fueron positivos para NHPH. Los restantes 25 pacientes (10.3%) no presentaron la presencia de ninguna especie del género *Helicobacter* en sus biopsias gástricas (Figura 2). El análisis de secuenciamiento de cuatro productos de PCR positivos para *Helicobacter pylori* determinó que dos productos evidenciaron un 100% de homología con cepas *H. pylori* de la colección de bases de datos del GenBank. Además, al construir un árbol filogenético (Máximo likelihood, bootstramp=500) del gen 16s ribosomal para el género *Helicobacter* se observó que las muestras secuenciadas se encuentran relacionadas cercanamente con otras especies de *Helicobacter pylori* (Figura 3). En contraste, cuatro productos de PCR positivos a NHPH enviados a secuenciamiento no arrojaron resultados concluyentes (datos no mostrados).

Prevalencia de *H. pylori* y NHPH en las porciones de antro y cuerpo gástrico

La prevalencia de *Helicobacter* sp. en las porciones de antro y cuerpo gástrico se detalla en la Tabla 4. Se observó que, en la mayoría de pacientes infectados con *H. pylori* (79.5%), la presencia de este microorganismo se encontró en las dos porciones gástricas. De igual manera, se observó este hallazgo en pacientes infectados con NHPH (51.5%).

Al tratarse de muestras gástricas de los mismos voluntarios se empleó el test de McNemar ya que las pruebas estadísticas de ANOVA y Chi-cuadrado son para muestras independientes. El test de Mc Nemar determinó si las prevalencias de *H. pylori* y NHPH en una sola región gástrica demostraban alguna diferencia estadística en la prevalencia de estos microorganismos a una sola región gástrica en particular. Como se observa en la Tabla 4, no se evidenció ninguna diferencia significativa en la prevalencia de *H. pylori* ($P = 1.00$) y de NHPH ($P = 0.49$) en relación a una región gástrica específica (antro y cuerpo).

Prevalencia de *H. pylori* y NHPH en los cuadros clínicos

En la Tabla 5 se presenta la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en los diferentes cuadros clínicos de la población en estudio. Específicamente, se observó que *H. pylori* (39/141; 27.6%) y NHPH (28/76; 36.8%) tuvieron las prevalencias más elevadas en pacientes con gastritis crónica, siendo mayor en pacientes infectados con NHPH. A su vez, se evidenciaron prevalencias menores en cuadros clínicos de cáncer gástrico, gastritis aguda y problemas de dispepsia. Sin embargo, ninguna de las asociaciones a estos cuadros clínicos fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$; ver Tabla A1 en Información Suplementaria).

Cabe resaltar que cerca de un 7.9% de los pacientes con los diferentes diagnósticos clínicos (19/242) fueron negativos a cualquier tipo de infección por *Helicobacter* sp. Es importante referir que, en este grupo de pacientes, se observó que una mayor presencia de cáncer gástrico

(28%) y de gastritis aguda (20%) con relación a los pacientes colonizados con *Helicobacter* sp. En contraste, se observó que el 19.7% y 25.5% de pacientes con NHPH y *H. pylori* no presentaron cualquier diagnóstico gástrico, respectivamente.

Detección molecular de genes de virulencia en *H. pylori* y NHPH

El análisis de virulencia determinó que en la población de pacientes ecuatorianos se evidenció la prevalencia de 5 genes de virulencia específicos de *Helicobacter pylori* en NHPH (*jhp0947*, *dupA*, *vacAs1*, *babA2* y *sabA*). Se reconoció una prevalencia mayor de estos genes en *H. pylori* con relación a su respectivo gen homólogo encontrado en NHPH (Figura 4), donde se pudo observar en cada gen una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, Chi-square test).

Con respecto a los genes de virulencia evaluados en la población en estudio, el gen *sabA* obtuvo la mayor prevalencia en la muestra de estudio, encontrándose en 120 del total de 141 pacientes positivos para *H. pylori* (85%) y solamente en 10 del total de 72 pacientes positivos a NHPH (13.8%). Por el contrario, los genes *iceA1* y *cagA* fueron los menos prevalentes para *H. pylori* e incluso estuvieron ausentes en pacientes positivos a NHPH.

Asociación entre la prevalencia en genes de virulencia y el diagnóstico clínico en la población en estudio

El análisis estadístico de las asociaciones entre la prevalencia en genes de virulencia y los diferentes diagnósticos clínicos en la población en estudio, se presentan en la Tabla 6 para voluntarios positivos a *H. pylori* y en la Tabla 7 para voluntarios positivos a NHPH.

En pacientes con *H. pylori*, se observó que la presencia del gen *vacAs1* se asoció significativamente al cuadro clínico de gastritis aguda (OR ajustado 3.66, IC:1.34-9.99,

P=0.01). Por otra parte, existieron asociaciones débiles no significativas entre el gen *vacAsI* y la gastritis crónica (OR ajustado 0.52, IC: 0.23-1.15, P=0.11) y el gen *sabA* y gastritis aguda (OR ajustado 5.90, IC: 0.73-47.9, P=0.09). Mientras que el gen *iceAI* se encontró correlacionado a problemas de dispepsia (OR 3.46, IC 1.07-9.81, P=0.04). De igual manera, se observó que el gen *cagA* (OR ajustado 2.49, IC: 0.74-8.39, P=0.14) y *babA* (OR ajustado 2.49, IC: 0.63-9.84, P=0.19) tuvieron asociaciones débiles no significativas a pacientes con dispepsia (Tabla 6).

Con respecto a los pacientes positivos a NHPH, se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas de los genes *dupA* (OR ajustado 15.5, IC 1.13-62.5, P=0.04) y *babA2* (OR ajustado 12.4, IC:1.26-122, P=0.03) a pacientes con dispepsia. Además, el gen *dupA* (OR ajustado 0.06, IC: 0.003-1.25, P=0.07) presentó una asociación débil no significativa a gastritis crónica. Los genes restantes no presentaron asociaciones estadísticamente significativas en cualquiera de los diagnósticos clínicos evaluados en la población en estudio (Tabla 7).

Los resultados más relevantes del presente estudio fueron: prevalencia del (58.3%) de *H. pylori* y NHPH (31.4%) en pacientes ecuatorianos; asociación significativa del gen *vacAsI* a gastritis aguda y el gen *iceAI* a dispepsia en pacientes positivos para *H. pylori*; prevalencia de 5 genes de virulencia comúnmente presentes en *H. pylori* en NHPH y la asociación de dos de estos genes *dupA* y *babA2* a pacientes con dispepsia.

Discusión

En el presente estudio, se comparó la prevalencia de 7 genes de virulencia típicamente encontrados en ciertas cepas de *Helicobacter pylori* realizándose el mismo análisis de virulencia en NHPH. La población de estudio estuvo formada por 242 pacientes ecuatorianos con diagnósticos clínicos de gastritis aguda, gastritis crónica, cáncer gástrico y problemas digestivos agrupados como dispepsia. Como esperado según la literatura científica, se evidenció una mayor prevalencia de *H. pylori* (58.3%) con relación a NHPH (31.4%) y no se observaron asociaciones significativas de estos microorganismos a los diagnósticos clínicos reportados. Sin embargo, el análisis de virulencia para *H. pylori* determinó una asociación entre el gen *vacAs1* a gastritis aguda y el gen *iceA1* a pacientes con dispepsia. Con relación a NHPH, se identificaron 5 genes de virulencia comúnmente encontrados en *H. pylori* revelando asociaciones significativas de los genes *dupA* y *babA2* a pacientes con dispepsia. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que sugiere la presencia de genes de virulencia de *H. pylori* en NHPH especies en pacientes ecuatorianos. Es importante aclarar que futuros estudios son necesarios para validar estos resultados preliminares.

Los hallazgos deben ser evaluados con cautela debido a limitaciones, como por ejemplo, sesgo de memoria y de selección en los pacientes encuestados (Manterola & Otzen, 2015); Conocimiento previo para el diseño de primers y limitado número de secuencias genómicas de otras especies de *Helicobacter*; Identificación de otras especies de *Helicobacter* a través de un único sitio diana la region 16s rRNA. Algunos estudios utilizan más de una región conservada como los genes *HSp60* o *urea* para la identificación; Secuenciamiento preliminar con un número reducido de muestras.

La detección molecular preliminar reveló una mayor prevalencia de *Helicobacter pylori* con relación a NHPH en las muestras gástricas (relación 1.85:1). La elevada presencia de *H. pylori* refleja la especificidad al hospedador, producto de un proceso coevolutivo desde hace ya 60000 años (Atherton et al., 2009). Por otra parte, la baja prevalencia de NHPH en el presente estudio (31,4%) fue mayor que la observada en países de occidente y poblaciones orientales, como Japón, China y Tailandia, con prevalencias de NHPH desde 0.1 hasta 6.2% (Bento-Miranda & Figueiredo, 2014). Es posible que el potencial zoonótico de NHPH y la presencia de estratos socioeconómicos bajos en Ecuador sean mayor que en estos países. Se ha determinado que el contacto directo e intenso con animales de compañía podría conducir a infecciones por otras especies de *Helicobacter*: gatos (*H. felis*), perros (*H. salomonis*) y animales de granja (criaderos de cerdos *H. suis*) (Švec A, Kordas, Pavlis, & J. Novotný, 2000). Estudios similares en pacientes infectados con NHPH han detectado que *H. suis* es el NHPH de mayor prevalencia en infecciones gástricas humanas (13.9% -37.9%), seguido de especies como *H. salomonis* (21%) *H. felis* (15%) y *H. bizozeronii* (4%) (De Groote et al., 2005; Van Den Bulck et al., 2005). Son necesarios más estudios que relacionen los resultados de la prevalencia de NHPH con las posibles vías de transmisión.

Con relación a la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en las localizaciones de antro y cuerpo gástrico, la no asociación significativa a una porción gástrica en particular fue demostrada en estudios similares para la identificación óptima de la toma de biopsias gástricas en infección por *H. pylori* (Nowak, 2000). Con respecto a NHPH se ha descrito que las infecciones son a menudo focales y predominantes en la porción del antro del estómago, lo cual no fue concordante con nuestros hallazgos (Solnick & Schauer, 2001). Estudios indican que el patrón de colonización de la mucosa gástrica puede estar asociado al perfil de la enfermedad

que se desarrolle en el ser humano. Un estudio ecuatoriano en pacientes con diferentes severidades gástricas, demostró variación en el grado de interacción entre las bacterias de las células epiteliales del hospedador y las encontradas en la capa de mucosa, sugiriendo que genotipos particulares de *H. pylori* pueden presentar mayor afinidad a ciertas células del hospedador (Loayza et al., 2015). Esto significa que la asociación no significativa de los microorganismos a una porción gástrica en particular pudo condicionar la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en los diagnósticos clínicos evaluados (Lan, Chen, Li, Chang, & Lin, 2012; Patel, 2011).

Con respecto a la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en los diagnósticos clínicos, las asociaciones no significativas de los microorganismos a gastritis aguda, crónica y cáncer gástrico, contrastan con numerosos estudios que citan la asociación de *Helicobacter* sp. a enfermedades gástricas (Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006; Lee et al., 2017b). Uno de los elementos que podría explicar esta discrepancia es la variabilidad de la población de estudio que puede ser producto de la combinación de factores como predisposición genética, diferente virulencia de las cepas bacterianas y estilo de vida en los pacientes (Cervantes-García, 2016). Cabe resaltar que cerca de un 7.9% (19/242) de los pacientes fueron negativos a cualquier tipo de *Helicobacter* sp. y presentaron complicaciones clínicas. Estudios similares encontraron complicaciones gástricas sin presencia de infección (Nordenstedt et al., 2013). Por otra parte, la prevalencia de pacientes con infección de *H. pylori* y gastritis (crónica y/o aguda; 46.9%) fue similar a lo observado en un estudio con 136 pacientes ecuatorianos infectados con *H. pylori*, donde evidenciaron hallazgos endoscópicos de gastritis (50.7%), úlcera duodenal (19.1%) y úlcera gástrica (16.2%) (Robles, Robles-Medran, Moncayo, Landivar, & Parrales, 2008).

Virulencia en *H. pylori*

El análisis de los genes de virulencia reveló que la prevalencia del gen *sabA* (85%) en *H. pylori* fue similar a la observada en pacientes con dispepsia iraníes con una media de edad de 46 años (87%, 71/82 casos) (Pakbaz et al., 2013). Otro estudio en el mismo país determinó una prevalencia menor (23.6%; 17 /86) en pacientes con dispepsia y atrofia gástrica (Goudarzi, Rezaee, Rafizadeh, & Taghavi, 2012). Las diferencias en los nichos gástricos ecológicos en las diferentes regiones puede explicar esta variación (Tabla 8) (Gatti et al., 2006).

Para el gen *babA2*, la prevalencia del 71% fue mayor a la observada en pacientes sintomáticos búlgaros de 18-65 años (49%; 86/176 casos) (Boyanova, Yordanov, Gergova, Markovska, & Mitov, 2010). En contraste, en países del sur asiático se ha visto frecuencias elevadas (79%; 320/406) y comparables a nuestros resultados, como se puede observar en la Tabla 8 (Ansari et al., 2017). Varios estudios detallan la importancia de la interacción entre el antígeno gástrico humano Leb y *babA* y la densidad de colonización gástrica. Sin embargo, no todos los pacientes infectados por *H. pylori* expresan tal antígeno y su presencia estaría sujeta a la población de estudio (Sheu, Sheu, Yang, Huang, & Wu, 2003). Por otra parte, se ha descrito que la presencia de *babA2* no siempre refleja la actividad de unión de la proteína BabA debido a la presencia de genes quiméricos *babA/B* o *babB/A* que pueden afectar el nivel de expresión. De igual manera, se ha descrito que el grado de homología entre *babA1* y *babA2* puede afectar la detección molecular en biopsias gástricas (Con et al., 2010).

Con relación al gen *vacAsI*, la prevalencia del 55% fue menor a la observada en pacientes mexicanos con gastritis crónica (68%; 97/143 casos) y menor en comparación con pacientes cubanos (72%; 54/75 casos) (Feliciano et al., 2015; Paniagua et al., 2009). Los estudios

epidemiológicos con prevalencias más elevadas fueron observadas en países europeos, como Bulgaria (89%; 157/176 casos), y en países asiáticos (Tabla 8), como Indonesia (98%; 43/44 casos) (Miftahussurur et al., 2015). Un estudio previo en Ecuador demostró que el genotipo más prevalente fue el *vacA* tipo s1b,m1 (Debets-Ossenkopp et al., 2003).

Con respecto al gen *dupA*, la prevalencia del (51%) fue coincidente con lo observado en pacientes iraníes con problemas de gastritis (50%; 34/68 casos) (Douraghi et al., 2018). Sin embargo, en otras regiones se observó una gran variabilidad de la prevalencia en pacientes con gastritis y ulcera péptica (rango: 7-92%) (Tabla 8). Esta variabilidad puede ser producto de las distintas poblaciones con dispepsias y la heterogenicidad geográfica de los aislados de *H. pylori* (Douraghi et al., 2018). Estudios han agregado que solo las cepas que contengan un gen *dupA* intacto podrían estar involucradas en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales, debido a que la expresión de la proteína DupA funcional no sería interrumpida (Shiota et al., 2013).

Para el gen *Jhp0947*, la prevalencia del 33% fue superior a la observada en China (21%; 29/141 casos) y menor a la encontrada en regiones de países latinoamericanos, como Brasil (70%) y Colombia (55%) (ver Tabla 8). Estudios similares han reportado una prevalencia menor en pacientes del Este Asiático en comparación con pacientes Occidentales (Gong et al., 2015; Santos, Queiroz, et al., 2003b; Sugimoto et al., 2012).

Con relación al gen *cagA*, la prevalencia del 23% fue menor a la observada en pacientes con gastritis crónica en México (39%;56/143 casos) y en pacientes con gastritis, ulcera duodenal y cáncer en Brasil (64%;127/200 casos) (Paniagua et al., 2009; Santos, Magalhães Queiroz, et al., 2003) (Tabla 8). En Ecuador un estudio realizado en 90 pacientes asintomáticos revelo una prevalencia de 45.9% del gen *cagA* perteneciente al genotipo del Este-Asiático (Sasaki et al., 2009). Supuestamente, la diferencia observada con la presente investigación es

atribuible al genotipo detectado (*cagA* tipo occidental). Es conocido que cerca del 60% de los pacientes de países occidentales con *H. pylori* son *cagA* negativos mientras que casi todos los pacientes del este asiático con *H. pylori* son *cagA* positivos (Wen & Moss, 2009b). Por otra parte, Ecuador es un país multicultural con varias etnias y futuros estudios deberían analizar no solo la prevalencia de genes de virulencia sino también su relación con el origen étnico y la ubicación geográfica de los pacientes voluntarios. Algo que se observa en estudios ya publicados en otros países y que indican que la prevalencia de genotipos más patógenos en ciertas áreas podría estar asociado con la gravedad de las enfermedades relacionadas con *H. pylori* en tales regiones (Bagheri et al., 2016; Covacci, Telford, Del Giudice, Parsonnet, & Rappuoli, 1999; Matta, Pazos, Bustamante-Rengifo, & Bravo, 2017).

Para el análisis molecular del gen *iceA1*, la prevalencia del 18% en el presente estudio fue menor con relación a otros países con diferente distribución mundial, como Bulgaria (69%), Indonesia (61%), Egipto (46%), pero similar comparado a otro país Latinoamericano, como Colombia en pacientes con gastritis crónica (18%;13/73 casos) (Abu-Taleb et al., 2018; Carlosama-Rosero, Bolaños-Bravo, Sierra-Tórres, & Rosero, 2018) (Tabla 8). Por último, otro estudio demostró que la prevalencia de *iceA1* e *iceA2* en pacientes colombianos con displasia gástrica fue del 30.9 y 43.3%, siendo el genotipo predominante el *iceA2* (Nogueira et al., 2001).

Virulencia en NHPH

Con respecto a NHPH, en el presente estudio se observó la presencia de 5 genes de virulencia de *H. pylori* en un rango bajo de prevalencia, específicamente, entre 1 hasta 14% dependiendo del gen evaluado. Es importante referir que existe muy poca información sobre la presencia de genes homólogos de *H. pylori* en otras especies y de los mecanismos de virulencia de NHPH. Estudios en países de occidente y asiáticos detallan que las especies de *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, y *H. salomonis* son las de mayor prevalencia en infecciones gástricas humanas y es posible que sus mecanismos de virulencia sean similares a los observados en *H. pylori* (Haesebrouck et al., 2009; Øverby et al., 2017).

La presencia de *sabA* y *babA2* en el presente estudio, contrasta con la ausencia de genes homólogos de *sabA*, *babA* e *iceA* en los resultados del secuenciamiento genómico de *H. suis* (Vermoote et al., 2011). La presencia de estos genes podría facilitar la colonización en el epitelio gástrico humano. Sin embargo, se debe considerar que pueden tener funciones diferentes.

Por el contrario, la presencia de *vacA*, concuerda con estudios realizados en Chile donde identificaron el gen *vacAs2m2* en *Helicobacter heilmannii* sensu lato extraído de mucosa gástrica humana con un 97% de homología con la citotoxina vacuoladora de *H. pylori*. Mientras que, en Finlandia, una paciente con problemas gástricos severos presento una citotoxina vacuolizante putativa *vacA* de *Helicobacter bizzozeronii* (Hernández et al., 2016; Schott, Rossi, & Hänninen, 2011). Genes homólogos a *vacA*, *cag23*, *cagX* y otros fueron implicados en la inducción de lesiones gástricas (*ggt*, *fldA*, *pgbA/B*) en pacientes, los cuales fueron encontrados en *H. suis* y otras especies NHPH, como por ejemplo “Candidatus *Helicobacter bovis*” (Vermoote et al., 2011) (Haesebrouck et al., 2009).

Los genes *iceA1* y *cagA* no fueron encontrados en el presente estudio. Sin embargo, se ha descrito un gen homólogo *iceA1* en *H. helmannii* con 54% de homología con *H. pylori* (Joosten et al., 2016). Con relación a los genes *dupA* y *jhp0947* no se encontraron referencias bibliográficas de su presencia en NHPH. El presente estudio está de acuerdo con la literatura científica y no se detectó ningún de los genes en las biopsias gástricas de los pacientes ecuatorianos con NHPH.

Factores de virulencia de *H. pylori* asociados a los diagnósticos clínicos

En pacientes infectados con *H. pylori* se evidenció estadísticamente, a través del OR (ver Tabla 6), que la presencia del gen *vacAs1* aumenta en 3.66 veces el riesgo de padecer gastritis aguda. Este resultado es similar a lo observado en pacientes de Oriente Medio donde se encontró que la presencia de *vacA-s1* está asociado a inflamación crónica severa en la mucosa gástrica (Siddique et al., 2014). De igual manera, en pacientes españoles se ha indicado que *vacA-s1*, *vacA-m1* están asociadas significativamente a la persistencia de gastritis no atrófica (González et al., 2011). Por otra parte, contrasta con lo observado en pacientes colombianos (*vacA-s1-m1*; OR 3.24 IC:0.37-28.26 p=0.07) y pacientes mexicanos (*vacA s1-m1*) con gastritis crónica donde no se observaron asociaciones significativas (Carlosama-Rosero et al., 2018) (Paniagua et al, 2009). Es conocido que la actividad vacuolizante de la proteína VacA solo se presenta en el 50-60% de las cepas de *H. pylori*. El presente hallazgo podría estar sujeto a esta característica. Por lo tanto, es posible que otras variantes alélicas del gen *vacA* como S2 y m2 se encuentren circulando (Winter et al., 2014).

Por otra parte, en el presente estudio se observó que la presencia del gen *iceA1* aumenta la probabilidad en 3.23 veces de que los pacientes padecieran problemas de dispepsia. Estudios sugieren una elevada prevalencia de *iceA2* en pacientes con dispepsia no ulcerosa mientras

que el gen *iceA1* es más prevalente en úlcera péptica (Amjad et al., 2010). En Colombia, investigadores observaron prevalencias alrededor del 87% para *iceA1* y 15.1% para *iceA2* en pacientes con dispepsia funcional (Arévalo, Trespalacios, Otero, Mercado, & Poutou, 2012). Con respecto a la asociación de los genes *cagA*, *sabA*, *babA2*, *dupa* y *Jhp0947* a los diferentes diagnósticos clínicos de los pacientes, la asociación no significativa encontrada en el presente estudio también ha sido reportada en otras investigaciones. Un estudio similar conducido en aislados de *H. pylori* de pacientes procedentes de cuatro países, específicamente de Estados Unidos, Corea, Japón y Colombia, no encontró asociación de los genes *cagA*, *vacA* e *iceA* a enfermedades gástricas como úlcera péptica, cáncer gástrico y gastritis atrófica. Además, las prevalencias observadas para cada gen fueron distintas en cada región y se evidenció que el genotipo predominante difirió entre países (Yoshio Yamaoka et al., 1999). De igual manera, en otra investigación realizada con el gen *JHP0947*, no se observaron asociaciones significativas a diagnósticos clínicos como úlcera gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico (Sugimoto et al., 2012).

Para el análisis molecular del gen *cagA* en el presente estudio, la población voluntaria positiva para el gen *cagA* estuvo formada por 7 pacientes con gastritis aguda, 8 pacientes con gastritis crónica y un paciente con cáncer gástrico, los cuales no presentaron ninguna asociación significativa a los diferentes diagnósticos clínicos. Uno de los factores que pudo influir en la no asociación fue el bajo número de pacientes con enfermedades vinculadas comúnmente con la presencia del gen *cagA* como úlcera péptica y cáncer gástrico, como se ha observado en otros estudios (Argent et al., 2008; Y. Zhang et al., 2005).

Otro factor como la integridad de la isla de patogenicidad han demostrado ser fundamental para la correlación con la gravedad de la enfermedad según los estudios realizados por Suzuki et al. (2011) y Tafreshi et al. (2018). Así es aconsejable que, futuros estudios en Ecuador

realicen un análisis del nivel de expresión génica en los genes evaluados, permitiendo un análisis molecular más completo de las especies *Helicobacter* en los pacientes con enfermedades gástricas.

Factores de virulencia de NHPH asociados a los diagnósticos clínicos

Con respecto a la asociación de los genes de virulencia de NHPH a los diferentes diagnósticos clínicos, se encontró que la presencia de los genes *babA2* y *dupA* aumenta estadísticamente en 12.4 y 15.5 veces, respectivamente el riesgo de padecer dispepsia (ver Tabla 7). Un resultado similar se observó en un caso reporte de 2013 en Bélgica, donde se indicó la asociación *H. suis* y reflujo gastroesofágico en un paciente humano con profesión veterinaria (Joosten et al., 2013). Recientemente, nuevos estudios relacionan a NHPH a problemas gástricos (Iwanczak et al., 2012; Øverby et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado la prevalencia de genes de virulencia en NHPH y su asociación a cuadros clínicos.

Factores como el escaso secuenciamiento genómico de especies NHPH, desconocimiento de la patogénesis en humanos y el rol indudable de *H. pylori* en enfermedades gástricas ha limitado su investigación. Sin embargo, al colonizar el mismo nicho gástrico es posible que sus mecanismos de virulencia y patogénesis sean similares (Schott et al., 2011). Uno de los retos de la investigación de *Helicobacter* sp. es la identificación correcta de especies, sus factores de virulencia y su involucramiento en diferentes diagnósticos clínicos (Salimzadeh et al., 2015).

En resumen, el presente estudio determinó la prevalencia de *H. pylori* y NHPH en pacientes ecuatorianos y comparó la prevalencia de 7 genes de virulencia en *Helicobacter pylori* y en NHPH provenientes de biopsias gástricas. En pacientes positivos a *H. pylori*, el gen *vacAsI*

fue estadísticamente asociado a gastritis aguda y el gen *iceA1* a problemas gástricos relacionados con dispepsia. En pacientes positivos a NHPH, los genes de virulencia *dupA* y *babA2* fueron asociados significativamente a pacientes con dispepsia. A nuestro conocimiento este es el primer estudio que evalúa la prevalencia de 7 genes de virulencia en *H. pylori* y en NHPH en una población ecuatoriana.

Conclusiones

El presente estudio evidencio una prevalencia mayor de *H.pylori* con relación NHPH en pacientes ecuatorianos. Asociaciones significativas de estos microorganismos a diagnósticos clínicos como gastritis crónica, gastritis aguda y cáncer gástrico no fueron observadas. Sin embargo, la detección de genes de virulencia en *H. pylori* evidencio la asociación del gen *vacsI* a pacientes con gastritis aguda y el gen *iceA1* a pacientes con dispepsia. Con respecto a NHPH, se identificó 5 genes de virulencia comunes en *H.pylori* pero con una prevalencia menor (alrededor de 14%) y se determinó que los genes *dupA* y *babA2* están asociados a pacientes con dispepsia.

A nuestro conocimiento, este trabajo preliminar reporta la prevalencia de 7 genes de virulencia en *H. pylori* y en NHPH en una población ecuatoriana. Este estudio abre paso a futuras investigaciones que permitan confirmar los presentes resultados y determinar la prevalencia de diferentes especies de NHPH, así como la composición genómica en biopsias gástricas.

Perspectivas futuras

- Secuenciación de un grupo de pacientes NHPH positivos con cuadro clínico definido para validar los estudios preliminares.
- Identificar las especies NHPH encontradas en la población de estudio.
- Profundizar si ciertas especies NHPH están más asociadas a ciertas enfermedades que otras.
- Investigar la presencia de NHPH en poblaciones que tienen contacto cercano con animales y zonas rurales para establecer posibles vías de transmisión.
- Estudio longitudinal para personas identificadas con NHPH
- Profundizar en las variantes alélicas predominantes de los genes de virulencia evaluados, y establecer una asociación más específica a los diagnósticos clínicos (*H.pylori*).

Referencias

1. Abu-Taleb, A. M. F., Abdelattef, R. S., Abdel-Hady, A. A., Omran, F. H., El-korashi, L. A., Abdel-aziz El-hady, H., & El-Gebaly, A. M. (2018). Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA* and *iceA* Genes and Their Association with Gastrointestinal Diseases. *International Journal of Microbiology*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/4809093>
2. Amjad, N., Osman, H. A., Razak, N. A., Kassian, J., Din, J., & bin Abdullah, N. (2010). Clinical significance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *iceA* genotype status. *World Journal of Gastroenterology*, 16(35), 4443–4447. <https://doi.org/10.3748/WJG.V16.I35.4443>
3. Ansari, S., Kabamba, E. T., Shrestha, P. K., Aftab, H., Myint, T., Tshering, L., ... Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* bab characterization in clinical isolates from Bhutan, Myanmar, Nepal and Bangladesh. *PLOS ONE*, 12(11), e0187225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187225>
4. Arévalo, A., Trespalacios, A., Otero, W., Mercado, M., & Poutou, R. (2012). Prevalence of *cagA*, *vacA*, *babA2* and *iceA* Genes in *H. pylori* Strains Isolated from Colombian Patients with Functional Dyspepsia. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 61(No 1), 33–40. Retrieved from <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6112012033.pdf>
5. Argent, R. H., Hale, J. L., El-Omar, E. M., & Atherton, J. C. (2008). Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9), 1062–1067. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001818-0>
6. Atherton, J. C., Cover, T. L., Twells, R. J., Morales, M. R., Hawkey, C. J., & Blaser, M. J. (2009). Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2979–2982. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449485>
7. Bagheri, N., Azadegan-Dehkordi, F., Rafieian-Kopaei, M., Rahimian, G., Asadi-Samani, M., & Shirzad, H. (2016). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *Microbial Pathogenesis*, 100, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.016>
8. Bento-Miranda, M., & Figueiredo, C. (2014). *Helicobacter heilmannii* sensu lato: an overview of the infection in humans. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17779–17787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17779>
9. Boyanova, L., Yordanov, D., Gergova, G., Markovska, R., & Mitov, I. (2010). Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(3), 343–350. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9448-y>
10. Carlosama-Rosero, Y., Bolaños-Bravo, H., Sierra-Tórres, C., & Rosero, E. (2018). Asociación de los genotipos *cagA*, *vacA* e *IceA* de *H. pylori* con la gastritis crónica y folicular en una población colombiana con alto riesgo de cáncer gástrico. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.03.004>
11. Cervantes-García, E. (2016). *www.medigraphic.org.mx Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 63). Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
12. Con, S. A., Takeuchi, H., Nishioka, M., Morimoto, N., Sugiura, T., Yasuda, N., & Con-Wong, R. (2010). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *babA2* and *babA2/B* in

- Costa Rica and Japan. *World Journal of Gastroenterology*, 16(4), 474–478. <https://doi.org/10.3748/WJG.V16.I4.474>
13. Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., & Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1328–1333. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5418.1328>
 14. da Costa, D. M., Pereira, E. dos S., & Rabenhorst, S. H. B. (2015). What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 21(37), 10563–10572. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10563>
 15. De Groote, D., Van Doorn, L.-J., Van den Bulck, K., Vandamme, P., Vieth, M., Stolte, M., ... Ducatelle, R. (2005). Detection of Non-*pylori Helicobacter* Species in "*Helicobacter heilmannii*"-Infected Humans. *Helicobacter*, 10(5), 398–406. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2005.00347.x>
 16. Debets-Ossenkopp, Y. J., Reyes, G., Mulder, J., Aan De Stegge, B. M., Peters, J. T. A. M., Savelkoul, P. H. M., ... Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2003). Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 141–145. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg023>
 17. Douraghi, M., Mohammadi, M., Oghalaie, A., Abdirad, A., Mohagheghi, M. A., Hosseini, M. E., ... Mohajerani, N. (2018). *dupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection, 41, 18. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47776-0>
 18. Feliciano, O., Gutierrez, O., Valdés, L., Fragoso, T., Calderin, A. M., Valdes, A. E., & Llanes, R. (2015). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, and *iceA* Genotypes in Cuban Patients with Upper Gastrointestinal Diseases. *BioMed Research International*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/753710>
 19. Gatti, L. L., Módena, J. L. P., Payão, S. L. M., Smith, M. de A. C., Fukuhara, Y., Módena, J. L. P., ... Brocchi, M. (2006). Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Tropica*, 100(3), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.08.014>
 20. Gong, Y., Peng, X., He, L., Liang, H., You, Y., & Zhang, J. (2015). The distribution of *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949* and *jhp0951* genes of *Helicobacter pylori* in China. *BMC Gastroenterology*, 15, 115. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0341-z>
 21. González, C. A., Figueiredo, C., Lic, C. B., Ferreira, R. M., Pardo, M. L., Ruiz Liso, J. M., ... Sanz-Anquela, J. M. (2011). *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* Genotypes as Predictors of Progression of Gastric Preneoplastic Lesions: A Long-Term Follow-Up in a High-Risk Area in Spain. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(5), 867–874. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.1>
 22. Goudarzi, H., Rezaee, H., Rafizadeh, M., & Taghavi, A. (2012). *Determination of the Status of Helicobacter pylori sabA Gene in Relation to Clinical Findings. J Med Bacteriol* (Vol. 1). Retrieved from http://applications.emro.who.int/imemrf/J_Med_Bacteriol/J_Med_Bacteriol_2012_1_1_3_8.pdf
 23. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 202–23, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00041-08>
 24. Hernández, C., Serrano, C. A., Villagrà, A., Torres, J., Venegas, A., Harris, P. R., & Paul Harris, C. R. (2016). *Helicobacter pylori vacA* virulence factor in uncultured *Helicobacter heilmannii sensu lato* from an infected child. *JMM Case Report*.

- <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005026>
25. Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., ... Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, *153*(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
 26. Iwanczak, B., Biernat, M., Iwanczak, F., Grabinska, J., Matusiewicz, K., & Gosciniak, G. (2012). The clinical aspects of *Helicobacter heilmannii* infection in children with dyspeptic symptoms. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *63*(2), 133–136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653899>
 27. Joosten, M., Flahou, B., Meyns, T., Smet, A., Arts, J., De Cooman, L., Haesebrouck, F. (2013). Case Report: *Helicobacter suis* Infection in a Pig Veterinarian. *Helicobacter*, *18*(5), 392–396. <https://doi.org/10.1111/hel.12054>
 28. Joosten, M., Lindén, S., Rossi, M., Tay, A. C. Y., Skoog, E., Padra, M., ... Smet, A. (2016). Divergence between the Highly Virulent Zoonotic Pathogen *Helicobacter heilmannii* and Its Closest Relative, the Low-Virulence “*Helicobacter ailurogastricus*” sp. nov. *Infection and Immunity*, *84*(1), 293–306. <https://doi.org/10.1128/IAI.01300-15>
 29. Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
 30. Lan, H.-C., Chen, T.-S., Li, A. F.-Y., Chang, F.-Y., & Lin, H.-C. (2012). Additional corpus biopsy enhances the detection of *Helicobacter pylori* infection in a background of gastritis with atrophy. *BMC Gastroenterology*, *12*(1), 182. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-182>
 31. Lee, H. S., Nomura, S., Murayama, S. Y., Ohtsu, H., Ishibashi, Y., Seto, Y., Nakamura, M. (2017a). Non- H. Pylori Helicobacters (NHPH) Could Cause Gastric Cancer in Human. *Gastroenterology*, *152*(5), S261. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(17\)31173-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(17)31173-3)
 32. Lee, H. S., Nomura, S., Murayama, S. Y., Ohtsu, H., Ishibashi, Y., Seto, Y., Nakamura, M. (2017b). Non- H. Pylori Helicobacters (NHPH) Could Cause Gastric Cancer in Human. *Gastroenterology*, *152*(5), S261. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(17\)31173-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(17)31173-3)
 33. Liu, J., He, L., Haesebrouck, F., Gong, Y., Flahou, B., Cao, Q., & Zhang, J. (2015). Prevalence of Coinfection with Gastric Non- *Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) Species in *Helicobacter pylori* -infected Patients Suffering from Gastric Disease in Beijing, China. *Helicobacter*, *20*(4), 284–290. <https://doi.org/10.1111/hel.12201>
 34. Loayza, M. F., Villavicencio, F. X., Santander, S. C., Baldeón, M., Ponce, L. K., Salvador, I., & Vivar Díaz, N. (2015). Improved method for extraction and detection of *Helicobacter pylori* DNA in formalin-fixed paraffin embedded gastric biopsies using laser micro-dissection. *MethodsX*, *2*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.11.003>
 35. Machado, A., Almeida, C., Salgueiro, D., Henriques, A., Vanechoutte, M., Haesebrouck, F., ... Cerca, N. (2013). Fluorescence in situ Hybridization method using Peptide Nucleic Acid probes for rapid detection of *Lactobacillus* and *Gardnerella* spp. *BMC Microbiology*, *13*, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-82>
 36. Manterola, C., & Otzen, T. (2015). *Los Sesgos en Investigación Clínica Bias in Clinical Research*. *Int. J. Morphol* (Vol. 33). Retrieved from

- <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v33n3/art56.pdf>
37. Matta, A. J., Pazos, A. J., Bustamante-Rengifo, J. A., & Bravo, L. E. (2017). Genomic variability of *Helicobacter pylori* isolates of gastric regions from two Colombian populations. *World Journal of Gastroenterology*, 23(5), 800–809. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i5.800>
 38. Miftahussurur, M., Syam, A. F., Makmun, D., Nusi, I. A., Zein, L. H., Zulkhairi, Yamaoka, Y. (2015). *Helicobacter pylori* virulence genes in the five largest islands of Indonesia. *Gut Pathogens*, 7, 26. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0072-2>
 39. Mladenova-Hristova, I., Grekova, O., & Patel, A. (2017). Zoonotic potential of *Helicobacter* spp. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(3), 265–269. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2016.11.003>
 40. Nogueira, C., Figueiredo, C., Carneiro, F., Gomes, A. T., Barreira, R., Figueira, P., van Doorn, L. J. (2001). *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *The American Journal of Pathology*, 158(2), 647–654. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159201>
 41. Nordenstedt, H., Graham, D. Y., Kramer, J. R., Rugge, M., Verstovsek, G., Fitzgerald, S., ... El-Serag, H. B. (2013). *Helicobacter pylori*-negative gastritis: prevalence and risk factors. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(1), 65–71. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.372>
 42. Nowak, T. V. (2000). *Optimal gastric biopsy localization in Helicobacter pylori infection*. *Gastroenterology* (Vol. 118). [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)80991-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)80991-9)
 43. Øverby, A., Murayama, S. Y., Michimae, H., Suzuki, H., Suzuki, M., Serizawa, H., Nakamura, M. (2017). Prevalence of Gastric Non-*Helicobacter pylori*-*Helicobacter* in Japanese Patients with Gastric Disease. *Digestion*, 95(1), 61–66. <https://doi.org/10.1159/000452400>
 44. Pakbaz, Z., Hasan Shirazi, M., Ranjbar, R., Reza, M., Gholi, M. K., Aliramezani, A., ... Shirazi, M. H. (2013). Frequency of *sabA* Gene in *Helicobacter pylori* Strains Isolated From Patients in Tehran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(9), 767–770. <https://doi.org/10.5812/ircmj.5044>
 45. Paniagua, G., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J., ... Vaca, S. (2009). Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-14>
 46. Patel, S. R. (2011). Determinants of *Helicobacter pylori* density in the human stomach and implications in disease. Retrieved from <http://eprints.nottingham.ac.uk/13106/>
 47. Perez, G. I., Rothenbacher, D., & Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 9(s1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1083-4389.2004.00248.x>
 48. Robles, C., Robles-Medran, C., Moncayo, M., Landivar, B., & Parrales, J. (2008). Is a 7-day *Helicobacter pylori* treatment enough for eradication and inactivation of gastric inflammatory activity? *World Journal of Gastroenterology*, 14(18), 2838–2843. <https://doi.org/10.3748/WJG.14.2838>
 49. Salimzadeh, L., Bagheri, N., Zamanzad, B., Azadegan-Dehkordi, F., Rahimian, G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Shirzad, H. (2015). Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. *Microbial Pathogenesis*, 80, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.01.008>

50. Santos, A., Magalhães Queiroz, D. M., Ménard, A., Marais, A., Rocha, G. A., Oliveira, C. A., ... Mégraud, F. (2003). New Pathogenicity Marker Found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* Genome. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, *41*(4), 1651–1655. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1651-1655.2003>
51. Santos, A., Queiroz, D. M. M., Ménard, A., Marais, A., Rocha, G. A., Oliveira, C. A., Mégraud, F. (2003). New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(4), 1651–1655. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1651-1655.2003>
52. Sasaki, T., Hirai, I., Izurieta, R., Kwa, B. H., Estevez, E., Saldana, A., Yamamoto, Y. (2009). Analysis of *Helicobacter pylori* Genotype in Stool Specimens of Asymptomatic People. *Laboratory Medicine*, *40*(7), 412–414. <https://doi.org/10.1309/LMZ2WWCD2A9MFTNW>
53. Schott, T., Rossi, M., & Hänninen, M.-L. (2011). Genome sequence of *Helicobacter bizzozeronii* strain CIII-1, an isolate from human gastric mucosa. *Journal of Bacteriology*, *193*(17), 4565–4566. <https://doi.org/10.1128/JB.05439-11>
54. Sheu, B.-S., Sheu, S.-M., Yang, H.-B., Huang, A.-H., & Wu, J.-J. (2003). Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in babA2 genopositive infection. *Gut*, *52*(7), 927–932. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801945>
55. Shiota, S., Suzuki, R., & Yamaoka, Y. (2013). The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *Journal of Digestive Diseases*, *14*(7), 341–349. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12054>
56. Siddique, I., Al-Qabandi, A., Al-Ali, J., Alazmi, W., Memon, A., Mustafa, A. S., & Junaid, T. A. (2014). Association between *Helicobacter pylori* genotypes and severity of chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric mucosal interleukin-8 levels: Evidence from a study in the Middle East. *Gut Pathogens*, *6*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13099-014-0041-1>
57. Solnick, J. V., & Schauer, D. B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(1), 59–97. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.59-97.2001>
58. Sugimoto, M., Watada, M., Woo Jung, S., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2012). Role of *Helicobacter pylori* Plasticity Region Genes in Development of Gastroduodenal Diseases. <https://doi.org/10.1128/JCM.00906-11>
59. Švec A, Kordas, P., Pavlis, Z., & J.Novotný. (2000). High Prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated Gastritis in a Small, Predominantly Rural Area: Further Evidence in Support of a Zoonosis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *35*(9), 925–928. <https://doi.org/10.1080/003655200750022968>
60. Talebi Bezmin Abadi, A. (2014). The *Helicobacter pylori* dupA: A Novel Biomarker for Digestive Diseases. *Frontiers in Medicine*, *1*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00013>
61. Van Den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Driessen, A., Debongnie, J.-C., Burette, A., ... Haesebrouck, F. (2005). Identification of Non-*Helicobacter pylori* Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs, and Cats. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, *43*(5), 2256–2260. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2256-2260.2005>
62. Vermoote, M., Vandekerckhove, T., Flahou, B., Pasmans, F., Smet, A., De Groote, D., Haesebrouck, F. (2011). Genome sequence of *Helicobacter suis* supports its role in

- gastric pathology. *Veterinary Research*, 42(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-51>
63. Wen, S., & Moss, S. F. (2009a). Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.11.016>
64. Wen, S., & Moss, S. F. (2009b). Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.11.016>
65. Winter, J. A., Letley, D. P., Cook, K. W., Rhead, J. L., Zaitoun, A. A. M., Ingram, R. J. M., ... Atherton, J. C. (2014). A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and Helicobacter pylori-induced metaplasia in the stomach. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(6), 954–963. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu154>
66. Yamaoka, Y., Kodama, T., Gutierrez, O., Kim, J. G., Kashima, K., & Graham, D. Y. (1999). *Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 37). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85136/pdf/jm002274.pdf>
67. Zhang, Y., Argent, R. H., Letley, D. P., Thomas, R. J., & Atherton, J. C. (2005). Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese Helicobacter pylori isolates in AGS gastric epithelial cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 786–790. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.786-790.2005>

PARTE III

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Primers de PCR para la amplificación de los genes *16srRNA H. pylori*, *16SrRNA Helicobacter spp.*, *cagA*, *vacA (s1)*, *iceA1*, *dupA*, *babA2*, *sabA* y *jhp0947*.

Genes	Secuencia (5'-3')	Annealing (°C)	Amplicon (pb)	Sensitividad (%)	Especificidad ^a (%)	ΔG^b (kcal/mol)	Complementariedad entre primers ^c	Referencia
<i>16S rRNA Helicobacter spp.</i>	F cggacacactggaactgaga	60	424 pb	97.7%	100	0.70	*Baja	Este estudio
	R gccttcgcaatgagtattcc					-0.06		
<i>16S rRNA H. pylori</i>	F gcgggatagtcagtcaggtg	60	706 pb	93.8	100	0.19	Baja	Valenzuela, 2016
	R aagattggctccacttcgca					0.08		
<i>cagA</i>	F gttgataaacgtgtcgcttc	50	350 pb	-	100	-0.56	Baja	Chiurillo et al., 2013
	R gggttgatgatatttccataa				100	0.13		
<i>vacA(s1)</i>	F cgcatacaactaacgctga	64	206 pb	-	100	0.60	Baja	Este estudio
	R gcataaccgccacttgatt				100	0.65		
<i>iceA1</i>	F ataagcggttggagtttgcg	63.1	220pb	-	100	0.50	Baja	Este estudio
	R tattcctgcaccaactcccc				98	1.96		
<i>dupA</i>	F tcacgcctaagacctcaaact	63	228 pb	-	100	1.56	Baja	Este estudio
	R ggatttaccgcttctctgtgc				100	0.24		
<i>babA2</i>	F aaagatgatcacagacgcgc	64	269 pb	-	100	0.59	Baja	Este estudio
	R ttgaggggttggtgcatgtg				99.7	1.56		
<i>sabA</i>	F cagcgggccaatacaactac	60	297 pb	-	100	1.47	Baja	Este estudio
	R ctaacaaatcgctcccaccg				100	0.95		
<i>jhp0947</i>	F ttaagcgtccccaatcccat	62	229 pb	-	100	2.06	Baja	Este estudio
	R Tcttccccttgctcgtgaa				100	1.35		

^a NCBI identity parameter

^b mFold Gibbs energy

^c <http://unafold.rna.albany.edu/>

Tabla 2. Procedimiento estándar de PCR de los primers utilizados para la detección de genes de virulencia.

Set	Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen	T (°C) de annealing	Tamaño del fragmento	MgCl ₂	Primers	Ciclos
1	F	gttgataacgctgctcgttc	<i>cagA</i>	50 °C	350pb	1.50 mM	0.4 µM	35
	R	gggttgatgatatttccataa						
2	F	ataagcgggtggagtttgcg	<i>iceA1</i>	63.1°C	220pb	2.50 mM	0.2 µM	37
	R	tattcctgcaccaactcccc						
3	F	ttaagcgtcccaatcccat	<i>Jhp0947</i>	62°C	229 pb	2.15 mM	0.4 µM	40
	R	tcttccccttgctcgtgaa						
4	F	cgcatcaacactaacgctga	<i>vacAs1</i>	64 °C	206 pb	2.50 mM	0.4 µM	40
	R	gcataaccgccacttgatt						
5	F	aaagatgatcacagacgcgc	<i>babA2</i>	64°C	269 pb	2.00 mM	0.4 µM	37
	R	ttgaggggtgttgcattgtg						
6	F	tcacgcctaagactcaaact	<i>dupA</i>	63 °C	228 pb	2.50 mM	0.4 µM	40
	R	ggattaccgcttctctgtgc						
7	F	cagcgggccaatacaactac	<i>sabA</i>	60 °C	297 pb	2.50 mM	0.4 µM	40
	R	ctaacaatcgctcccaccg						

Tabla 3. Características demográficas y diagnóstico clínico de la población en estudio

Datos Epidemiológicos	Problemas de estómago (n=175)						Total (n=242)
	Cáncer gástrico N (%)	Gastritis aguda N (%)	Gastritis crónica N (%)	Dispepsia N (%)	No problemas de estómago N (%)	No datos N (%)	
Localización Geográfica							
Región sierra	22(12)	36 (19.7)	56 (30.6)	16 (8.7)	47(25.7)	6 (3.3)	183
Región costa	6(12.7)	9 (19.2)	14(29.8)	8 (17)	10(21.3)	0(0)	47
Región amazónica	1(16.7)	0(0)	2(33.3)	3(50)	0 (0)	0(0)	6
No datos	2 (33.3)	0(0)	0(0)	0(0)	0 (0)	4(67)	6
Edad							
20-37	2(3.6)	10(18.2)	23(41.8)	1(1.8)	17(30.9)	2(3.6)	55
37-54	5(8.2)	10(16.4)	16(26.2)	12(19.7)	17(27.9)	1(1.6)	61
54-71	13(14.9)	21(24.1)	23(26.4)	11(12.7)	18(20.7)	1(1.2)	87
71-88	10(29.4)	4(11.8)	10(29.4)	3(8.9)	5(14.7)	2(5.9)	34
No datos	1(16.7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(83.3)	6
Sexo							
Hombres	13(16.7)	16(20.5)	22(28.2)	7(9)	19(24.4)	1(1.3)	78
Mujeres	17(10.7)	29(18.2)	50(31.5)	20(12.6)	38(23.9)	5(3.1)	159
No datos	1(20)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(80)	5
Tratamiento							
Antibióticos	3(10.7)	6(21.4)	17(60.7)	2(7.1)	0(0)	0(0)	28
IBP	5(11.4)	12(27.3)	18(40.9)	7(15.9)	0(0)	2(4.6)	44
Otros	4(50)	2(25)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	8
Sin tratamiento	16(10.81)	23(15.5)	34(23)	14(9.5)	57(38.5)	4(2.7)	148
No datos	3(21.4)	2(14.3)	3(21.4)	2(14.3)	0(0)	4(28.6)	14

Tabla 4. Prevalencia de especies *Helicobacter* en las biopsias gástricas de antro y cuerpo (n=190).

	N patients	Antro (A)	Cuerpo (C)	A/C	*P-value
<i>H. pylori</i>	122	12(8.2%)	13(10.7%)	97(79.5%)	1.00
<i>Non-pylori</i>	68	14(20.6%)	19(27.9%)	35(51.5%)	0.49

*P-value: test McNemar

Tabla 5. Prevalencia de *H. pylori* y NHPH en los diferentes diagnósticos clínicos (n=242)

Cuadro Clínico	NHPH N (%)	<i>Helicobacter pylori</i> N (%)	Negativo N (%)
Cáncer Gástrico (CG)	9 (11.8)	15(10.6)	7 (28)
Gastritis aguda (Ga)	13(17.1)	27(19.2)	5(20)
Gastritis crónica (Gc)	28(36.8)	39(27.7)	5(20)
Dispepsia	7(9.21)	18(12.8)	2(8)
No problemas de estómago (NPE)	15(19.7)	36(25.5)	6(24)
No datos	4(5.3)	6(4.3)	0(0)
Total	76	141	25

*P-value <0.05, Modelo de regresión múltiple, calculo OR.
Ver Información Suplementaria Tabla A1.

Tabla 6. Asociación de los genes de virulencia presentes en *H. pylori* y los diferentes diagnósticos clínicos de la población en estudio (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico).

Gen	Cáncer Gástrico		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	21(19.1)	1(6.7)	0.30	0.26	0.03-2.43	0.33	0.04-3.02	0.33
<i>cagA</i>	25(26)	1(8.3)	0.26	0.21	0.03-2.10	0.40	0.04-3.62	0.42
<i>Jhp0947</i>	33(30)	5(33.3)	1.17	0.79	0.37-3.68	0.80	0.20-3.15	0.75
<i>dupA</i>	55(50)	8(53.3)	1.14	0.81	0.39-3.37	0.97	0.28-3.40	0.96
<i>vacAs1</i>	60(54.6)	6(40)	0.55	0.30	0.19-1.66	0.89	0.23-3.41	0.87
<i>babA2</i>	80(73.4)	7(46.7)	0.32	0.04	0.11-0.95	0.78	0.20-3.03	0.72
<i>sabA</i>	95(86.4)	12(80)	0.63	0.51	0.16-2.50	1.14	0.22-5.95	0.88
Gen	Gastritis crónica		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	18(18.9)	7(17.9)	0.94	0.89	0.36-2.46	0.94	0.35-2.54	0.90
<i>cagA</i>	18(21.7)	8(24.2)	1.16	0.77	0.45-2.99	0.79	0.28-2.22	0.66
<i>Jhp0947</i>	35(36.8)	11(28.2)	0.67	0.34	0.30-1.52	0.74	0.31-1.73	0.48
<i>dupA</i>	47(49.5)	22(56.4)	1.32	0.47	0.62-2.80	1.38	0.62-3.09	0.43
<i>vacAs1</i>	56(58.9)	18(46.2)	0.59	0.18	0.28-1.26	0.52	0.23-1.15	0.11
<i>babA2</i>	65(68.4)	29(76.3)	1.49	0.37	0.63-3.53	1.11	0.45-2.78	0.82
<i>sabA</i>	81(85.3)	34(87.2)	1.18	0.77	0.39-3.52	0.93	0.28-3.01	0.90
Gen	Gastritis aguda		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	21(21)	4(14.8)	0.65	0.48	0.20-2.10	0.66	0.20-2.13	0.48
<i>cagA</i>	18(21.4)	7(28)	1.43	0.49	0.52-3.94	1.34	0.46-3.91	0.59
<i>Jhp0947</i>	34(34)	10(37)	1.14	0.77	0.47-2.76	1.16	0.47-2.85	0.75
<i>dupA</i>	50(50)	16(59.3)	1.45	0.39	0.61-3.44	1.49	0.61-3.64	0.38
<i>vacAs1</i>	50(50)	21(77.8)	3.50	0.01	1.30-9.40	3.66	1.34-9.99	0.01
<i>babA2</i>	72(72.7)	18(66.7)	0.75	0.54	0.30-1.87	0.70	0.27-1.81	0.47
<i>sabA</i>	83(83)	26(96.3)	5.33	0.11	0.68-41.9	5.90	0.73-47.9	0.09
Gen	Dispepsia		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	18(15.5)	7(38.9)	3.46	0.02	1.19-10.1	3.23	1.07-9.81	0.04
<i>cagA</i>	20(20.2)	6(35.3)	2.15	0.18	0.71-6.53	2.49	0.74-8.39	0.14
<i>Jhp0947</i>	40(34.5)	6(33.3)	0.95	0.92	0.33-2.72	0.85	0.28-2.58	0.77
<i>dupA</i>	59(50.9)	10(55.6)	1.21	0.71	0.44-3.28	1.28	0.45-3.64	0.64
<i>vacAs1</i>	62(53.5)	12(66.7)	1.74	0.30	0.61-4.96	1.60	0.53-4.79	0.40
<i>babA2</i>	79(68.7)	15(83.3)	2.28	0.21	0.62-8.37	2.49	0.63-9.84	0.19
<i>SabA</i>	99(85.3)	16(88.9)	1.37	0.69	0.29-6.52	1.23	0.26-5.93	0.79

Tabla 7. Asociación de los genes de virulencia presentes en NHPH y los diferentes diagnósticos clínicos de la población en estudio (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico).

Gen	Cáncer Gástrico		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>cagA</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>Jhp0947</i>	1 (1.5)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>dupA</i>	4 (6.3)	1 (11.1)	1.88	0.59	0.19-18.9	3.00	0.22-39.3	0.40
<i>vacAs1</i>	7(11.1)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>babA2</i>	6 (9.38)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>sabA</i>	10(16.4)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
Gen	Gastritis crónica		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>cagA</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>Jhp0947</i>	1(2.22)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>dupA</i>	4(8.89)	1(3.57)	0.38	0.40	0.04-3.58	0.06	0.003-1.25	0.07
<i>vacAs1</i>	5(11.1)	2(7.41)	0.64	0.61	0.11-3.55	0.66	0.09-4.74	0.68
<i>babA2</i>	4(8.89)	2(7.14)	0.79	0.79	0.13-4.62	0.51	0.05-5.44	0.58
<i>sabA</i>	8(18.6)	2(7.7)	0.36	0.23	0.07-1.87	0.40	0.06-2.63	0.34
Gen	Gastritis aguda		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>cagA</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>Jhp0947</i>	0(0)	1(7.7)	1.00	-	-	-	-	-
<i>dupA</i>	5(8.5)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>vacAs1</i>	5(8.6)	2(15.4)	1.93	0.47	0.33-11.2	2.08	0.34-12.8	0.43
<i>babA2</i>	5(8.5)	1(7.7)	0.90	0.93	0.09-8.42	0.47	0.03-7.80	0.60
<i>sabA</i>	7 (12.7)	3(23.1)	2.06	0.35	0.45-9.35	1.69	0.32-8.83	0.54
Gen	Dispepsia		OR Crudo	P-value	IC	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>iceA1</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>cagA</i>	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-	-
<i>Jhp0947</i>	1(1.52)	0(0)	1.00	-	-	-	-	-
<i>dupA</i>	3 (4.55)	2(28.6)	8.4	0.04	1.13-62.5	15.5	1.04-227	0.04
<i>vacAs1</i>	6(9.23)	1(14.3)	1.64	0.67	0.17-15.9	1.43	0.14-14.8	0.77
<i>babA2</i>	4(6.06)	2(28.6)	6.2	0.06	0.90-42.6	12.4	1.26-122	0.03
<i>SabA</i>	8(12.9)	2(28.6)	2.7	0.28	0.45-16.3	4.09	0.53-31.9	0.18

Tabla 8. Prevalencia de genes de virulencia en diversos estudios epidemiológicos en Asia, Europa, África y América.

País	Descripción de la población	<i>Helicobacter sp.</i>	Grupo de estudio (N)	Genes de virulencia (%)							Referencias
				<i>sabA</i>	<i>babA2</i>	<i>vacAs1</i>	<i>dupA</i>	<i>jhp0947</i>	<i>iceA1</i>	<i>cagA</i>	
Thailandia	Pacientes dispepsicos y cáncer gástrico	<i>H. pylori</i>	74	-	-	100	-	-	-	57	Subsomwong et al,2017
Laos	Gastritis crónica, ulcera gástrica, ulcera duodenal y cáncer gástrico	<i>H.pylori</i>	119	-	-	99	-	-	-	99	Vannaraths et al, 2014
Indonesia	Síntomas de dispepsia, gastritis, ulcera gástrica y ulcera duodenal	<i>H.pylotri</i>	44	-	-	98	7	-	61	98	Miftahussurur et al,2015
Palestina	Síntomas gastroduodenales	<i>H.pylori</i>	44	-	-	43	-	-	64	66	Essawi et al, 2013
Irán	Síntomas de dispepsia	<i>H.pylori</i>	82	87	-	-	-	-	-	-	Pakbaz et al,2013
*Países sur asiático	Síntomas de dispepsia, Gastritis, Ulcera péptica, cáncer gástrico	<i>H.pylori</i>	406	-	79	-	-	-	-	-	Ansari et al 2017
China	Gastritis crónica activa, Ulcera péptica, cáncer gástrico	<i>H.pylori</i>	141	-	-	-	-	21	-	-	Gong et al,2015
Egipto	Gastritis, ulcera péptica y cáncer gástrico	<i>H.pylori</i>	54	-	-	-	-	-	46	57	Abu-Taleb et al, 2018
Bulgaria	Ulcera duodenal, ulcera gástrica, gastritis crónica y reflujo esofágico	<i>H.pylori</i>	176	-	49	89	-	-	69	82	Boyanova et al, 2010
Bélgica	Gastritis	<i>H.pylori</i>	76	-	-	-	38	-	-	-	Argent et al, 2007
España	Lesiones gastricas preneoplasticas	<i>H.pylori</i>	243	-	-	37	-	-	-	47	
México	Gastritis crónica	<i>H. pylori</i>	143	-	8	68	-	-	-	39	Paniagua et al, 2009
Colombia	Dispepsia funcional	<i>H.pylori</i>	122	-	57	-	-	-	87	70	Arevalo et al, 2012
Colombia	Gastritis crónica	<i>H.pylori</i>	73	-	-	56	-	-	18	40	Carlosama et al, 2018
Colombia	Ulcera gástrica, ulcera duodenal, cáncer y gastritis	<i>H.pylori</i>	94	-	-	77	-	55	-	80	Sugimoto et al.,2011
Brasil	Gastritis	<i>H.pylori</i>	144	-	-	-	92	-	-	-	Gomes et al,2008
Brasil	Gastritis, ulcera duodenal y gástrica carcinoma	<i>H.pylori</i>	200	-	-	-	-	70	-	64	Santos et al, 2003
Cuba	Ulcera péptica	<i>H.pylori</i>	75	-	-	72	-	-	-	-	Feliciano et al,2015
Ecuador	Gastritis aguda y crónica, cáncer gástrico y dispepsia	<i>H.pylori</i>	242	85	71	55	51	33	18	23	Este estudio
		NHPH	242	14	8	11	7	1	0	0	
Chile	Caso reporte mucosa gástrica humana	NHPH	1	-	-	100	-	-	-	-	Hernández et al., 2016
Finlandia	Aislado de mucosa gástrica humana	NHPH	1	-	-	100	-	-	-	-	Schott et al 2011)

*Bangladesh, Nepal, Myanmar, Bhuta

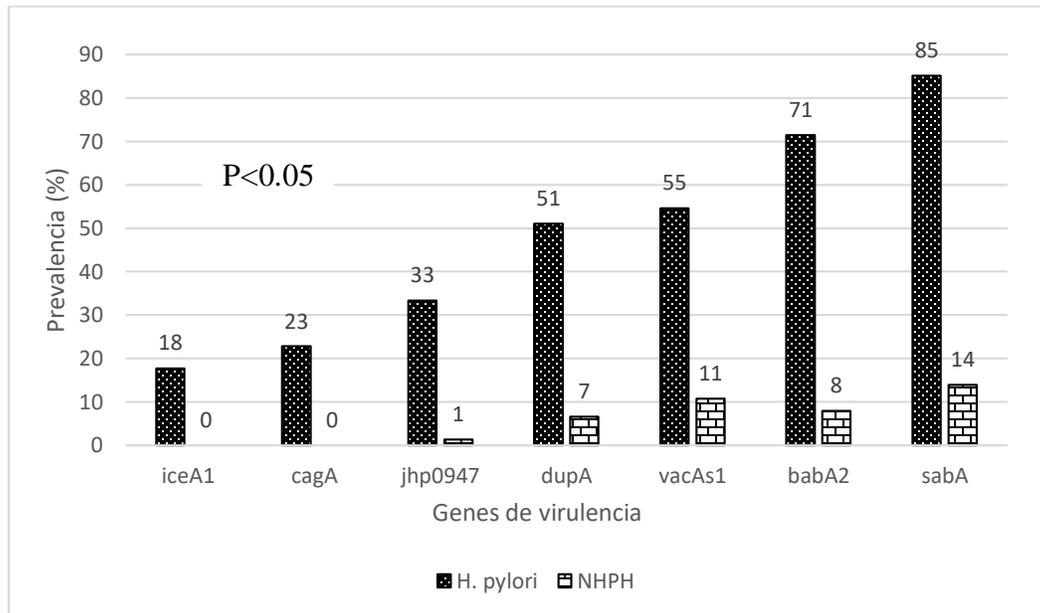


Figura 4. Prevalencia de genes de virulencia en biopsias gástricas positivas para *H. pylori* y NHPH mediante detección por PCR (n=242).

PARTE IV

ANEXOS

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla A1. Asociación de la presencia de *H. pylori* y NHPH en los cuadros clínicos presentados por los pacientes (ajustado por sexo, edad y tratamiento tipo antibiótico) .

Detección	Cáncer Gástrico		OR Crudo	IC	P-value	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>H. pylori</i>	110(57.3)	15(48.4)	0.70	0.33-1.50	0.36	0.71	0.31-1.64	0.42
NHPH	64(33.3)	9(29.0)	0.82	0.36-1.88	0.64	0.76	0.31-1.83	0.54
Negativo	18(9.38)	7(22.6)	2.82	1.06-7.45	0.04	2.59	0.93-7.20	0.07
	Gastritis crónica		OR Crudo	IC	P-value	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>H. pylori</i>	95(59.4)	39(54.2)	0.81	0.46-1.42	0.46	0.82	0.45-1.48	0.50
NHPH	45(28.1)	28(38.9)	1.63	0.91-2.92	0.10	1.58	0.85-2.93	0.14
Negativo	20(12.5)	5(6.94)	0.52	0.19-1.45	0.21	0.55	0.19-1.57	0.26
	Gastritis aguda		OR Crudo	IC	P-value	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>H. pylori</i>	100(55.9)	27(60)	1.19	0.61-2.31	0.62	1.19	0.61-2.36	0.61
NHPH	59(32.9)	13(28.9)	0.83	0.40-1.69	0.60	0.82	0.39-1.69	0.58
Negativo	20(11.2)	5(11.1)	0.99	0.35-2.81	0.99	1.00	0.35-2.87	0.99
	Dispepsia		OR Crudo	IC	P-value	OR ajustado	IC	P-value
	No	Si						
<i>H. pylori</i>	116(56.6)	18(66.7)	1.53	0.66-3.58	0.32	1.67	0.70-4.02	0.25
NHPH	66(32.2)	7(25.9)	0.74	0.30-1.83	0.51	0.72	0.28-1.81	0.48
Negativo	23(11.2)	2(7.41)	0.63	0.14-2.85	0.55	0.56	0.12-2.56	0.45

Análisis Primer-BLAST

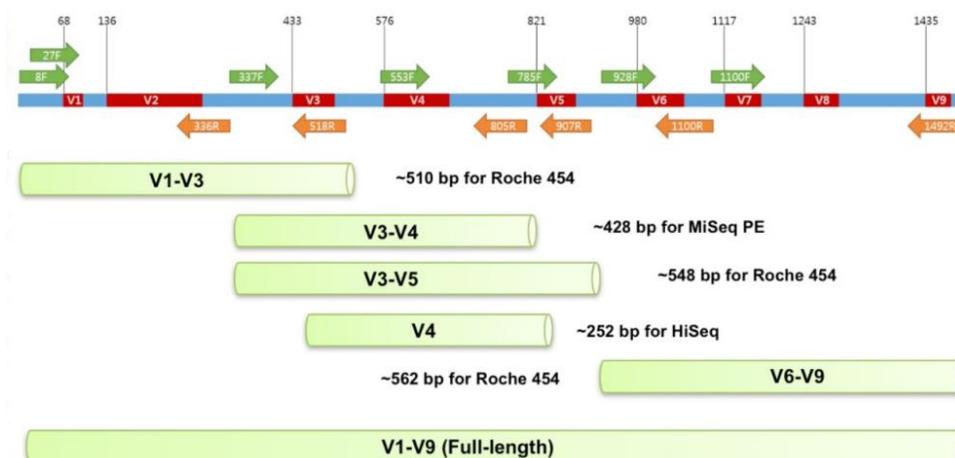


Figura 1A . Ubicación de la zona hipervariable región 16srRNA en pb(Pacific biosciences,2014)

Primers 16s rRNA para *Helicobacter* sp.

Fw: cggacacactggaactgaga

Rw: gccttcgcaatgagtattcc

Muestra objetivo: región 16srRNA de *Helicobacter felis*

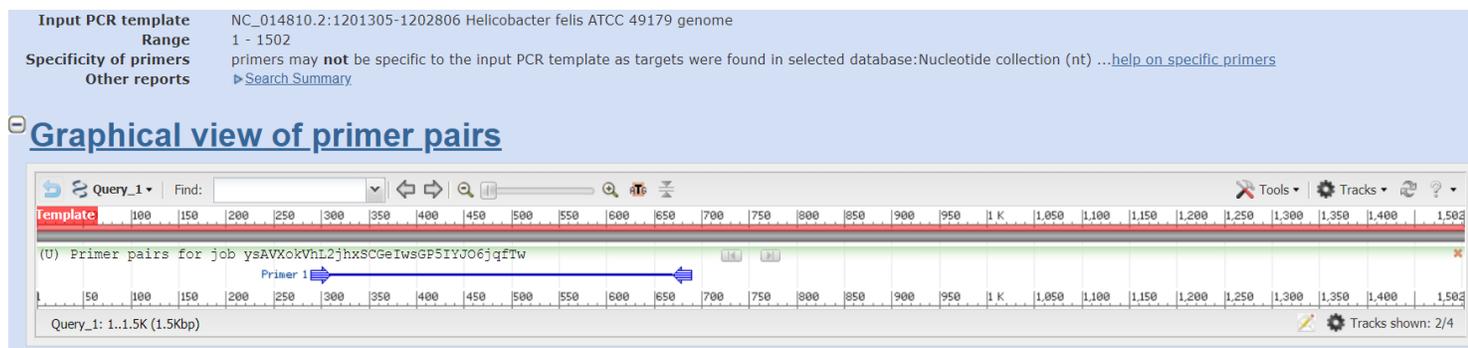


Figura 2A . Análisis en Primer-BLAST para los primers de *Helicobacter* sp.

Los primers se unen a una región comprendida por 290 pb-650pb, que comprende a la región hipervariable V1-V4 indicada en la Figura 1A.

Primers 16s rRNA para *Helicobacter pylori*

Fw: gcgggatagtcagtcaggtg

Rw: aagattggctccacttcgca

Muestra objetivo: región 16srRNA de *Helicobacter pylori* 26695

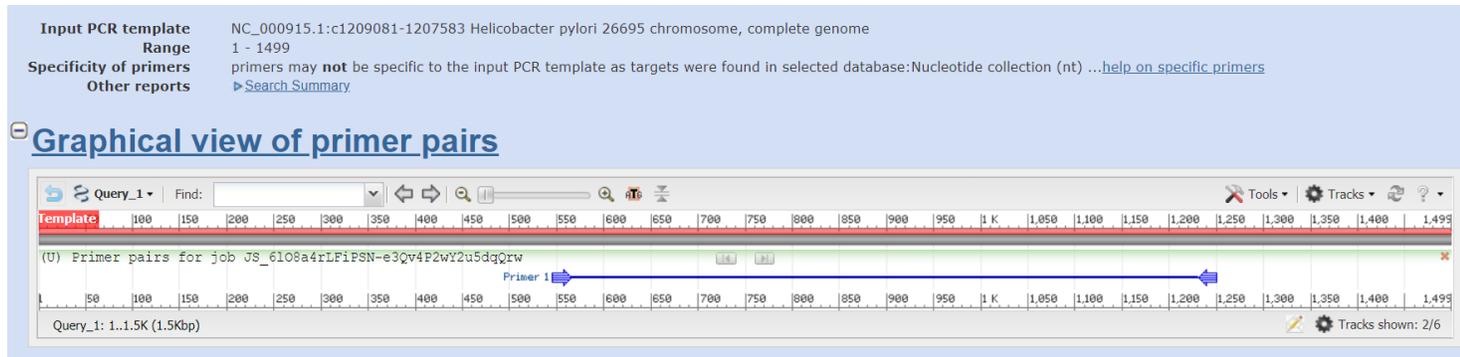


Figura 3A Análisis en Primer-BLAST para primers de *Helicobacter pylori*

Los primers se unen a una región comprendida por 546 pb-1231pb, que corresponde a la región hipervariable V4-V9 indicada en la Figura 1A.