

## DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *HELICOBACTER PYLORI* EN BIOPSIAS GÁSTRICAS

**Marinero María Belén**

Becaria EVC-CIN. Laboratorio de Práctica Profesional de Bioquímica, Hospital José María Cullen.  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Director: Dr. Fabián A. Tedeschi.

Co-Directora: Dra. Pamela Bucci.

Área: Ciencias de la salud

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, factores de virulencia, gastritis

### INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacilo gram-negativo, curvado y microaerófilico que puede encontrarse en la mucosa gástrica del estómago humano merced a su capacidad de sintetizar y secretar la enzima ureasa que modifica el pH gástrico, generando condiciones permisivas para la colonización. *H. pylori* es, tal vez, el patógeno gástrico de más amplia distribución mundial, aceptado como agente causal de gastritis crónica, enfermedad ulcero péptica y como un factor etiológico importante en la secuencia que conduce al carcinoma gástrico. A pesar de la alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, (que en algunas regiones alcanza al 90 % de la población) sólo una minoría de los individuos infectados evoluciona hacia una enfermedad maligna. Entre los factores de virulencia de la bacteria merecen destacarse los productos de los genes *cagA* y *vacA*. *CagA* activa vías que inducen la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la respuesta inflamatoria. No obstante, hay una variación considerable en la actividad vacuolizante de las diferentes cepas, principalmente debido a diferencias en la estructuras de las regiones Señal y Media de la proteína *VacA* (con alelos *s1* y *s2* y *m1* y *m2*, respectivamente) y a las diferentes combinaciones alélicas posibles. La vacuolización y las manifestaciones clínicas más severas se asocian con combinaciones alélicas particulares: la combinación alélica *cagA+vacA s1m1* está relacionada con mayores niveles de actividad vacuolizante que la de los alelos *cagA-/vacA s2m2*, confiriendo mayor probabilidad de desarrollo de cáncer gástrico. Además de *CagA* y *VacA*, otro elemento importante para la bacterias es la proteína *BabA*. El principal papel patogénico de la proteína *BabA2* consiste en el efecto sinérgico que presenta con los otros factores de patogenia, ya que optimiza la acción de estos últimos, lo que da lugar a una mayor alteración del epitelio gástrico.

Título del proyecto: Infección por *Helicobacter pylori*: estudio de factores asociados a la bacteria y al huésped con impacto en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Instrumento: CAI+D (50520190100198L)

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Secretaría de Ciencia Arte y Tecnología, UNL.

Director: Dr. Fabián Zalazar.

Co-director: Dr. Fabián A. Tedeschi.

## **OBJETIVOS**

- Detectar y analizar los genotipos de *H. pylori* presentes en pacientes ambulatorios de nuestra región, centrándonos en los factores de virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*.
- Correlacionar estos factores de la bacteria con las alteraciones en la mucosa gástrica, a fin de evaluar factores de riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico.

## **METODOLOGÍA**

### **Pacientes y muestras**

Para la selección de pacientes aptos para la investigación, se determinaron los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

- *Criterio de inclusión:* pacientes a los que se les haya indicado estudio endoscópico digestivo alto, por síntomas como: ardor, pirosis, dolor abdominal recurrente, pérdida de peso o intolerancia selectiva a ciertas ingestas.
- *Criterio de exclusión:* Pacientes que hubieran recibido en los últimos 15 días terapia con antibióticos, antagonistas de receptores H<sub>2</sub> e Inhibidores de la bomba de protones.

Se procesaron un total de 66 muestras de mucosa gástrica de pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión, atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital "Dr. J.M. Cullen" (Santa Fe), con indicación de video endoscopia digestiva alta, que dieron su consentimiento informado para el estudio. Para el test de la ureasa rápida se colocaron las dos primeras muestras de biopsia en caldo de urea de Christensen al 2% con el agregado de rojo fenol. El análisis histológico incluyó coloración con Giemsa para detectar *H. pylori* así como una evaluación de las lesiones en la mucosa gástrica utilizando los criterios de clasificación estandarizados.

### **Extracción y purificación de ADN**

Para la extracción y purificación de ADN de las muestras, se llevó a cabo un protocolo basado en el tratamiento de las mismas con Proteinasa K y posterior purificación por solventes. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su uso en las distintas reacciones de amplificación.

### **Identificación molecular de *H. pylori* por amplificación del gen *hsp60***

Para la detección de *H. pylori*, las muestras de ADN obtenidas de biopsias gástricas fueron sometidas a amplificación por una PCR de punto final, utilizando oligonucleótidos específicos de secuencia para el gen *hsp60* y reactivos comerciales (GoTaq® Green Master Mix, Promega Corp.), conteniendo una ADN polimerasa termoestable, dNTPS, Cl<sub>2</sub>Mg.

### **Amplificación por PCR de punto final de secuencias correspondientes a los genes de factores de virulencia de *H. pylori***

En aquellas muestras positivas para *H. pylori*, se procedió a evaluar el perfil de factores de virulencia correspondiente. Para llevar a cabo esta detección, se realizó una PCR múltiple de punto final para los genes *cagA* y *vacA*, y una PCR individual para *babA2*.

### **Análisis de los productos de amplificación en las PCR de punto final.**

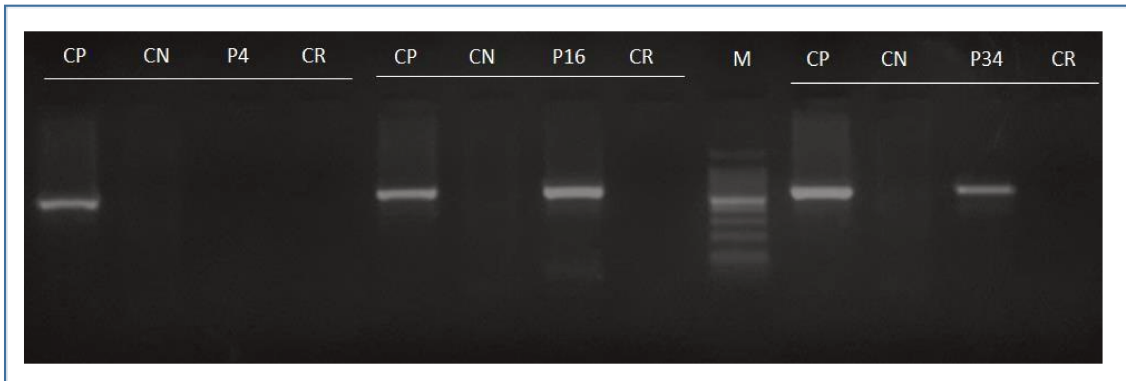
En todos los casos, los productos formados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con un colorante fluorescente apropiado (SYBR® Safe DNA gel stain, Life Technologies), en presencia de 2 marcadores de tamaño molecular (con

fragmentos que difieren en 50 y 100 bp cada uno) y documentados por fotografía bajo iluminación con luz UV.

## **RESULTADOS**

Para la detección de *H. pylori* en muestras de mucosa gástrica se utilizó una PCR que consto con dos rondas de amplificación de secuencias del gen hsp60 (Nested- PCR). Las muestras positivas, generaron un fragmento de 590 pb en la primera ronda de amplificación y uno de 501 pb en la segunda, con el uso de un par de oligonucleótidos de apareamiento interno de la primer secuencia seleccionada.

Figura 1.

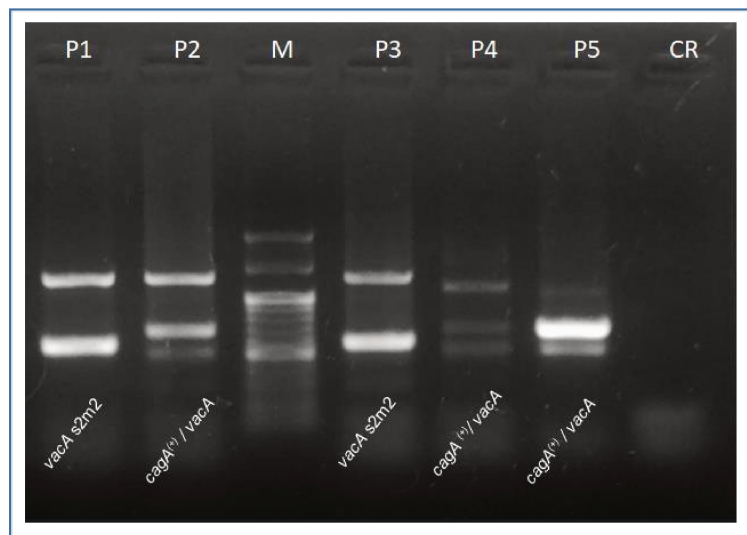


**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación del gen hsp60 de *H. pylori* (1ra ronda). Referencias: CP: Control Positivo, CN: Control negativo, P: Paciente M: Marcador de tamaño molecular 50bp. INBIO HIGHWAY®. CR: Control de Reactivos

Se evaluó la especificidad de la reacción utilizando muestras ADN de microorganismos no relacionados (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*) y de ADN humano. Al mismo tiempo, la amplificación de los genes 16S rRNA y beta-actina humana fueron usados como controles internos de la calidad de las muestras. No se obtuvieron bandas de amplificación en los controles negativos ensayados. Los resultados de la nested PCR fueron tenidos en cuenta en conjunto con los resultados del test rápido de ureasa y del análisis histológico. En base a éste análisis, para continuar con el estudio de genotipificación, se consideraron como muestras *H. pylori* (+) aquellas muestras de pacientes con resultados positivos en al menos 2/3 pruebas distintas. Este criterio permitió seleccionar 37 muestras de pacientes, quienes tuvieron un diagnóstico de gastritis con distintos grados de severidad, de acuerdo al análisis histológico realizado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "Dr. J.M. Cullen". Histológicamente se pudieron observar 2 grupos de pacientes *H. pylori* (+):

- Pacientes con Gastritis Crónica Leves (GCL): 9 pacientes.
- Pacientes con Gastritis Crónica Moderada (GCM): 28 pacientes

En cuanto al género, el 70% (26) y el 30% (11) fueron mujeres y hombres, respectivamente. Al analizar los genotipos presentes en las muestras *H. pylori* (+), la presencia del gen cagA se detectó en el 51% (19) del total de los pacientes con gastritis crónica, mientras que el gen babaA2 estuvo presente en el 43% (16) de las muestras analizadas. La totalidad de los pacientes presentaron el gen vacA, en distintas variantes y combinaciones el 67,6% correspondió a la variante vacA s1m1, seguida por las variantes vacA s1m2y vacA s2m2, en un 30% y 5%, respectivamente. No se encontró la variante vacAs2m1. Figura 2



**Figura 2.** PCR para Factores de Virulencia de *H.pylori*. Referencia: P: Paciente M: Marcador de tamaño molecular 50bp. INBIO HIGHWAY®. CR: Control de Reactivos

Las combinaciones *cagA*(+)/*vacA* m1s1 se detectó en el 38% de los pacientes, mientras que el genotipo llamado “triple virulento” *cagA*(+)/*vacA*m1s1/*babA2* lo fue en el 27% del total (Tabla 1). Además, se observó que los pacientes que presentaban GCM, poseían cepas con la variante *vacAs*1m1 o trivirulentas.

### **CONCLUSIONES**

Pudimos observar que la combinación alélica *cagA*/*vacA* s1m1 o trivirulentas se encontró con más frecuencia en el grupo de pacientes estudiado, asociándose con cuadros de gastritis con mayores alteraciones histológicas (GCM). Como en nuestros trabajos anteriores (Bucci P, 2023) los resultados aportarían información que combinados con los de la anatomía patológica resultarían en un mejor seguimiento de pacientes portadores de cepas virulentas y de esta forma instaurar una terapia adecuada para prevenir la aparición de lesiones severas a nivel del epitelio gástrico.

**Tabla 1.** Frecuencia de genotipos de *H. pylori* en pacientes con diagnóstico de Gastritis Crónica.

<b>Genotipo</b>	<b>N (%)</b>
<i>cagA</i> (+)	19 (51)
<i>cagA</i> (-)	18 (49)
<i>vacA</i> s1m1	25 (68)
<i>vacA</i> s1m2	10 (30)
<i>vacA</i> s2m1	0 (0)
<i>vacA</i> s2m2	2 (5)
<i>babA2</i> (+)	16 (43)
<i>babA2</i> (-)	21 (57)
<i>cagA</i> (+)/ <i>vacAs</i> 1m1	14 (38)
<i>cagA</i> (+)/ <i>vacAs</i> 1m1/ <i>babA2</i>	10 (27)

### **BIBLIOGRAFÍA**

Baroni MR, Bucci P, Gianì RN, Giusti A, Tedeschi FA, Salvatierra E, Barbaglia Y, Jimenez F, Zalazar FE. 2018. Usefulness of rapid urease test samples for molecular analysis of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Rev Argent Microbiol. 50:369- 364. Bucci P, Barbaglia Y, Tedeschi FA, Zalazar FE. *Helicobacter pylori* infection: a balance between bacteria and host. 2023. Rev Argent Microbiol. 55:60-67