

ARTICULO ORIGINAL

Utilidad del jugo gástrico en el diagnóstico de infección por *helicobacter pylori*.

Parte II: correlación entre las determinaciones por reacción de polimerasa en cadena (PCR) y las determinaciones morfológicas.

Laguens R.M.³, Golijow C.D.¹, Abba M.¹, Collura J.E.², Marrone R.², Dioguardi R.,² Lequerica J.², Camaño M.²

¹Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA), Fac. Cs. Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118 S/N, B1900AVW, Argentina. ²Centro Gastroenterológico Platense. Calle 3 n° 1096, 1900, La Plata, Argentina. ³Cátedra de Patología B, Fac. Cs. Médicas, UNLP. Calle 60 y 120, 1900, La Plata, Argentina

INTRODUCCIÓN

En estudios anteriores, hemos comprobado que existe una muy fuerte correlación entre la detección, mediante procedimientos morfológicos, de *H. pylori* en el jugo gástrico y su presencia en material de biopsia de pacientes dispépticos. Aún más, la positividad para *H. pylori* en las muestras de jugo gástrico fue superior a la determinada sobre las muestras de biopsias antrales de esos mismos pacientes. Nuestros propios datos mostraron que la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos con mucosas gástricas sin alteraciones o con una leve gastritis, llegaba al 76,19%, mientras que en pacientes con daño de la mucosa de moderado a severo, la prevalencia de la infección llegaba al 100%. Asimismo, pudimos determinar que existía una muy fuerte asociación entre la intensidad del daño histológico de la mucosa y la presencia del factor de virulencia CagA, evaluado a través de técnicas de análisis de ADN. (Laguens y col, ver parte I).

En el presente trabajo se intentó determinar si mediante las mismas técnicas de análisis de ADN se podría tipificar genotípicamente a *H. pylori* en el jugo gástrico, además de confirmar su presencia, correlacionando estos hallazgos con los resultados del estudio morfológico del mismo jugo.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Toma de muestras y extracción de ADN

Se utilizaron 15 jugos gástricos, obtenidas por aspiración, provenientes de pacientes de ambos sexos, cuyas edades variaron entre los 18 y los 72 años (Media: 49 años), los que fueron sometidos a procedimientos endoscopios por presentar síntomas de dispepsia. La identificación de *H. pylori* fue realizada por microscopía, previa tinción con Giemsa, y por técnicas de amplificación de ADN por PCR.

Para el análisis de ADN se centrifugó el jugo gástrico a 2.000 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer de digestión (50 mM de Tris-HCl pH 8.5; 1 mM de EDTA; 1% de Triton X-100 y 0.5% de Tween 20) con 200 µg/ml de Proteinasa K (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e incubados a 56°C por 2 hs. Para la inactivación de la proteínasa, las muestras fueron incubadas a 100°C por 12 minutos. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

Detección de *H. Pylori* por PCR

La calidad del ADN aislado de todas las muestras estudiadas fue evaluada por PCR, utilizando el locus de la Timidina quinasa humana como locus control, según protocolos previamente descritos (Abba y col., 1999). La presencia de *H. pylori* y la genotipificación del gen bacteriano *cagA* fue realizado por PCR, utilizando los cebadores para los loci *vacA* y *cagA* respectivamente (van Doorn y col., 1998). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 50 µl, compuesto por 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 25 pmol de cada juego de los cebadores correspondientes a los genes *vacA* o *cagA*, 1 U de Taq polimerasa (GIBCO-BRL, USA) y 10 µl del lisado de tejido como ADN molde. Las reacciones para el estudio de los genes *vacA* y *cagA* fueron realizadas por separado y en duplicado.

Las mezclas de reacción fueron cicladas con 2 min de desnaturalización a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 s a 92°C, 45 s a 50°C y 45 s a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C. En cada amplificación se utilizaron controles negativos (ADN humano obtenido de la línea celular K562) y controles positivos obtenidos de biopsias analizadas microscópicamente y diagnosticadas como *H. pylori* positivas mediante tinción con Colorante de Giemsa.

Para el análisis de los productos de amplificación, 5 µl de cada reacción fueron sembrados en geles de poliacrilamida 6% y sometidos a electroforesis junto con un marcador de peso molecular (pGem, Promega, Madison, USA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación con luz UV de 320 nm (Figura 1).

Ensayos estadísticos

Las diferencias en la sensibilidad para la detección de *H. pylori* entre las técnicas de microscopía y PCR fueron establecidas por Chi cuadrado. La estimación del riesgo relativo (OR) fue realizada utilizando el paquete estadístico SSPS (Versión 10.0.1) considerando un intervalo de confianza (IC) del 95%

Procesamiento del jugo gástrico para microscopía de luz:

Inmediatamente de obtenido el jugo gástrico, aproximadamente la mitad del mismo se destinó a pruebas de ADN. Para con la alícuota restante, se adicionó a la jeringa utilizada un dispositivo plástico comercial (Cytoshuttle®) consistente en un envase de material plástico conteniendo un filtro de nitrocelulosa de 20 mm. de diámetro a través del cual se hizo pasar el líquido, reteniéndose en la membrana los elementos formes del jugo, y descartándose la fase líquida. Lo retenido en la membrana se transfirió por simple contacto a un portaobjetos, según instrucciones del fabricante.

Sobre la impronta así obtenida se realizó una tinción con colorante de Giemsa con técnica rápida, sumergiendo los extendidos en la solución colorante y sometiéndolos a la acción de un horno a microondas por espacio de 20 segundos.

RESULTADOS:

Resultados del análisis del jugo gástrico con microscopio de luz: Mediante el procedimiento empleado, se detectó la presencia de estructuras correspondientes a *H. pylori* en 7 de las 15 muestras evaluadas.

Examen microscópico de las biopsias antrales: De las 15 biopsias, 7 presentaron una gastritis moderada a severa, en actividad, mientras que las 8 restantes eran normales o presentaban un mínimo proceso inflamatorio crónico inespecífico. 1 de las muestras con gastritis severa en actividad presentó una amplia metaplasia enteroide, mientras que dos de las muestras con gastritis leves presentaron áreas de metaplasia enteroide y signos de atrofia focal.

Determinación de *H. pylori* en muestras antrales: Se detectó la presencia de estructuras bacilares correspondientes a *H. pylori* en 5 de las 15 muestras evaluadas. De las muestras normales o con gastritis leve, sólo una arrojó resultados positivos para *H. pylori*, correspondiendo las 4 restantes a muestras con gastritis severa en actividad, sin signos de metaplasia enteroide.

Correlación entre los hallazgos histológicos y el análisis de *H. pylori* en el jugo gástrico: Los 5 pacientes cuyas muestras biópsicas arrojaron positividad para *H. pylori* también presentaron positividad en su jugo gástrico, mientras que los dos casos restantes de positividad en el jugo correspondieron a otros tantos casos con gastritis severa en actividad, que en el estudio histológico arrojaron resultados negativos para *H. pylori*.

Determinación de *Helicobacter pylori* mediante PCR: 12 de las 15 muestras evaluadas se mostraron positivas para el gen *VacA*, correspondiendo 9 de ellas a la variante S1 y las 3 restantes a la variante S2. De las muestras positivas, 8 presentaron también expresión del gen de virulencia *CagA*, aunque las reacciones fueron de diversa intensidad. Los resultados se resumen en la Tabla I.

Muestra	VacA	CagA	Hp en jugo	Hp en biopsia	Histología
1	S2	++	+	+	Gastritis severa
2	S1	-	-	-	Mucosa normal
3	S1	++	+	+	Gastritis severa
4	S1	+	-	-	Gastritis leve
5	S1	+	+	-	Gastritis severa
6	S1	+	+	-	Gastritis severa
7	--	--	-	-	Mucosa normal
8	S2	+	+	+	Gastritis moderada
9	--	--	-	-	Mucosa normal
10	--	--	-	-	Gastritis leve
11	S1	++	+	+	Gastritis severa
12	S2	--	-	-	Mucosa normal
13	S1	--	-	-	Mucosa normal
14	S1	++	+	+	Gastritis severa
15	S1	--	-	-	Mucosa normal

TABLA I

DISCUSIÓN:

Helicobacter pylori es un patógeno humano de gran importancia y la colonización bacteriana persistente de la mucosa gástrica puede causar enfermedades gastrointestinales severas (van Doorn y col., 1998). Esta bacteria no es un organismo uniforme, presentando poblaciones constituidas por individuos fenotípicamente diversos, pero a la vez genéticamente relacionados (van Doorn, 2001).

Muchos marcadores genéticos de *H. pylori* (como los genes *vacA* y *cagA*) han sido identificados y asociados a factores de virulencia, hecho que les conferirían implicaciones clínicas y epidemiológicas de relevancia (van Doorn, 2001; Figueroa y col., 2002; Louw y col., 2001; Saruc y col., 2002).

Los resultados aquí obtenidos corroboran los resultados que se obtuvieron en trabajos previos. Estos permiten afirmar que el análisis del jugo gástrico aporta una serie de datos que complementan los

obtenidos a partir del estudio biopsico de la mucosa gástrica en pacientes dispépticos, aumentando porcentualmente las chances de una mejor determinación del status clínico-histológico de un paciente determinado y del status de infección con *H. pylori*.

El incremento de detección de *H. pylori* en el jugo gástrico mediante la simple observación microscópica, fue notoriamente superior al encontrado mediante su determinación en el material de biopsia, tanto cuando fue considerado este incremento en forma global entre todos los pacientes evaluados como cuando se discriminó por intensidad de daño a la mucosa. Especulamos que estas diferencias se deben al muestreo efectuado: mientras que la biopsia representa a un pequeño sector de la mucosa gástrica, elegido al azar, el jugo gástrico representaría lo que estaría aconteciendo en una mayor superficie. Estos datos están más de acuerdo con los habitualmente citados en la bibliografía (Louw y col., 2001). Si se incorporan a este análisis los resultados obtenidos por técnicas de detección de ADN bacteriano, vemos que el porcentaje de positividad, determinado por la presencia de genes *VacA*, se incrementa aún más.

Los resultados obtenidos respecto de la prevalencia de la infección por *H. pylori* mostraron que es mucho mayor que la detectada por las técnicas convencionales de microscopía. En este sentido, el 91% de las muestras biopsicas analizadas resultaron positivas para la detección del gen *vacA*, indicando infección bacteriana. Hemos obtenido resultados similares utilizando el jugo gástrico para determinaciones de ADN. Los mismos resultados han sido reportados por otros autores cuando se realizaron estudios caso-control (Louw y col., 2001).

Mediante el estudio conjunto del material biopsico y de la citología del jugo gástrico, sería posible disminuir los falsos negativos que pueden presentarse a la hora de evaluar el status de infección por *H. pylori* y el status inflamatorio de la mucosa en este tipo de pacientes.

La alta correlación entre los hallazgos biopsicos y lo encontrado en el análisis del jugo gástrico, tanto desde el punto de vista morfológico como del análisis de genes de *H. pylori*, nos permiten proponer al simple estudio del jugo gástrico como una alternativa válida para el seguimiento del paciente en el tiempo y para la determinación de erradicación a largo plazo de la infección por *H. pylori*, sin necesidad de realizar una endoscopia, abaratando costos.

Muchas de las personas infectadas por *H. pylori* no desarrollan secuelas clínicas. Esta ausencia de secuelas puede deberse tanto a factores bacterianos como a factores del hospedador, factores ambientales y geográficos (van Doorn, 2001; Ando y col., 2002; Crespo y Suh, 2002). En este sentido, los factores bacterianos parecen jugar un rol preponderante (van Doorn, 2001; Yakoob y col., 2002; Sheu y col., 2002; She y col., 2001). Entre los factores de virulencia bacteriana, las investigaciones se han focalizado en dos genes bacterianos que aparecen ligados a la inflamación. Estos factores corresponden a la citotoxina *VacA* y la proteína de alto peso molecular *CagA* (van Doorn, 2001; Andreson y col., 2002; Louw y col., 2001; Figueroa y col., 2002). La función de la proteína *CagA* aún no ha sido claramente establecida, pero los pacientes infectados, y que presentan úlceras o carcinomas gástricos, poseen de manera predominante cepas bacterianas *CagA*-positivas, mientras que los pacientes con ausencia de sintomatología presentan predominantemente cepas *CagA*-negativas (Figueroa y col., 2002; Louw y col., 2001; Saruc y col., 2002). Por otra parte, las variantes del gen *vacA* han sido también asociadas al desarrollo de úlcera y carcinoma gástrico (Figueroa y col., 2002; Chattopadhyay y col., 2002).

En los últimos años, numerosos trabajos han utilizado las técnicas basadas en el análisis de ADN como herramientas para la identificación y genotipificación de esta bacteria en pacientes sintomáticos y asintomáticos (van Doorn y col., 1998; Chisholm y col., 2002; Ciesielska y col., 2002; Piana y col., 2002; Smith y col., 2002; Vaira y col., 2002). Las técnicas clásicas de diagnóstico, basadas en la microscopía o incluso el cultivo, presentan una baja sensibilidad, siendo imposible por estos métodos la tipificación correcta de los genes de virulencia.

En síntesis, los datos aportados en el presente trabajo corroboran lo que hemos descrito previamente, destacando la utilidad que presenta el estudio del jugo gástrico en el análisis del status

de infección de la mucosa gástrica por *H. pylori*. El simple análisis de infección bacteriana por técnicas moleculares no brindaría por sí misma información sobre la probabilidad de progresión de la enfermedad hacia estadios más comprometidos de la mucosa gástrica. En cambio, la identificación y genotipificación de las cepas de *H. pylori* a través de los genes *VacA* y *CagA*, indicaría la presencia de cepas bacterianas virulentas, con alta probabilidad de desarrollo de inflamación de la mucosa gástrica, con la consecuente progresión de la enfermedad. Como ha sido sugerido por otros autores (Van Doorn y col, 1998; van Doorn, 2001; Vaira y col, 2002; She y col, 2001), la detección de genes bacterianos asociados a genes de virulencia deberían ser incluidos en los estudios clínicos, epidemiológicos y terapéuticos, con el fin de identificar y estratificar a los pacientes portadores de cepas virulentas, con el fin de implementar planes terapéuticos económicos y adecuados.

A la hora de analizar costos y beneficios del arsenal diagnóstico disponible, la simple evaluación del jugo gástrico mediante su observación microscópica y el análisis de ADN bacteriano y su genotipificación, brinda una serie de beneficios que merecen ser destacados: a la simple confirmación histológica de infección por *H. pylori* se le suma la chance cierta de tipificación de factores de virulencia mediante una sencilla técnica de centrifugado, que reemplaza la más engorrosa técnica de obtener material para análisis de ADN a partir de una muestra incluida en parafina. Pero aún más importante es el hecho de que es posible evaluar la evolución de la enfermedad y la erradicación de *H. pylori* después del esquema terapéutico elegido, sin necesidad de recurrir a una nueva endoscopia. La simple aspiración de contenido gástrico mediante una sonda nasogástrica permitirá contar con material suficiente como para evaluar citológicamente la existencia de daño residual de la mucosa y detectar molecularmente la existencia de cepas virulentas de *H. pylori*, y con esto determinar la existencia de erradicación y efectividad del tratamiento.

Desde un principio, los costos también disminuyen, pues si bien existe un ligero incremento de costos por el análisis de ADN en la primer consulta, los resultados aportados desde el vamos permiten ajustar los esquemas terapéuticos a aquellos que brinden una mayor seguridad de erradicación de cepas virulentas. A posteriori, los costos también se ven reducidos al evitarse una endoscopia de control y el nuevo análisis histológico consecuente. Dado que el método ofrece mayor certeza diagnóstica, su implementación brindará un mejor control clínico-epidemiológico de la patología en estudio.

REFERENCIAS.

1. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, Kusugami K, van der Ende A, Kuipers EJ, Kusters JG, Blaser MJ. 2002. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol* 40(1):239-46
2. Andreson H, Loivukene K, Sillakivi T, Maaros HI, Ustav M, Peetsalu A, Mikelsaar M. 2002. Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol* 40(1):298-300
3. Chattopadhyay S, Datta S, Chowdhury A, Chowdhury S, Mukhopadhyay AK, Rajendran K, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB. 2002. Virulence genes in *Helicobacter pylori* strains from West Bengal residents with overt *H. pylori*-associated disease and healthy volunteers. *J Clin Microbiol* 40(7):2622-5
4. Chisholm SA, Teare EL, Patel B, Owen RJ. 2002. Determination of *Helicobacter pylori vacA* allelic types by single-step multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol* 35(1):42-6
5. Ciesielska U, Jagoda E, Marciniak Z. 2002. Value of PCR technique in detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded material. *Folia Histochem Cytobiol* 40(2):129-30
6. Crespo A, Suh B. 2001. *Helicobacter pylori* infection: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Arch Pharm Res* 24(6):485-98

7. Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, Faundez G, Acuna R. 2002. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* VacA and CagA and gastric diseases in Chile. *J Med Microbiol* 51(4):300-4
8. Laguens R.M., Golijow CD., Abba M., Collura JE.
9. Louw JA, Kidd MS, Kummer AF, Taylor K, Kotze U, Hanslo D. 2001. The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Helicobacter* 6(4):268-73
10. Piana A, Are BM, Maida I, Dore MP, Sotgiu G, Realdi G, Mura I. 2002. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains. *New Microbiol* 25(2):123-30
11. Saruc M, Demir MA, Kucukmetin N, Kandiloglu AR, Akarca US, Yuceyar H. 2002. Histological and clinical predictive value of determination of tissue CagA status by PCR in *Helicobacter pylori* infected patients; results of the large population based study in western Turkey. *Hepatogastroenterology* 49(45):878-81
12. She FF, Su DH, Lin JY, Zhou LY. 2001. Virulence and potential pathogenicity of coccoid *Helicobacter pylori* induced by antibiotics. *World J Gastroenterol* 7(2):254-8
13. Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, Li C, Chu TC, Wu JJ. 2002. Presence of iceA1 but not cagA, cagC, cagE, cagF, cagN, cagT, or orf13 genes of *Helicobacter pylori* is associated with more severe gastric inflammation in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 101(1):18-23
14. Smith SI, Miehlike S, Oyediji KS, Arigbabu AA, Coker AO. 2002. Fingerprinting of Nigerian *Helicobacter pylori* isolates by plasmid profile and PCR. *J Basic Microbiol* 42(1):45-53
15. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. 2002. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 16 Suppl 1:16-23
16. van Doorn L.J., C. Figueiredo, R. Sanna, S. Pena, P. Midolo, E.K.W. Ng, J.C. Atherton, M.J. Blaser and W.G.V. Quint. 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol* 36:2597-2603
17. van Doorn LJ. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes. *Expert Rev Mol Diagn* 1(3):290-8
18. Yakoob J, Hu G, Fan X, Zhang Z. 2001. *Helicobacter pylori* detection in Chinese subjects: a comparison of two common DNA fingerprinting methods. *Br J Biomed Sci* 58(4):239-43