Comparación de *Helicobacter pylori* en cavidad oral y mucosa gástrica de acuerdo a genotipo de virulencia (*cagA* y *vacAm1*)

Ester Sepúlveda, Jessica Moreno, María L. Spencer, Sandra Quilodrán, Ursula Brethauer, Carlos Briceño y Apolinaria García

Universidad de Concepción,
Concepción, Chile.

Facultad de Odontología
Departamento de Patología y
Diagnóstico (ES, MLS, UB).
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología
(SQ, AG).
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina Interna
(CB).

Universidad Andrés Bello,
Concepción, Chile.

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias
Biológicas (JM).

Trabajo realizado en el Laboratorio
de Patogenicidad Bacteriana,
Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción.

Fuente de financiamiento: Proyecto
DIUC N°206.103.017-1.0, proyecto
Fondef N°D03i1105.

Los autores declaran no tener
conflictos de interés.

Recibido: 30 de agosto de 2011
Aceptado: 29 de febrero de 2012

Correspondencia a:
Ester Sepúlveda Tebache
esepulve@udec.cl

Comparison of *Helicobacter pylori* in oral cavity and gastric mucosa according to virulence genotype (*cagA* and *vacA* m1)

Objective: To compare the virulence genotype (*cagA* and *vacA* m1 genes) of *Helicobacter pylori* obtained simultaneously from gastric mucosa and oral cavity. **Material and Methods:** Gastric samples of 18 patients were obtained by endoscopic biopsies. Oral samples of these patients were obtained from dental plaque and saliva swabs from the floor of the mouth and the base of the tongue. All samples were studied by conventional PCR and real-time PCR (RT-PCR). Virulence genes *cagA* and *vacA* m1 were studied by RT-PCR. **Results:** According to presence and/or absence of *cagA* and *vacAm1* genes, seven different combinations were observed. **Conclusion:** These results suggest that there is a variety of genetic profiles of *Helicobacter pylori* in the stomach and oral cavity, with a predominance of less virulent genotypes in the patients included in this study (*cagA*-, *vacA* m1-).

Key words: *Helicobacter pylori*, virulence genes, real-time PCR.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, genes de virulencia, RPC en tiempo real.

Introducción

Helicobacter pylori ha sido asociado a una variedad de patologías gastro-duodenales, especialmente carcinoma gástrico¹. En Chile, el carcinoma gástrico es la principal causa de muerte en hombres y la tercera en mujeres². La prevalencia de *H. pylori* en Chile varía de 73 a 83%, dependiendo del área geográfica^{3,4}. Un estudio reciente⁵ realizado en niños entre 3 y 14 años de Santiago de Chile, demostró una prevalencia de 26%, con mayor proporción en los varones.

Helicobacter pylori posee una variedad de factores de virulencia como flagelo, morfología espiralada, adhesinas, enzimas y lipopolisacáridos^{6,7}. Destacan entre sus factores de virulencia las proteínas CagA y VacA, las cuales pueden ser investigadas más fácilmente a través de los genes que las codifican, que se denominan genes asociados a virulencia, específicamente en este caso, *cagA* y *vacA*⁸⁻¹¹. Cabe destacar que los genes *cagA* y *vacA* son actualmente importantes marcadores genéticos asociados a virulencia en *H. pylori*¹².

El gen *cagA* codifica la síntesis de la proteína CagA. La producción de esta proteína se potencia por la presencia de pH ácido y es mediada por un sistema de secreción tipo IV. La proteína CagA induce a nivel de las células epiteliales gástricas la producción de citoquinas inflamatorias, como la IL-8, y el reclutamiento de leucocitos. El efecto directo sobre las células gástricas es la reducción de la secreción de ácido¹³. Por otra parte, el gen *vacA* codifica la producción de toxina VacA, la que presenta un mosaico genético

basado en variaciones de alelos en las regiones medias (alelos m1 o m2 y subtipos) y variaciones de señalización (alelos s1 o s2 y subtipos)^{14,15}. Se ha observado que los tipos s1/m1 son más agresivos y son llamados Tox⁺¹⁶. La toxina VacA es secretada por aproximadamente 50% de los tipos de *H. pylori*, causando degeneración vacuolar de las células epiteliales gástricas y ulceración de la mucosa¹⁷. Se ha demostrado que los tipos *vacA* s1/m1 tienen una actividad citotóxica aumentada en comparación con los tipos s1/m2 y que los tipos s2/m2 no poseen ninguna actividad citotóxica¹⁴.

Estudios realizados por nuestro grupo^{18,19}, incluyendo muestras de biopsias gástricas de pacientes de diversas regiones de Chile, señalan la importancia de los genes *cagA* y *vacA* m1 en la patogenicidad de *H. pylori*, razón por la cual fueron considerados en esta investigación. Cabe destacar que los resultados de dichas investigaciones generaron el consecuente desarrollo de un kit molecular en proceso de patentamiento ("Un kit molecular de diagnóstico de cepas virulentas de *Helicobacter pylori*", patente en trámite, número de solicitud: 1520-08).

Diferentes investigaciones demuestran la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral (placa bacteriana y saliva), actuando como un reservorio para la bacteria²⁰⁻²⁵. Algunos autores han encontrado una asociación entre la presencia de *H. pylori* en mucosa gástrica y oral²⁶⁻³³. En una investigación previa realizada por nuestro grupo, se observó la co-existencia de la bacteria en ambas localizaciones mediante RPC en tiempo real (RPC-TR)³⁴. En este estudio se observó que de 54 pacientes, 39% (n = 21)

presentó muestras gástricas positivas para *H. pylori*. Todas las muestras orales de estos 21 pacientes resultaron negativas para *H. pylori* mediante cultivo. Sólo una muestra de placa bacteriana fue positiva mediante RPC convencional y todas las muestras de saliva resultaron negativas. Sin embargo, las muestras orales de todos los pacientes resultaron positivas mediante RPC-TR (20/21 placa bacteriana, 21/21 saliva del piso de la boca y 20/21 saliva de la base de la lengua).

Se ha estudiado la presencia de genes de virulencia de *H. pylori* proveniente de estómago y cavidad oral del mismo paciente^{35,36}, pero de acuerdo a nuestro conocimiento, no existen investigaciones en la población chilena. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue comparar los genotipos asociados a virulencia (*cagA* y *vacA* m1) de *H. pylori* obtenido simultáneamente de mucosa gástrica y cavidad oral a partir del mismo paciente.

Material y Métodos

Pacientes. Se estudiaron muestras gástricas y orales de 21 pacientes con indicación médica de endoscopia digestiva alta, de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Regional de Concepción. Se excluyeron pacientes con tratamiento antimicrobiano para *H. pylori* y se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente. Esta investigación fue aprobada por la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción.

Obtención de muestras. Las muestras gástricas y orales fueron obtenidas de cada paciente al momento de realizar la endoscopia digestiva. Las muestras orales se obtuvieron de placa bacteriana sub-gingival, con una sonda dental, y las muestras de saliva fueron obtenidas del piso de boca

y base de lengua con tómulas de algodón estériles. Las biopsias gástricas se tomaron del antro y cuerpo durante la inspección endoscópica del estómago.

Aislamiento de ADN. El ADN del control positivo de *H. pylori* ATCC se obtuvo con el *kit* E.Z.N.A.® para ADN bacteriano, siguiendo las instrucciones del fabricante (OMEGA bio-tek, Norcross, GA, USA). Para las muestras orales se utilizó el *kit* BIO 101 Protocol Fast DNA E.Z.N.A.® (OMEGA bio-tek, Norcross, GA, USA) y para las muestras gástricas se utilizó el *kit* E.Z.N.A.® para ADN tisular (OMEGA bio-tek, Norcross, GA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diseño y elección de Oligos. Se obtuvo por lo menos 15 pares de partidores y sondas mediante el software Oligo 6.2, para la detección de β -actina (específica para ADN humano), para la región 16S ARNr de *H. pylori* y para los genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1, eligiendo finalmente sólo un par de ellos, usando los códigos de acceso de sus secuencias mostrados en la Tabla 1. La herramienta BLASTn (*Basic Local nucleotid Alignment Search Tool*), disponible en NCBI (National Center Biotechnology), permitió encontrar regiones con similitud de secuencias nucleótido por nucleótido. Los criterios de la selección de los partidores fueron los que tenían las mejores condiciones termodinámicas arrojadas por el programa Oligo 6.2 para el de β -actina y que además coincidieran con alguno ya probado por otros autores, tanto para el gen 16S ARNr³⁷, *cagA*³⁸ y *vacA* m1³⁹. Los porcentajes de identidad fueron de 100% para los oligos elegidos, dando un mayor puntaje de probabilidad de unión. En la Tabla 1 se detallan los partidores elegidos, los productos esperados y su código NCBI.

Tabla 1. Detección de *Helicobacter pylori*. Secuencias de partidores y sondas de la amplificación de las zonas de los genes 16S ARNr, *cagA*, *vacA* m1 y β -actina

Gen	Secuencia del partidor (5'-3')	Tamaño y localización del producto de amplificación
16S ARNr ^a		
Partidor sentido	TGC GAA GTG GAG CCA ATC TT	119 bp (1381-1499)
Partidor antisentido	GGA ACG TAT TCA CCG CAA CA	
Sonda	(FAM) CCT CTC AGT TCG GAT TGT AGG CTG CAA C (TAMRA)	
		(1408-1435)
<i>cagA</i> ^b		
Partidor sentido	ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A	298 bp (1217-1515)
Partidor antisentido	TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T	
<i>vacA</i> m1 ^c		
Partidor sentido	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G	290 bp (2741-3030)
Partidor antisentido	CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	
β -actina ^d		
Partidor sentido	CGG AAC CGC TCA TTG CC	289 bp (552-841)
Partidor antisentido	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	

^aacceso NCBI U00679, ^bacceso NCBI AB190937, ^cacceso NCBI HPU05676, ^d acceso NCBI BT019856.

RPC. Las muestras gástricas y orales fueron ratificadas con RPC convencional y RPC-TR mediante la amplificación de una región del gen 16S ADNr. Los genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1 fueron estudiados con RPC-TR. Las muestras de 3 pacientes fueron descartadas, ya que no existía suficiente muestra gástrica, dejando un total de 18 pacientes. Para confirmar la amplificación del ADN, como control interno, se investigó la presencia del gen de la β -actina mediante RPC-TR. Como control negativo se utilizó ADN de *Lactobacillus* spp., agua grado RPC como blanco y el control positivo ADN de *H. pylori* ATCC 43504.

Mezcla para RPC convencional. El preparado para RPC consistió en 10 ml de ADN, 2,5 ml de solución tampón (10X), 0,5 ml de dNTPs (10 mM), 1,25 ml de $MgCl_2$ (50 mM), 0,125 ml de ADN Taq polimerasa, H_2O grado RPC para un volumen total de 25 ml, y 1,25 ml de partidores sentido y antisentido, que se muestran en la Tabla 1. Los parámetros para RPC convencional consistieron en un período de pre-incubación inicial de 15 min a 95°C, un período de denaturación de 30s a 95°C, seguido de 45 ciclos de alineamiento a 55°C por 30s, un período de extensión a 72°C por 2 min y luego por 5 min, y finalmente enfriamiento a 4°C. Los productos RPC se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8% bajo luz UV.

Mezcla para RPC-TR. Detección de *H. pylori* 16S ARNr mediante RPC-TR con sonda de hidrólisis TaqMan. Se siguieron las instrucciones del fabricante para la mezcla de amplificación lista para usar LightCycler® TaqMan® Master, para el equipo de LightCycler 2.0 de Roche (catálogo 04735536001), que consiste en 9,1 μ L de H_2O grado RPC, 0,5 μ L de 10 μ M de sonda TaqMan, 1,4 μ L de mezcla de partidores 16S ARNr de concentración 10 μ M y 5 μ L de templado de ADN para un volumen final de 20 μ L. Los parámetros de las reacciones para el equipo de RPC LightCycler 2.0 de Roche consistieron en un período inicial de activación de la enzima a 95°C por 10

min, denaturación a 95°C por 10s, seguido de 50 ciclos de amplificación y alineamiento a 55°C por 10s y elongación a 72°C por 8s. La presencia de productos de amplificación específicos para *H. pylori* y controles positivos de *H. pylori* ATCC 43504 fueron monitoreados por la detección fluorescente positiva a 530 nm de la sonda de hidrólisis FAM-TAMRA en el software del equipo y confirmado por los tamaños de producto esperado de 119 bp en gel de agarosa al 2%, 80 v por 60 min en luz UV. Los controles positivos asociados al valor de T_m y amplicón, fueron previamente secuenciados en MacroGen Inc. Seoul, Korea.

Detección por RPC-TR con SYBR Green de los genes de virulencia de *H. pylori* *cagA* y *vacA* m1 y de las células totales con el gen β -actina como control interno. Se siguieron las instrucciones del fabricante de la mezcla lista para usar LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (catálogo 03515885001), la cual consistió en 10 μ L de H_2O libre de nucleasas, 1,6 μ L de $MgCl_2$ 25mM, 1,4 μ L de la mezcla de partidores *cagA*, *vacA* m1 o β -actina respectivamente, de concentración stock 10 μ M, 2 μ L de mezcla de SYBR Green y 5 μ L de templado de ADN para un volumen final de 20 μ L. Los parámetros para las reacciones de RPC LightCycler 2.0 sugeridos en el protocolo del fabricante consistieron en un período de activación de la enzima por 10 min a 95°C, denaturación a 95°C por 10s, seguido por 50 ciclos de amplificación con una temperatura de alineamiento de 55°C por 10s y elongación a 72°C por 14s, análisis de curva de *melting* 95°C, 69°C y 95°C. La presencia de productos de amplificación específicos para *H. pylori* y controles positivos para *H. pylori* ATCC 43504 fueron monitoreados a 530 nm para el fluoróforo SYBR Green intercalado en la elongación a 72°C mediante el software del equipo, con el respectivo análisis de la curva de *melting* característica de producto único y luego confirmado por su tamaño 298 bp para *cagA* y 290 bp para *vacA* m1 y 289 bp para β -actina y asociación con la curva de *melting* en gel de agarosa al 2%, 80v por 60 min en transiluminador UV. Los controles positivos asociados al valor de T_m y amplicón, fueron previamente secuenciados en MacroGen Inc. Seoul, Korea.

Resultados

Como se observa en la Tabla 2, se obtuvo 7 combinaciones diferentes de genes *cagA* y *vacA* m1, las que denominamos grupos. Ocho pacientes, correspondientes a los grupos 1 y 2, presentaban el mismo perfil de virulencia en estómago y boca, en base a los dos genes en estudio. Los restantes 10 pacientes, correspondientes a los grupos 3 al 7, presentaban cepas de *H. pylori* con perfiles genéticos asociados a virulencia diferentes en cavidad oral y mucosa gástrica.

También podemos observar en esta tabla que no se

Tabla 2. Detección de genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1 en pacientes con presencia de *H. pylori* en cavidad oral y mucosa gástrica

	Muestras orales		Muestras gástricas	
	<i>cagA</i>	<i>vacA</i> m1	<i>cagA</i>	<i>vacA</i> m1
Grupo 1 (n = 1)	+	—	+	—
Grupo 2 (n = 7)	—	—	—	—
Grupo 3 (n = 2)	+	—	—	—
Grupo 4 (n = 1)	—	+	+	+
Grupo 5 (n = 1)	—	—	+	+
Grupo 6 (n = 1)	—	—	+	—
Grupo 7 (n = 5)	—	—	—	+

+: RPC en tiempo real positivo. —: RPC en tiempo real negativo.

detectó en paciente alguno la presencia simultánea de *H. pylori* con su genotipo más virulento (*cagA*+, *vacA* m1+), ni en cavidad oral ni en mucosa gástrica. Sin embargo, al analizar por separado ambos compartimentos, se observa que en las muestras gástricas, dos pacientes (correspondientes a los grupos 4 y 5) poseían este genotipo. Dos pacientes presentaban cepas de *H. pylori* con el perfil *cagA*+, *vacA* m1- y cinco el perfil *cagA*-, *vacA* m1+. Por otra parte, en las muestras orales, tres pacientes presentaban el genotipo asociado a virulencia *cagA*+, *vacA* m1- (correspondientes a los grupos 1 y 3), un paciente presentaba el genotipo de *H. pylori* *cagA*-, *vacA* m1+ y los restantes pacientes (n = 14) presentaban cepas de *H. pylori* con el genotipo *cagA*-, *vacA* m1-.

Discusión

Varios estudios han demostrado la presencia de *H. pylori* simultáneamente en cavidad oral y mucosa gástrica, mostrando diferentes prevalencias, dependiendo de la población estudiada, la selección de la muestra y técnicas de detección de la bacteria^{26-33,40}. Mapstone⁴¹, demostró que la presencia de *H. pylori* en la boca de pacientes dispepticos es importante para su diseminación y considera la cavidad oral una potencial fuente de reinfección luego de la erradicación del microorganismo del estómago. Esto último, fue una de las motivaciones para realizar esta investigación.

Sin embargo, es sabido que la identificación de especies bacterianas de la cavidad oral es particularmente difícil debido a que existen más de 500 especies en la placa bacteriana oral⁴² y más de 700 especies en la cavidad oral en general⁴³. Por ello, es necesario contar con métodos lo más específicos y sensibles para la detección e identificación de *H. pylori*. La especificidad en la identificación de este microorganismo se evidencia en su cultivo bacteriológico, y se ha observado que muestras con cultivos gástricos positivos para *H. pylori* también presentan resultados positivos para muestras orales mediante RPC-TR³⁴, avalando la especificidad de este método molecular para esta bacteria. Sin embargo, en cuanto a la sensibilidad, algunos autores han reportado esfuerzos insatisfactorios para cultivar *H. pylori* de la cavidad oral⁴⁴. Esto puede deberse a un bajo número de bacteria en la boca debido a una inhibición producida por la compleja microbiota oral o debido a la forma cocoide de la bacteria, que no es detectable mediante técnicas de cultivo tradicionales⁴⁵. La conversión de la forma bacilar a cocoide se acompaña de una gran disminución de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml)⁴⁶. Se sabe que la forma cocoide es una forma viable pero no cultivable en los métodos clásicos de cultivo de este microorganismo, como el agar Columbia^{47,48}. Recientemente el trabajo de Al-Sulami y cols.⁴⁹, presenta la primera evidencia de crecimiento de *H. pylori* en agua potable municipal, esto

gracias al desarrollo de un medio selectivo, llamado agar modificado urea Columbia (MCUA)⁵⁰.

Diversos autores^{51,52} discuten la importancia de desarrollar nuevas técnicas para la detección, aislamiento y cultivo de bajos recuentos de *H. pylori* en placa bacteriana oral. De acuerdo a nuestros resultados, creemos que este problema ha sido parcialmente superado, pues es posible detectar el ADN de la bacteria, aunque no se logre su aislamiento. Sugerimos, por tanto, que para las muestras orales con bajos números de *H. pylori*, la técnica de elección para su detección sea la RPC-TR.

Si bien cabe destacar que en este trabajo se incluyeron sólo dos genes asociados a virulencia, los genes seleccionados, *cagA* y *vacA* m1, partes del cromosoma bacteriano, siguen siendo importantes marcadores genéticos asociados a virulencia en *H. pylori*¹². Específicamente *cagA* se encuentra formando parte de las islas de patogenicidad *cag* (*cagPAI*)¹². Las islas de patogenicidad en bacterias gramnegativas, como lo es *H. pylori*, suelen poseer genes para movilizarse, por lo tanto, es posible que provengan de un proceso de captación de información genética tipo conjugación y tener capacidad de transferirse. No sucede lo mismo con el gen *vacA*, de localización cromosomal, pero no formando parte de una isla⁵³.

Además, trabajos previos de nuestro grupo muestran la importancia de estos genes de *H. pylori* en población chilena, pues se encuentran asociados a patologías gastro-duodenales^{18,19}. Con respecto al bajo al número de pacientes incluidos, cabe señalar que no es fácil contar con muestras obtenidas simultáneamente de cavidad oral y mucosa gástrica de un mismo paciente; no obstante se reconoce esta limitación.

Al analizar los resultados se observa que 14 de 18 pacientes presentaban en su cavidad oral cepas de *H. pylori* con el genotipo *cagA*-, *vacA* m1-, lo que sugiere que la mayoría de los pacientes son colonizados oralmente por los genotipos menos virulentos de *H. pylori*. A su vez, en el estómago, la mitad de los pacientes estaban colonizados por este genotipo de *H. pylori*. Por lo tanto, podemos pensar que efectivamente los pacientes incluidos en este estudio, en su mayoría poseían cepas con genotipos asociados a menor virulencia.

Por otra parte, los resultados sugieren que en los ocho pacientes, en los cuales se detectaron los mismos genotipos de virulencia en las muestras orales y gástricas, se trate de las mismas cepas de *H. pylori*. Sin embargo, para asegurar esto se deberían secuenciar los genomas completos de las cepas detectadas, ya que esta es la única forma de demostrar identidad genética.

En otros ocho pacientes (grupos 4 al 7) se detectaron perfiles de cepas menos virulentas en la cavidad oral respecto del estómago, en estos casos se puede pensar que se trata de cepas diferentes. Sin embargo, también es probable que las cepas de *H. pylori* detectadas en cavidad

oral fuesen las mismas que detectamos en las muestras gástricas para estos pacientes. Esto podría ser explicado por una posible recombinación genética, ya fuese en la misma cavidad oral o en el estómago, haciéndose más virulentas. Lo anterior, puede ser avalado por un estudio reciente de Kennemann y cols.⁵⁴, quienes señalan que el genoma de *H. pylori* evoluciona durante la infección humana y que es estable en ausencia de una infección mixta. En el presente trabajo no se investigó la existencia o no de infección mixta; sin embargo, trabajos previos sí han señalado la existencia de infección mixta en pacientes chilenos^{18,19}. Sólo en dos pacientes (grupo 3) se observó un perfil más virulento en la cavidad oral en relación al estómago. En estos casos lo más probable es que se trate de cepas diferentes. Esto se basa en que se sabe que estos genes están en el cromosoma y no en material de ADN extra-cromosómico, como los plásmidos, donde sus genes son más fáciles de perder, por ejemplo por curación o autocuración plasmídica (pérdida natural del plásmido). Sin embargo, dada la evolución del genoma bacteriano en el organismo humano, no es posible descartar totalmente que puedan ser las mismas cepas que en el seno del estómago perdieron su gen *cagA*⁵⁴. Nuevamente, para dilucidar esto se deberían secuenciar los genomas completos de las cepas de *H. pylori* detectadas.

Los resultados de la presente investigación, en su conjunto, muestran que existe una variedad de genotipos de virulencia en *H. pylori*, basados en los genes *cagA* y *vacA* m1 en el estómago y la cavidad oral, predominando en los pacientes incluidos en este estudio las cepas con genotipos asociados a menor virulencia (*cagA*-, *vacA* m1-). Conociendo el potencial de virulencia de la bacteria podemos deducir algo sobre el pronóstico, pues los indi-

viduos colonizados por cepas *cagA*, *vacA* m1 negativas podrían corresponder a la mayoría de la población que está colonizada por la bacteria, pero son asintomáticos durante toda su vida. En cambio, los individuos colonizados por cepas *cagA*, *vacA* m1 positivas, son los que en su mayoría llegan a ser sintomáticos¹².

Se sugieren futuros estudios con mayor cantidad de pacientes e incluyendo otros genes asociados a virulencia, como *vacA* s1 y *dupA*; estos últimos porque en estudios previos de nuestro grupo (resultados proyecto Fondef D03i1109 aún no publicados) también han demostrado ser importantes para la población chilena.

Resumen

Objetivo: Comparar el genotipo de virulencia (genes *cagA* y *vacA* m1) de *Helicobacter pylori*, obtenido simultáneamente de mucosa gástrica y cavidad oral. **Material y Métodos:** Para esto se incluyeron muestras de biopsias gástricas de 18 pacientes. Las muestras orales de estos pacientes fueron obtenidas de placa bacteriana y saliva del piso de boca y base de la lengua. Las muestras fueron estudiadas con RPC convencional y RPC en tiempo real (RPC-TR). Los genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1 fueron estudiados con RPC-TR. **Resultados:** De acuerdo a la presencia o ausencia de los genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1 detectados en las muestras gástricas y orales, se pudieron diferenciar siete combinaciones diferentes. **Conclusión:** Estos resultados sugieren que existe una variedad de genotipos de virulencia en *Helicobacter pylori* en el estómago y la cavidad oral, predominando en los pacientes incluidos en este estudio las cepas con genotipos asociados a menor virulencia (*cagA*-, *vacA* m1-).

Referencias bibliográficas

- 1.- Ferreccio C, Rollán A, Harris P R, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, et al. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 662-7.
- 2.- Ministerio de Salud de Chile. Estadísticas de natalidad y mortalidad. url: <http://www.minsal.cl>.
- 3.- Prado V. Emergent infectious diseases: a new problem? *Rev Med Chile* 1996; 124: 7-10.
- 4.- Araya J C, Anabalón L, Roa I, Bravo M, Villaseca M A, Guzmán P, et al. Association between *Helicobacter pylori* genotype and the severity of gastritis in infected adults. *Rev Med Chile* 2004; 132: 1345-54.
- 5.- González F C G, Serrano H C, Harris P R. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children based on stool antigen test. *Rev Med Chile* 2007; 135: 182-8.
- 6.- Luo Y H, Yan J, Mao Y F. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: biological activities *in vitro* and *in vivo*, pathological correlation to human chronic gastritis and peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2055-9.
- 7.- Salgado F, García A, Oñate A, González C, Kawaguchi F. Increased *in-vitro* and *in-vivo* biological activity of lipopolysaccharide extracted from clinical low virulence *vacA* genotype *Helicobacter pylori* strains. *J Med Microbiol* 2002; 51: 771-6.
- 8.- Atherton J C. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 63-96.
- 9.- Peek R M Jr, Crabtree J. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006; 208: 233-48.
- 10.- Willhite D C, Cover T L, Blanke S R. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J Biol Chem* 2003; 278: 48204-9.
- 11.- Atherton J C, Peek R M Jr, Tham K T, Cover T L, Blaser M J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-9.
- 12.- González C A, Figueiredo C, Lic C B, Ferreira R M, Pardo M L, Ruiz Liso J M, et al. *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. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 867-74.
- 13.- Blaser M J, Berg DE. *Helicobacter pylori* diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 767-73.
- 14.- Atherton J C, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru M K, Blaser M J, Cover T L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-7.

- 15.- Van Doorn L J, Figueiredo C, Sanna R, Pena A S, Midolo P, Atherton J C, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2597- 603.
- 16.- Tomb J F, White O, Kerlavagh A R, Clayton R A, Sutton C C, Fleischmann R D, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388: 539-47.
- 17.- Covacci A, Telford J L, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 1999; 284: 1328-33.
- 18.- Martínez A, González C, Kawaguchi F, Montoya R, Corvalán A, Madariaga J, et al. *Helicobacter pylori*: *cagA* analysis and *vacA* genotyping in Chile. Detection of a *s2/m1* strain. Rev Med Chile 2001; 129: 1147-53.
- 19.- García A, Barra R, Delgado C, Kawaguchi F, Trabal N, Montenegro S, et al. Genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori* by *cagA*, *vacA* and *babA2* virulence associated genes. First detection of a *babA2* positive strain in Chilean patients. Rev Med Chile 2006; 134: 981-8.
- 20.- Ozdemir A, Mas M R, Sahin S, Saglamkaya U, Ateskan U. Detection of *Helicobacter pylori* colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. Quintessence Int 2001; 32: 131-4.
- 21.- Song Q, Haller B, Schmid RM, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in dental plaque: a comparison of different PCR primer sets. Dig Dis Sci 1999; 44: 479-84.
- 22.- Majmudar P, Shah S M, Dhunjibhoy K R, Desai H G. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. Indian J Gastroenterol 1990; 9: 271-2.
- 23.- Kim N, Lim S H, Lee K H, You J Y, Kim J M, Lee N R, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva. Korean J Intern Med 2000; 15: 187-94.
- 24.- Song Q, Spahr A, Schmid RM, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. Dig Dis Sci 2000; 45: 2162-7.
- 25.- Desai H G, Gill H H, Shankaran K, Mehta P R, Prabhu S R. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? Scand J Gastroenterol 1991; 26: 1205-8.
- 26.- Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller K A, Lehn N, et al. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. Eur J Oral Sci 2008; 116: 297-304.
- 27.- Wang J, Chi D S, Laffan J J, Li C, Ferguson D A Jr, Litchfield P, et al. Comparison of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. Dig Dis Sci 2002; 47: 1850-6.
- 28.- Hu W, Cao C, Meng H, Zhang J, Ma D, Zhang L. Detection and analysis of *Helicobacter pylori* in oral cavity and stomach from chronic gastritis patients. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2002; 82: 1037-41.
- 29.- Allaker R P, Young K A, Hardie J M, Domizio P, Meadows N J. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. J Med Microbiol 2002; 51: 312-27.
- 30.- Karczewska E, Konturek J E, Konturek P C, Czesnikiewicz M, Sito E, Bielanski W, et al. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci 2002; 47: 978-86.
- 31.- Cheng L H, Webberley M, Evans M, Hanson N, Brown R. *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996; 81: 421-3.
- 32.- Silva D G, Tinoco E M, Rocha G A, Guerra J B, Saraiva I E, Queiroz D M. *Helicobacter pylori* transiently in the mouth may participate in the transmission of infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 657-60.
- 33.- Zou Q H, Li R Q. *Helicobacter pylori* in oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis. J Oral Pathol Med 2011; 40: 317-24.
- 34.- Sepúlveda E, Briceño C, Spencer M L, Quilodrán S, Brethauer U, Moreno J, et al. Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral. Gastroenterol Latinoamer 2008; 19: 73-9.
- 35.- Assumpção M B, Martins L C, Melo Barbosa H P, Barile K A, de Almeida S S, Assumpção P P, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. World J Gastroenterol 2010; 16: 3033-9.
- 36.- Silva Rossi-Aguir VP, Navarro-Rodríguez T, Mattar R, Siqueira de Melo Peres M P, Correa Barbuti R, Silva F M, et al. Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. Oral Microbiol Immunol 2009; 24: 255-9.
- 37.- Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, et al. Identification of *Helicobacter pylori* and *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 44: 261-8.
- 38.- Ruzsovcics A, Molnar B, Unger Z, Tulassay Z, Pronai L. Determination of *Helicobacter pylori cagA*, *vacA* genotypes with real-time PCR melting curve analysis. J Physiol Paris 2001; 95: 369-77.
- 39.- Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, et al. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43: 3906-16.
- 40.- Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. J Med Microbiol 2000; 49: 349-53.
- 41.- Mapstone N P, Lynch D A, Lewis F A, Axon A T, Tompkins D S, Dixon M F, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993; 46: 540-3.
- 42.- Kroes I, Lepp P W, Relman D A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 14547-52.
- 43.- Aas J A, Paster B J, Stokes L N, Olsen I, Dewhirst F E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol 2005; 43: 5721-32.
- 44.- Dowsett S A, Kowolik M J. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? Crit Rev Oral Biol Med 2003; 14: 226-33.
- 45.- Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993; 111: 483-90.
- 46.- Catrenich C E, Makin K M. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. Scand J Gastroenterol Suppl 1991; 181: 58-64.
- 47.- Hua J, Ho B. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? Microbios 1996; 87: 103-12.
- 48.- Can F, Karahan C, Dolapci I, Demirbilek M, Tekeli A, Arslan H. Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *Helicobacter pylori* induced by different factors. Curr Microbiol 2008; 56: 150-5.
- 49.- Al-Sulami A A, Al-Taei A M, Juma' A M G. Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq. East Mediterr Health J 2010; 16: 920-5.
- 50.- Al-Sulami A, Al-Kiat HS, Bakker L K, Hunoon H. Primary isolation and detection of *Helicobacter pylori* from dyspeptic patients: a simple, rapid method. East Mediterr Health J 2008; 14: 268-76.
- 51.- Siavoshi F, Salmanian A H, Akbari F, Malekzadeh R, Massarat S. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. Helicobacter 2005; 10: 318-22.
- 52.- Salmanian A H, Siavoshi F, Akbari F, Afshari A, Malekzadeh R. Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*. J Oral Pathol Med 2008; 37: 324-8.
- 53.- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J E, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cagA* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14648-53.
- 54.- Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, Kuhn S, Drescher B, Droege M, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5033-8.