

Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*. Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos

Apolinaria García C^{1a}, Ricardo Barra T^{1b}, Carolina Delgado Sch², Fernando Kawaguchi P³, Natalia Trabal F^{1c}, Sonia Montenegro H^{4d}, Carlos González C^{1a}.

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

Background: *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases depends on host characteristics, environmental conditions and bacterial virulence factors, such as *cagA*, *vacA* y *babA2* gene products. Moreover, peptic ulcer disease has been related with *cagA*⁺, *vacAs1m1* strains, while metaplasia and gastric cancer has been associated to *cagA*⁺, *vacAs1* and *babA2*⁺ *H pylori* strains. Gene *babA2* has not yet been described in clinical isolates from Chilean patients. **Aim:** To investigate the presence of *cagA*, *vacA* (*s* and *m*) and *babA2* genes in clinical isolates of *H pylori* from Chilean patients. **Material and Methods:** Sixty six isolates from 41 patients were genotyped by PCR, using primers for *s1a*, *s1b*, *s2*, *m1*, *m2*, *cagA* and *babA2* genes as previously described. **Results:** *cagA* gene was detected in 16 isolates (24.2%) while *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1* and *vacAm2* were detected in 28 (42.4%), 14 (21.2%), 17 (25.8%), 21 (31.8%) and 29 isolates (43.9%), respectively. One isolate (1.5%) was *babA2* positive, being the first isolate with this genotype described in Chile. Besides the *babA2*⁺ genotype this clinical isolate also presented *cagA*⁺ and *vacAs1a* which has been related with metaplasia or gastric cancer. Five isolates showed an ulcerogenic profile *cagA*⁺, *vacAs1m1*. **Conclusions:** The results presented indicate the prevalence of *vacAs1m1* genotype among the clinical isolates analyzed, and a low frequency of *babA2* genotype (Rev Méd Chile 2006; 134: 981-8). **(Key-words:** *babA* protein, *Helicobacter pylori*; *cagA* protein, *Helicobacter pylori*; *Helicobacter pylori*; *vacA* protein, *Helicobacter pylori*)

Recibido el 18 de agosto, 2005. Aceptado el 28 de febrero, 2006.

Trabajo financiado por Proyecto Dirección de Investigación Universidad de Concepción (DIUC): 203 036 024-1.0.

¹Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Patología y ³Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ⁴Molecular Immunogenetics Laboratory, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA Estados Unidos de Norteamérica.

^aBioquímico, Magister en Microbiología. Doctora en Ciencias Biológicas

^bAlumno de Química y Farmacia

^cLicenciada en Ciencias Biológicas, Magister en Microbiología.

^d Médico Veterinario, Magister en Microbiología, PhD en Molecular Pathology.

Correspondencia a: Dra. Apolinaria García. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Casilla 160-C, Concepción, Chile. Teléfono: 56-(41)-204144. Fax: 56-(41)-245975. E mail: apgarcia@udec.cl

La infección por *Helicobacter pylori* establece, en la mayoría de los individuos infectados, una inflamación crónica, asintomática, de larga duración en la región antro-pilórica del estómago, posiblemente debido a que los mecanismos defensivos inmunológicos del huésped fallan en su eliminación^{1,2}. La persistencia de la infección en ciertos pacientes resulta en el desarrollo de patologías severas, que progresan de gastritis crónica a úlcera péptica, gastritis atrófica, linfoma de MALT y adenocarcinoma gástrico³⁻⁵. A pesar de la alta prevalencia de la infección por *H pylori*, sólo una minoría de individuos infectados desarrolla una patología severa maligna. Esto puede deberse a la diversidad genética entre individuos⁶; a factores ambientales, como tipo de dieta, edad de la primera infección⁷ y a factores de virulencia específicos de la bacteria^{8,9}. El gen *cagA*, que codifica un antígeno inmunodominante, no se presenta en todas las cepas de *H pylori*¹⁰, pero forma parte del islote de patogenicidad (*cagPAI*), que contiene 31 genes¹¹. Por lo tanto, su detección molecular indica la presencia del PAI en el cromosoma del microorganismo⁹. Las cepas *cag+* (cepas tipo I) se asocian a mayor virulencia, al inducir daño gástrico visible, mientras que las cepas *cag-* (cepas tipo II) se asocian a menor virulencia y se comportan como bacterias comensales más que patógenas¹¹. La citotoxina vacuolizante VacA es secretada por alrededor de 50% de las cepas de *H pylori* y causa degeneración vacuolar de las células gástricas epiteliales y ulceración de la mucosa gástrica¹². La citotoxina está codificada por el gen *vacA*, que puede presentar mosaico genético en base a variaciones alélicas en las regiones media (alelos *m1* o *m2* y subtipos) y de señal (alelos *s1* o *s2* y subtipos) del gen^{13,14}. Específicamente, se ha demostrado que cepas *vacA s1/m1* poseen una elevada actividad citotóxica en comparación con cepas *s1/m2* y que cepas *s2/m2* no tendrían actividad citotóxica¹³.

Recientemente, se ha demostrado que factores de adherencia bacteriana contribuyen a la patogenicidad de *H pylori*¹⁵⁻¹⁷. Así, la adhesina, codificada por el gen *babA2*, favorece una unión persistente entre el microorganismo y la célula epitelial gástrica por unión de la célula bacteriana a través de su proteína BabA2 con antígeno de grupo Lewis B (Le^B), presente en la mucosa gástrica¹⁸. Por lo tanto, cepas de *H pylori babA2*

positivas presentan mayor capacidad de adherencia, en cambio, las cepas *babA2* negativas se adhieren débilmente¹⁸. Esta adherencia se ha asociado con altos niveles de infiltración linfocitaria, atrofia glandular, metaplasia intestinal e incremento de la proliferación epitelial, reportándose una asociación significativa con úlcera duodenal y cáncer gástrico¹⁹. De acuerdo a Yu y col (2002)¹⁷, el gen *babA2* podría ser un marcador molecular útil para identificar pacientes con mayor riesgo de presentar patologías severas asociadas a infecciones por *H pylori*.

Alves Oliveira y col (2003)²⁰, en un estudio en Brasil, informaron una fuerte asociación entre *babA2* y la presencia de úlcera péptica o carcinoma gástrico.

Es importante considerar que la frecuencia de determinantes de virulencia y su asociación con patologías gastrointestinales varía considerablemente en diferentes regiones geográficas. La presencia de más de uno de estos genes de virulencia se asociaría con mayor severidad de la lesión gástrica. Se ha informado que cepas *cagA+*, *vacAs1m1* estarían asociadas a la presentación de úlceras y cepas triple positivas *cagA+*, *vacAs1*, *babA2+*, además de úlcera, se asociarían con metaplasia y adenocarcinoma gástrico^{19,21}.

En Chile, más de 90% de los pacientes con úlcera péptica y 42% de quienes consultan por dispepsia no ulcerosa están infectados con *H pylori*²². A pesar de la elevada prevalencia de infección por *H pylori* en nuestro país, aún son pocos los trabajos en genotipificación de cepas incluyendo los genes *cagA* y *vacA*²³⁻²⁵ y no se encuentran trabajos con respecto al gen *babA2*.

El objetivo del presente estudio fue genotipificar cepas de *H pylori* aisladas de pacientes con patología gastroduodenal en base a los genes *cagA*, *vacA* (región *s* y *m*), incluyendo el gen *babA2*, no detectado previamente en cepas chilenas.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes y biopsia. Se incluyeron cuarenta y un pacientes que consultaron por sospecha de patología digestiva alta en centros hospitalarios de la ciudad de Concepción, en los años 2001 y 2002, y que fueron sometidos a gastroduodenoscopia y

biopsia gástrica. Se obtuvo consentimiento informado de los pacientes para utilizar parte de la biopsia de la zona antral o del cuerpo para cultivo y genotipificación. Se siguieron las recomendaciones del *European Helicobacter pylori Study Group*, 1997²⁶.

Condiciones de cultivo e identificación. Las biopsias gástricas se maceraron y homogenizaron en suero fisiológico y una alícuota (100 µl) fue cultivada en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de caballo e inhibidor de la microbiota acompañante (DENT), a 37°C, en microaerofilia (10% de CO₂), por cuatro días. Las colonias se identificaron mediante test de ureasa, catalasa y tinción de Gram. A partir de los cultivos identificados positivamente como *H pylori*, se realizó una suspensión del total de bacterias desarrolladas en cada placa y se almacenó en caldo Tripticasa con 15% de glicerol, a -70°C.

Cepas de *H pylori*. Se incluyeron 66 aislados clínicos de *H pylori* para realizar la genotipificación. Como cepa de referencia, se empleó la cepa ATCC 43504 (*cagA+*, *vacAs1m1*, *babA2+*).

Extracción de ADN. El ADN se extrajo de acuerdo al método descrito por Mazurier y col²⁷, a partir de una suspensión en suero fisiológico estéril de todas las colonias desarrolladas en un subcultivo de *H pylori* obtenido del cepario mantenido a -70°C y sembrado en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de caballo e inhibidor DENT e incubado en las condiciones descritas anteriormente. El ADN extraído se suspendió en agua destilada estéril libre de nucleasas y se procesó de inmediato o se almacenó a -20°C hasta su uso.

Genotipificación de las cepas de *H pylori* por PCR simple para los genes *cagA*, *vacA* y *babA2*. Las secuencias de los partidores utilizados, el tamaño de los productos esperados y las referencias para las condiciones de amplificación respectivas, se describen en la Tabla 1. Las muestras se amplificaron por PCR convencional, de acuerdo a las condiciones citadas en las respectivas referencias. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,7% (p/v) seguido de tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualización mediante transiluminador UV.

Tabla 1. Partidores utilizados en la detección de los genes *cagA*, *babA2* y *vacA* (alelos *sy m*) en aislados de *H pylori*

Gen	Región	Secuencia	Tamaño del Amplicón (pb)	Referencia
<i>cagA</i>		Forward 5´gat aac agg caa gct ttt gag g 3´ Reverse 5´ctg caa aag att gtt tgg cag a 3´	349	(28)
<i>babA2</i>		Forward 5´aat cca aaa agg aga aaa agt atg aaa 3´ Reverse 5´tgt tag tga ttt cgg tgt agg aca 3´	832	(19)
<i>vacA</i>	m1	Forward 5´ggt caa aat gcg gtc atg g 3´ Reverse 5´cca ttg gta cct gta gaa ac 3´	290	(13)
<i>vacA</i>	m2	Forward 5´gga gcc cca gga aac att g 3´ Reverse 5´cat aac tag cgc ctt gca c 3´	352	(13)
<i>vacA</i>	s1a	Forward 5´gtc agc atc aca ccg caa c 3´ Reverse 5´ctg ctt gaa tgc gcc aaa c 3´	190	(13)
<i>vacA</i>	s1b	Forward 5´agc gcc ata ccg caa gag 3´ Reverse 5´ctg ctt gaa tgc gcc aaa c 3´	187	(13)
<i>vacA</i>	s2	Forward 5´gct aac acg cca aat gat cc 3´ Reverse 5´ctg ctt gaa tgc gcc aaa c 3´	199	(13)

RESULTADOS

La pesquisa de genes de virulencia en aislados clínicos de *H pylori*, constituye una herramienta importante para caracterizar y detectar cepas específicas que presentan mayor potencial patogénico. El análisis de 66 aislados clínicos de *H pylori* permitió la detección de amplicones *cagA*, *vacAs1* y *vacAm1* (Figura 1). El gen *cagA* se detectó en 24,2% de los aislados clínicos analiza-

dos (16/66), en tanto que el gen *vacAs1a* se detectó en 42,4% de las muestras; *vacAs1b* fue detectado en 21,2% y *vacAs2* en 25,8% de las muestras, respectivamente (Figura 2). Llamó la atención, el primer aislamiento de una cepa portadora del gen *babA2*, el cual codifica para la proteína BabA, que se ha asociado con mayor adherencia y patologías más severas. Esta cepa se consideró aislado puro, pues sólo se amplificaron los genes *vacA s1a* y *vacA m1* en la suspensión

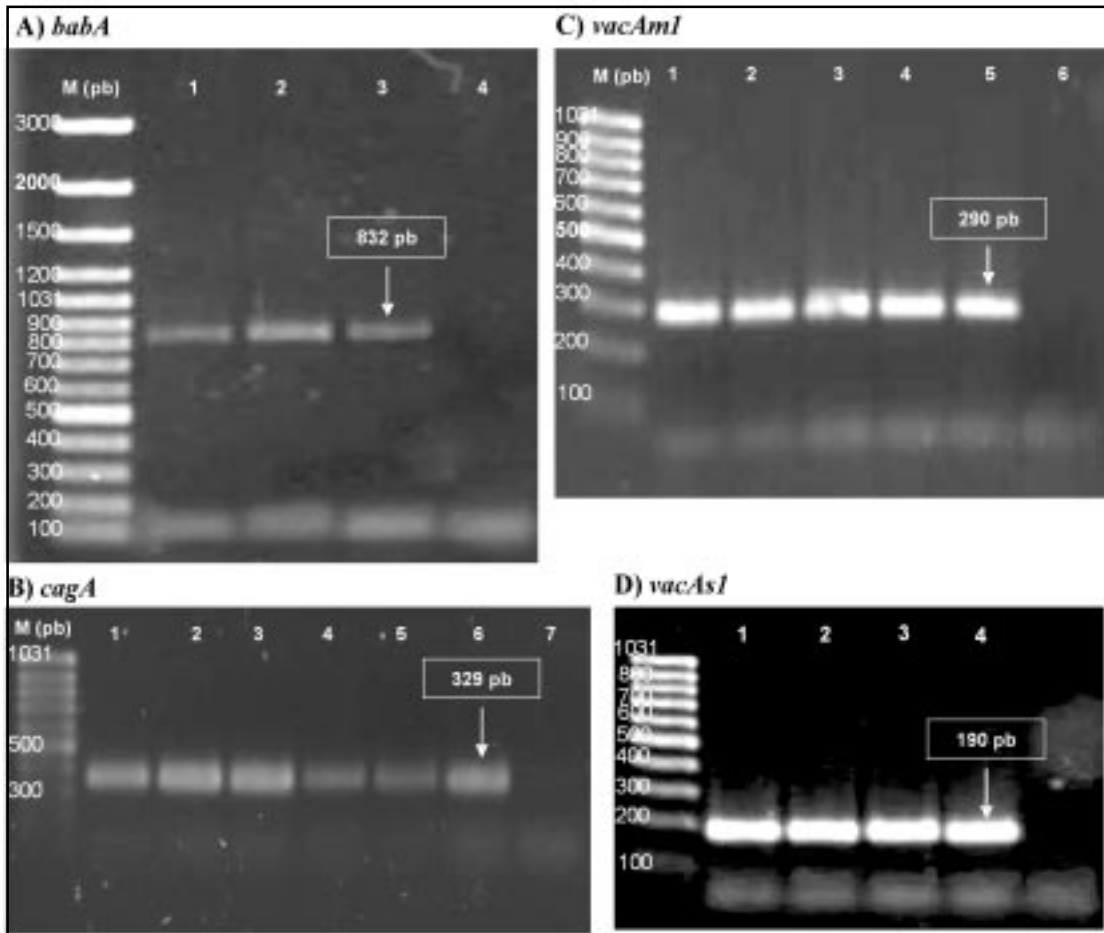


Figura 1. Detección de genes de virulencia mediante PCR, en suspensiones de colonias de *Helicobacter pylori* obtenidas desde biopsias gástricas de pacientes con patología gastroduodenal. A) M: marcador de peso molecular (Ladder plus, Fermentas), 1: aislado clínico de *Helicobacter pylori*, 2 y 3: cepa ATCC 43504 (control positivo), 4: control negativo. B) M: marcador de peso molecular (Ladder plus, Fermentas), 1-5: aislados clínicos de *Helicobacter pylori*, 6: cepa ATCC 43504 (control positivo), 7: control negativo. C) M: marcador de peso molecular (Ladder plus, Fermentas), 1-4: aislados clínicos de *Helicobacter pylori*, 5: cepa ATCC 43504 (control positivo), 6: control negativo. D) M: marcador de peso molecular (Ladder plus, Fermentas), 1-3: aislados clínicos de *Helicobacter pylori*, 4: cepa ATCC 43504 (control positivo), 5: control negativo.

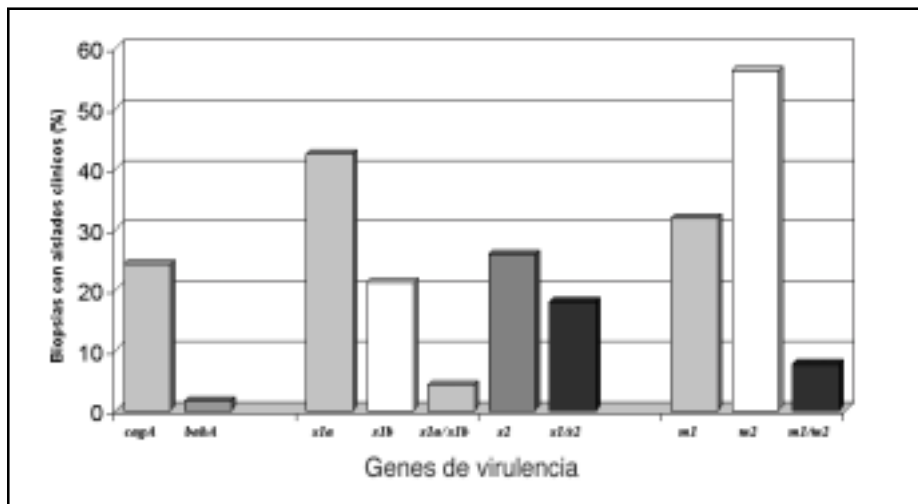


Figura 2. Distribución de los genes *cagA*, *babA2* y *vacA* en suspensiones de colonias de *Helicobacter pylori* obtenidas desde biopsias gástricas de pacientes de la Octava Región con patología gastroduodenal.

bacteriana. Además, este aislado fue *cagA*+, constituyendo un genotipo de mayor patogenicidad en la especie (*cagA*+, *vacAs1m1* y *babA2*+). Cabe señalar, que la presencia de *cagA* y *babA2* no constituyen marcadores para diferenciar mezclas, lo que sí pueden sugerir los genes *vacA*.

Por otra parte, se observó amplificación simultánea de los genes *s1a* y *s1b* en 4/66 aislados clínicos de las muestras de biopsia gástrica (4,1%) y de *s1* y *s2*, en otras 9 muestras (18%), indicativo de la presencia de más de un genotipo en la muestra de biopsia del paciente. Cinco aislados (7,6%) no amplificaron con los partidores empleados para *s1a*, *s1b* o *s2*. Similar a lo observado en un estudio anterior, se detectó mayor prevalencia de genotipo *vacAm2* (56,1%) que de genotipo *vacAm1* (31,8%) en las muestras. La amplificación simultánea de *m1* y *m2* fue en 5/66 aislados clínicos (7,6%), en tanto que, no hubo amplificación para *m1* o *m2* en el 19,7% de los aislados clínicos.

DISCUSIÓN

Nuestro grupo de investigación está abocado a caracterizar cepas de *H pylori* que infectan a pacientes locales, en base a genes de virulencia de importancia reconocida por su asociación con patologías gastroduodenales severas^{23,29}. También

contamos con información patofisiológica útil, que puede tener implicancias clínicas significativas³⁰, pues estudios de poblaciones de oriente y occidente señalan que los factores de virulencia de *H pylori* varían de acuerdo a la localidad geográfica y a la edad del individuo³¹. Así, se ha demostrado que los factores de virulencia difieren en las cepas obtenidas de diferentes poblaciones^{16,32-34}. Esta diferencia en localidad geográfica se ha puesto de manifiesto en estudios en Japón, que muestran una prevalencia de *babA2* cercana a 85%¹⁵, y en resultados obtenidos de población coreana, que presentaron 36,1% de cepas *babA2* positivas¹⁶.

La amplificación de más de un tipo de secuencia señal o de región media de *vacA* en las muestras, sugiere la presencia de infección múltiple. Esto concuerda con los hallazgos de otros autores, que han detectado infección por múltiples cepas tipificadas a través de diferentes genes³⁵⁻³⁷. En forma similar a lo observado por nuestro grupo en 2001²³, en que se incluyeron los aislados clínicos de los años 1999-2000, las muestras de las biopsias gástricas incluidas en este estudio (años 2001-2002), mantuvieron la prevalencia del genotipo *cagA*- en los aislados clínicos. Resultados similares se observaron al emplear la región media del gen *vacA* como marcador, dado que sigue siendo prevalente entre los aislados clínicos el genotipo *vacAm2*. Sin embargo, hubo

un marcado predominio de aislados con genotipo *vacAs1* en las muestras, a diferencia de lo informado anteriormente²³.

Los resultados obtenidos también muestran que 5 aislados (7,6%) presentaron un perfil genético relacionado con cepas ulcerogénicas (*cagA+*, *vacAs1m1*) y uno (1,5%), con un perfil genético presente en cepas asociadas a metaplasia o adenocarcinoma gástrico (*cagA+*, *vacAs1*, *babA2+*)^{19,21}.

Estudios de genotipificación de cepas de *H pylori* de pacientes chilenos han mostrado que la presencia del gen *cagA* o de la variante alélica *vacAs1*, no tendrían un valor predictivo de riesgo de patologías gástricas severas. Sin embargo, cuando la cepa presenta el genotipo *cagA+/vacA s1m1*, habría un mayor riesgo de desarrollar enfermedad péptica ulcerosa^{23,24}. Así, los resultados presentados sugieren la existencia de un porcentaje significativo de pacientes en la Región del Bio-Bío, con riesgo potencial de adquirir enfermedad péptica ulcerosa en base a los genotipos de *H pylori*. Por otra parte, resultados presentados con población de la Región de la Araucanía²⁵, concluyen que la presencia del gen *cagA* o de los alelos *s1/m1* del gen *vacA*, se correlaciona directamente con la infiltración por neutrófilos y con la severidad del daño epitelial, mientras que el genotipo *vacAs2/m2* se asocia en forma significativa con daño ligero de la mucosa o ausencia de daño. Además, no se observó relación entre los alelos *iceA* y los hallazgos patológicos de la gastritis²⁵.

La detección del gen *babA2* en un aislado clínico de *H pylori* constituye el primer informe de este genotipo en población chilena. La baja frecuencia con que se detectó este gen en el estudio,

sugiere que *babA2* podría ser un marcador útil para predecir riesgo de adquirir enfermedades gástricas severas asociadas a *H pylori*, como se ha señalado en la literatura para algunos países¹⁷, ya que en nuestra población, *cagA* y *vacA* por sí solos no se asociarían con daño gástrico severo²⁵.

En relación con la adherencia, además de BabA, se han descrito al menos 32 proteínas de membrana externa en *H pylori* y varias de ellas tendrían un papel en adherencia a la superficie del epitelio gástrico³⁸. Entre éstas, se puede mencionar, a las proteínas SabA o adhesina de unión al ácido siálico; la lipoproteína asociada a adherencia, la OipA o proteína inflamatoria de membrana externa y la HpaA, que es un factor de adherencia a células sanguíneas y media la adhesión a ácido siálico^{38,39}. Con respecto a esta última adhesina, en un estudio en que se realizó un análisis de sueros de pacientes chilenos infectados por *H pylori*, encontraron que HpaA, CagA y VacA son los antígenos más frecuentemente reconocidos. Este resultado sugiere que el bajo porcentaje del gen *babA2* se debería a que las cepas analizadas en nuestro trabajo también podrían presentar la adhesina HpaA⁴⁰.

Finalmente, la baja prevalencia del gen *babA2* puede ser sugerente de su importancia como marcador específico para cepas de mayor capacidad adherente y con mayor potencial patogénico. Así, los resultados, en su conjunto, indican que las cepas de *H pylori* aisladas de pacientes chilenos con alguna patología gastroduodenal, tendrían un considerable potencial patogénico y que el gen *bab2* debiera incluirse en los estudios de pesquisa de cepas con mayor virulencia.

REFERENCIAS

1. TAYLOR D, BLASER MJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 42-59.
2. NILSSON C, SILLEN A, ERIKSSON L, STRAND ML, ENROTH H, NORMARK S ET AL. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *In-fec Immun* 2003; 71: 6573-81.
3. MARSHALL B. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 116-27.
4. FOREMAN D, THE EUROGAST STUDY GROUP. An International Association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341: 359-62.
5. WOTHERSPOON A, DOGLIONI C, DISS T, PAN L, MOSCHINI A, DE BONI M ET AL. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342: 575-7.
6. AZUMA T, ITO S, SATO F, YAMAZAKI Y, MIYAJI H, ITO Y ET AL. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adeno-

- carcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998; 82: 1013-8.
7. KATO I, VIVAS J, PLUMMER M, LÓPEZ G, PERAZA S, CASTRO D ET AL. Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 468-76.
 8. YANG J, WANG T, WANG H, KUO C, WANG J, WANG W. Genetic analysis of the cytotoxin associated gene and the vacuolating gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Taiwanese patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1316-21.
 9. BLASER MJ, ATHERTON JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-33.
 10. COVACCI A, CENSINI S, BUGNOLI M. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5791-5.
 11. CENSINI S, LANGE C, XIANG Z, CRABTREE J, GHIARA P, BORODOVSKY ET AL. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encoded type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-53.
 12. COVACCI A, TELFORD JL, DEL GIUDICE G, PARSONNET J, RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-33.
 13. ATHERTON JC, CAO P, PEEK RM JR, TUMMURU MK, BLASER MJ, COVER TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 1771-7.
 14. VAN DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, PENA AS, MIDOLO P, ATHERTON JC ET AL. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-603.
 15. MIZUSHIMA T, SUGIYAMA T, KOMATSU Y, ISHIZUKA J, KATO M, ASAKA M. Clinical relevance of the *babA2* genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2463-5.
 16. LAI C-H, KUO C-H, CHEN Y-C, CHAO F-Y, POON S-K, CHANG C-S ET AL. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2002; 40: 3860-2.
 17. YU J, LEUNG WK, GO MYY, CIHAN MCW, TO KF, NG EKW ET AL. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51: 480-4.
 18. BOREN T, NORMARK S, FALK P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol* 1994; 2: 221-8.
 19. GERHARD M, LEHN N, NEUMAYER N, BORER T, ROD R, SCHEPP W ET AL. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 96: 12778-83.
 20. ALVES OA, SANTOS A, BECATTINI GJ, AGUIAR RG, CAMARGOS RA, OLIVEIRA C ET AL. *babA2*- and *cagA*-Positive *Helicobacter pylori* Strains Are Associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3964-6.
 21. ZAMBON CF, NAVAGLIA F, BASSO D, RUGGE M, PLEBANI M. *Helicobacter pylori babA2, cagA, and sIvacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56: 287-91.
 22. PRADO V. Enfermedades infecciosas emergentes: ¿Un problema nuevo? *Rev Méd Chile* 1996; 124: 7-10.
 23. MARTÍNEZ A, GONZÁLEZ C, KAWAGUCHI F, MONTOYA R, CORVALÁN A, MADARIAGA J ET AL. *Helicobacter pylori*: análisis de *cagA* y genotipificación de *vacA* en Chile. Detección de una cepa *s2/m1*. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1147-53.
 24. FAÚNDEZ G, TRONCOSO M, FIGUEROA G. *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. *BMC Gastroenterol* 2002; 2: 20.
 25. ARAYA J, ANABALÓN L, ROA I, BRAVO M, VILLASECA M, GUZMÁN P ET AL. Relación de la genotipificación de *Helicobacter pylori* con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1345-54.
 26. WORKING PARTY OF THE EUROPEAN *HELICOBACTER PYLORI* STUDY GROUP. Guidelines for clinical trials in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 41 (Suppl 2): S3.
 27. MAZURIER S, VAN DE GIESSEN A, HEUVELMAN K, WERNARS K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol* 1992; 14: 260-2.
 28. TUMMURU MK, COVER TL, BLASER MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61: 1799-809.
 29. 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.
30. NAVAGLIA F, BASSO B, PLEBANI M. Touchdown PCR: a rapid method to genotype *Helicobacter pylori* infection. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 57-60.
 31. PODZORSKI R, PODZORSKI D, WUERTH A, TOLIA V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patient from the Midwestern united states. *Diagnos Microbiol Infec Dis* 2003, 46: 83-8.
 32. HEHENBERGER P, GRETECHEL S. Gastric Cancer. *The Lancet*, 2003. Tomo 362, N 9380: pp 305.
 33. KIM S-Y, WOO C, LEE Y-M, SON B, KIM J, CHAE H ET AL. Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *iceA* and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 579-84.
 34. YAKOUB J, FAN XG, PENG XN, HU GL, ZHANG Z. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* cytotoxin genes in Changsha, China. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 150-3.
 35. XIANG Z, CENSINI S, BAYELI P, TELFORD J, FIGURA N, RAPPUOLI R ET AL. Analysis of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-8.
 36. FANTRY G, ZHENG Q, DARWIN P, ROSENTEIN A, JAMES S. Mixed infection with *cagA*-positive and *cagA*-negative strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1996; 1: 98-106.
 37. WEEL J, VAN DER HULST R, GERRITS Y, ROORDA P, FELLER M ET AL. The Inter relationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori* related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-5.
 38. LU H, YAMAOKA Y, GRAHAM D. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Current Op Gastroenterol* 2005; 21: 653-9.
 39. VOLAND P, HAFSI N, ZEITNER M, LAFORSCH S, WAGNER H, PRINZ C. Antigenic properties of HpaA and Omp 18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003; 71: 3837-43.
 40. DÍAZ MI, LIENLAF M, VALDIVIA A HARRIS P, VENEGAS A. Análisis de sueros de pacientes chilenos infectados con *Helicobacter pylori* indican que HpaA, CagA y VacA son los antígenos más frecuentemente reconocidos. *Acta Microbiol* 2004; 10: 125.