



Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis

Gloria Luz Paniagua-Contreras,* Eric Monroy-Pérez,*
Mayra Lorena Alcántara-Carmona,*
Octavio Patricio García-González,** Sergio Vaca-Pacheco**

RESUMEN

El propósito de este estudio fue establecer la prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos citotóxicos *vacA* y *cagA* en la cavidad oral de pacientes con gastritis crónica ($n = 102$). *H. pylori* fue detectado en la saliva de los pacientes por PCR anidado y las variantes alélicas del gen *vacA* y del gen *cagA* por PCR multiplex. Los anticuerpos IgG contra *H. pylori* fueron medidos por un método inmunoenzimático. El suero de 76 pacientes (74%) fue positivo para anticuerpos IgG contra *H. pylori*, y la bacteria fue detectada por PCR anidada en 60 de ellos. Los genotipos *vacA* y *cagA* fueron detectados en el 45% ($n = 27$) de los pacientes positivos para *H. pylori*; 10% *vacA* m2 ($n = 6$); 8.3% *vacA* s1 ($n = 5$); 6.6% *vacA* s2/*cagA* ($n = 4$); 6.6% *vacA* s2 ($n = 4$) y 6.6% *vacA* m1 ($n = 4$). Los resultados mostraron que *H. pylori* se encuentra en la cavidad oral, y que ésta puede ser un reservorio para la transmisión oral-oral de esta bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, anticuerpos, *vacA*, *cagA*.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the prevalence of *Helicobacter pylori* and its cytotoxic genotypes *vacA* and *cagA* in the oral cavity of patients suffering chronic gastritis ($n = 102$). *H. pylori* was detected by nested PCR in saliva of patients, whereas *vacA* allelic variants and *cagA* gene were detected by multiplex PCR. Serum IgG antibodies against *H. pylori* were measured by an immunoenzymatic method. Sera of seventy-six patients (74%) were positive for IgG anti-*H. pylori* antibodies, and the bacterium was detected by nested PCR in saliva of 60 of them. *vacA* and *cagA* genotypes were detected in 45% ($n = 27$) of the patients positive for *H. pylori*: 10% *vacA* m2 ($n = 6$); 8.3% *vacA* s1 ($n = 5$); 6.6% *vacA* s2/*cagA* ($n = 4$); 6.6% *vacA* s2 ($n = 4$), and 6.6% *vacA* m1 ($n = 4$). These results showed that *H. pylori* is found in the oral cavity, which may be a reservoir for the oral-oral transmission of this bacterium.

Key words: *Helicobacter pylori*, antibodies, *vacA*, *cagA*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un patógeno que causa gastritis crónica y úlcera péptica y es considerado un factor de riesgo temprano para el desarrollo de adeno-

carcinoma gástrico.¹⁻³ Se ha estimado que 50% de la población mundial se encuentra infectada por *H. pylori*.⁴ La prevalencia de infección varía de 19 a 57% en países desarrollados y este porcentaje es mayor en los países en vías de desarrollo.⁵⁻⁷ En México, la prevalencia de infección por *H. pylori* es de 66%.⁸ Varios autores han reportado la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y han propuesto que ésta podría ser la fuente de la infección y de la reinfección del estómago después de la terapia, así como de la transmisión a otras personas.⁹⁻¹¹

* Laboratorio Clínico, Clínica Universitaria de la Salud Integral, Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

** Laboratorio 4, Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala, UNAM.

Se han descrito diferentes factores de virulencia de *H. pylori*,¹² entre los cuales los alelos del gen *vacA* (*vacuolization associated gen*) y el gen *cagA* (*cytotoxin associated gene*) juegan un papel importante en la infección.¹³⁻¹⁵ El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y varía en dos regiones,¹⁵ la región s (la secuencia de la señal) que existe como los tipos alélicos s1 o s2 y la región m (región media) presente como los tipos alélicos m1 o m2.¹⁶ Las cepas de *H. pylori* que presentan las variantes alélicas s1/m1 producen altos niveles de la citotoxina.¹⁷ Aproximadamente 50 a 70% de las cepas de *H. pylori* posee el gen *cagA*,^{18,19} el cual es un marcador de una isla de patogenicidad (*cag* PAI) constituida por 31 genes.²⁰ Las cepas de *H. pylori* que presentan el gen *cagA* han sido asociadas con ulceración péptica y con cáncer gástrico.^{21,22}

El propósito de este estudio fue establecer la prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes adultos con gastritis crónica.

METODOLOGÍA

Selección de los pacientes y toma de los productos. Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron, en la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 102 pacientes con gastritis crónica y un grupo control de 20 sujetos asintomáticos. Los pacientes incluidos en este trabajo manifestaron no haber sido sometidos a estudios endoscópicos ni de toma de biopsias, y no haber recibido tratamiento con antibióticos o algún medicamento que pudiera interferir con los métodos de detección de *H. pylori*, en un tiempo mínimo de tres meses. Para la obtención del suero, a cada paciente en estado de ayuno se le extrajo una muestra de sangre de 3 mL por el método de punción sanguínea en el Laboratorio Clínico.

La saliva de cada paciente se colectó en tubos estériles después de estimular la secreción al mascar un gramo de cera de parafina durante un minuto. Las muestras se guardaron a -20°C para su utilización posterior.

Extracción de ADN de *H. pylori* para PCR. El ADN de cada muestra de saliva fue extraído por el método descrito por Alam y colaboradores.²³ Las muestras de 1 mL de saliva se centrifugaron a 10,000 x g por un minuto a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se lavaron con PBS (pH 7.0) y se resuspendieron en agua estéril. Los tubos

con las suspensiones celulares fueron inmersos en agua hirviendo por 10 minutos e inmediatamente transferidos a hielo. Al término, los tubos se centrifugaron a 10,000 x g por un minuto a 4°C, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20°C hasta su uso.

Detección de IgG contra *H. pylori*. La detección sérica de IgG contra *H. pylori* se realizó con el kit inmunoenzimático ImmunoCombII *Helicobacter pylori* IgG (ORGENICS, código 60425002).

Detección de *H. pylori* por PCR anidado. La detección de *H. pylori* por PCR anidado se llevó a cabo por un método descrito previamente.²⁴ Para la primera ronda de detección de *H. pylori* se utilizaron los primers EHC-U (5'-CCCTCACGCCATCAGTCCCA-AAA-3') y EHC-L (5'-AAGAAGTCAAAAACGCC-CAAAC-3'). El tamaño de los amplicones obtenidos fue de 417 pb (80076-80492 pb). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µL; 1 µL de cada primer EHC-U (25 pmol) y EHC-L (25 pmol) (los primers fueron de Sigma-Genosys), 2.5 µL de solución buffer para PCR 10x, 10.5 µL de H₂O libre de nucleasa, 10 µL de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por cinco minutos; seguida de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final a 75°C durante 10 minutos.

Para la segunda ronda de amplificación se utilizaron los primers ET-5U (5'-GGCAAATCATAAGTCCG-CAGAA-3') y ET-5L (5'-TGAGACTTTCTAGAGCGGTGTT-3') complementarios a un fragmento interno de los amplicones obtenidos con EHC-U y EHC-L. El tamaño de los amplicones fue de 230 pb (80198-80427 pb).²⁵ La amplificación de la segunda ronda fue similar a la primera, excepto que 0.2 µL del producto de la primera ronda se utilizó como ADN templado y la reacción se llevó a cabo únicamente durante 25 ciclos.

Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizó el ADN extraído de la cepa ATCC 43629 de *H. pylori*. Como control negativo se utilizó una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el ADN templado.

Detección de los genes de virulencia *vacA* y *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex. Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers, descritos por Chattopadhyay S y colaboradores:²⁶ VA1-F y VA1-R (25 pmol), VAG-F y VAG-R (25 pmol) y *cag5c-*

Cuadro I. Primers utilizados para la amplificación de los alelos de *vacA* y del gen *cagA*.

Regiones del ADN amplificadas	Nombre del primer	Secuencia del primer (5' a 3')	Tamaños de los amplicones (pb)
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2	VAI-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286
	VAI-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA</i> m1/ <i>vacA</i> m2	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	567/642
	VAG-R	GCGTCAAAAATAATTCCAAGG	
<i>cagA</i>	cag5c-F	GTTGATAACGCTGTCGCTTC	350
	cag3c-R	GGGTTGTATGATATTTTCCATAA	

F y cag3c-R (10 pmol), respectivamente, cuyas secuencias se muestran en el cuadro I. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µL; 1 µL de cada primer, 16 µL de H₂O libre de nucleasa, 3 µL de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94° C por tres minutos; seguida de 35 ciclos a 94° C por un minuto, 55° C por un minuto, 72° C por un minuto y extensión final a 72° C por 10 minutos.

Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en geles de agarosa. Después de la amplificación del ADN, 10 µL de cada muestra se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampères por 120 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

Análisis de los datos. Para estimar las diferencias estadísticas de los genotipos de *H. pylori* detectados en la saliva de los pacientes con gastritis con relación a los niveles séricos de IgG se utilizó un análisis de varianza.

RESULTADOS

Pacientes. El 69% (n = 70) de los sujetos analizados fueron mujeres. La edad del 70% (n = 72) de los pacientes estudiados se encontró comprendida en el intervalo de 17 a 30 años, seguido de 15% (n = 15) en el intervalo de 44 a 56 años, 10% (n = 10) entre 31 a 43 años, 4% (n = 4) en el rango de 67 a 69 años y finalmente 1% (n = 1) en la edad de 72 años. El 43.4% (n = 33) de los pacientes seropositivos eran estudiantes, 17.1% (n = 13) amas de casa, 17.1% (n = 13) empleados, 11.8% (n = 9) profesionistas, 6.5% (n = 5) obreros y 3.9% (n = 3) personas dedica-

das al comercio. El 84.2% (n = 64) acostumbraba comer en la calle, principalmente alimentos ricos en grasas e irritantes ácidos como: tacos, tortas, quesadillas, aguas frescas, refrescos, etcétera. El 88% declaró estresarse mucho, el 74% fueron fumadores y el 65% tenía el hábito de consumir alcohol.

Detección de IgG contra *H. pylori* en los adultos con gastritis y en el grupo control. El 74% (n = 76) de los 102 pacientes con gastritis presentó anticuerpos contra *H. pylori*, dentro de los cuales el 47.3% (n = 36, media = 25.5 años) presentó niveles bajos de IgG (≤ 20 u/mL), el 32.8% (n = 25, media = 35.7 años) niveles medios (40-80 u/mL) y el 19.7% (n = 15, media = 39.1 años) niveles elevados (> 120 u/mL). No se detectaron anticuerpos contra *H. pylori* en ningún individuo del grupo control.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado en las muestras de saliva de los pacientes. Con el propósito de detectar *H. pylori* en las muestras de saliva se utilizó un método de PCR anidado. El 58.8% (n = 60) de las muestras de saliva del total de pacientes (n = 102) fue positiva para *H. pylori*; la distribución de éstas, de acuerdo al grupo de edad, se presenta en el cuadro II. En la figura 1 se aprecia que el tamaño de

Cuadro II. Prevalencia de *H. pylori* en la saliva de los pacientes con respecto a la edad.

Intervalo de edad (años)	PCR positivo	
	n	%
17-27	28	46.6
28-38	14	23.3
39-49	10	16.7
50-60	7	11.7
61-72	1	1.7
Total	60	100.0

los amplicones obtenidos en la primera ronda de amplificación fue de 417 pb y el tamaño de los obtenidos en la segunda ronda fue de 230 pb (Figura 2). No se identificaron secuencias de *H. pylori* en ninguna de las muestras de saliva del grupo control.

Se detectó *H. pylori* por PCR anidado en la saliva del 78.9% (n = 60) de los pacientes seropositivos (n = 76) (cuadro III).

Amplificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori*. Utilizando el méto-

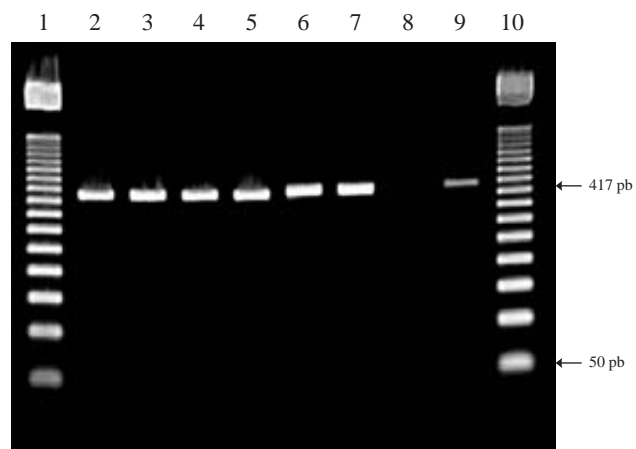


Figura 1. Detección por PCR de *H. pylori* en las muestras de saliva de los pacientes. Líneas 1 y 10, MWM 50-pb ADN ladder; líneas 2-6,9, *H. pylori* detectado en muestras de saliva; línea 7, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); línea 8, Control negativo (sin ADN templado).

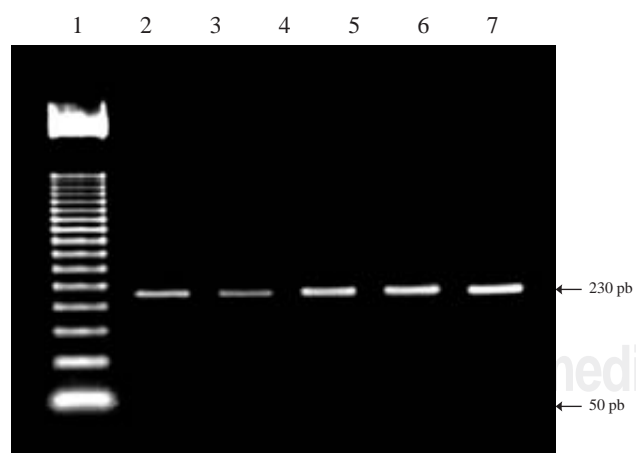


Figura 2. Detección de *H. pylori* en las muestras de saliva mediante la amplificación de ADN por PCR anidado. Línea 1, control negativo (sin ADN templado); línea 2, MWM 50-pb ADN ladder; líneas 3-6, *H. pylori* detectado en muestras de saliva; línea 7, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo).

Cuadro III. Prevalencia de *H. pylori* en la saliva de los pacientes con niveles séricos de IgG.

Niveles séricos de IgG	PCR positivo		PCR negativo	
	n	%	n	%
Bajo (< 20 u/mL)	27	35.5	9	11.8
Medio (40-80 u/mL)	21	27.6	4	5.2
Alto (>120 u/mL)	12	15.7	3	3.9
Total	60	78.8	16	20.9

Cuadro IV. Presencia de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* en las muestras de saliva de los pacientes.

Genotipos	Muestras (N = 60)	
	n	%
<i>vacA</i> m2	6	10.0
<i>vacA</i> s1	5	8.3
<i>vacA</i> s2/ <i>cagA</i>	4	6.6
<i>vacA</i> s2	4	6.6
<i>vacA</i> m1	4	6.6
<i>vacA</i> s1/ <i>cagA</i>	1	1.6
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2	1	1.6
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1	1	1.6
<i>cagA</i>	1	1.6
Total	27	45.0

do de PCR multiplex caracterizamos las 60 muestras de saliva PCR positivas para *H. pylori*. El 45% (n = 27) de las muestras de saliva presentó variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* (Cuadro IV, Figura 3). El 11.6% (n = 7) mostró la asociación de dos genotipos, el más frecuente de los cuales fue *vacA* m2 con 10% (n = 6), seguido de *vacA* s1 con 8.3% (n = 5). Cuatro cepas presentaron la asociación *vacA* s2 y *cagA*.

Relación de los niveles séricos de IgG con los genotipos detectados en las muestras de saliva.

De las 27 (45%) muestras de saliva de los pacientes, en las que se detectaron variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA*, 37% (n = 10) se obtuvieron de pacientes con niveles séricos bajos de IgG, 40% (n = 11) con niveles medios y 22.2% (n = 6) con niveles altos (Cuadro V). El genotipo de *H. pylori* más frecuente fue *vacA* s2/*cagA* (11.1%, n = 3) en los pacientes con niveles de IgG bajos; *vacA* s1 (11.1%, n = 3) en los sujetos con niveles medios, y *vacA* m2 (7.4%, n = 2) en los casos con niveles altos. Todas las variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* se encontraron en cada

nivel sérico de los pacientes; sin embargo, la frecuencia de estos genotipos entre los tres niveles fue estadísticamente diferente ($p = 0.05$).

DISCUSIÓN

Anticuerpos contra *H. pylori* en los pacientes estudiados. Existen numerosos estudios epidemiológicos sobre la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* en individuos de diferentes países; Sin embargo, no se habían relacionado los niveles séricos de IgG con la presencia de *H. pylori* y de los genes *cagA* y *vacA* en la cavidad oral de pacientes sintomáticos. En este estudio encontramos que el 74% de los pacientes estudiados tuvo anticuerpos contra *H. pylori*. Esta frecuencia es similar a la reportada en otros países en vías de desarrollo,²⁷⁻³⁰ y a la reportada en nuestro país en un amplio estudio seroepidemiológico realizado de 1987 a 1988. En ese estudio se analizaron 11,605 muestras de suero obtenidas de pacientes de 32 estados de México (1-90 años) pertenecientes a distintas zonas geográficas y con diferente nivel socioeconómico; y se encontró que la seroprevalencia de anticuerpos anti *H. pylori* fue del 66% ($n = 7,720$).⁸ Si bien el porcentaje de seroprevalencia encontrado por nosotros coincide con los reportados en países subdesarrollados, éste es elevado con respecto al descrito en naciones desarrolladas.³¹⁻³³

La edad del 70% ($n=72$) de los pacientes seropositivos estudiados por nosotros se encontró en el rango

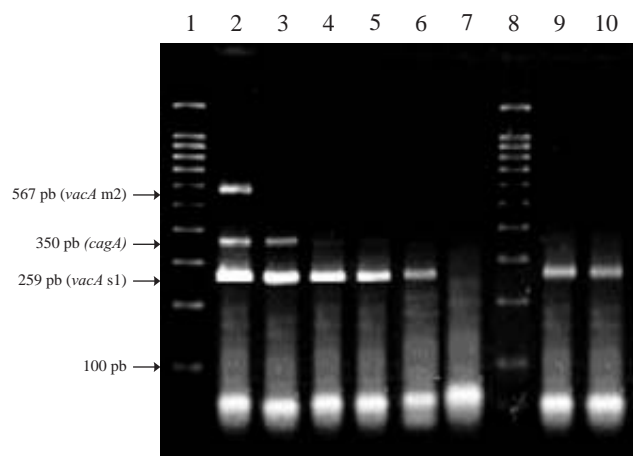


Figura 3. Amplificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* en las muestras de saliva de los pacientes. Líneas 1 y 8 MWM 100-pb ladder; línea 2, *vacA s1*, *cagA* y *vacA m2* de *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); línea 3, *vacA s1* y *cagA* (saliva); líneas 4, 5, 6, 9-10 *vacA s1* (saliva); línea 7, control negativo (sin ADN templado).

Cuadro V. Relación de los niveles séricos de IgG con respecto a los genotipos detectados en las muestras de saliva de los pacientes.

Niveles séricos de IgG	Genotipos detectados	Muestras (N = 27)	
		n	%
Bajo (< 20 u/mL)	<i>vacA s2/cagA</i>	3	11.1
	<i>vacA s2</i>	2	7.4
	<i>vacA m1</i>	2	7.4
	<i>vacA s1</i>	1	3.7
	<i>vacA m2</i>	1	3.7
	<i>vacA s1/cagA</i>	1	3.7
Medio (40-80 u/mL)	<i>vacA s1</i>	3	11.1
	<i>vacA m2</i>	3	11.1
	<i>vacA s2</i>	1	3.7
	<i>vacA m1</i>	1	3.7
	<i>vacA s1/vacA s2</i>	1	3.7
	<i>vacA s1/vacAm1</i>	1	3.7
	<i>cagA</i>	1	3.7
Alto (>120 u/mL)	<i>vacA m2</i>	2	7.4
	<i>vacA s1</i>	1	3.7
	<i>vacA s2</i>	1	3.7
	<i>vacA m1</i>	1	3.7
	<i>vacA s2/cagA</i>	1	3.7
Total		27	100.0

de 17 a 30 años. En poblaciones de adultos, la seroprevalencia de *H. pylori* varía del 47 al 76%,^{34,35} y en los países subdesarrollados el porcentaje de infección por *H. pylori* a la edad de 20 años alcanza hasta el 80%.^{30,36} El porcentaje de edad de nuestros pacientes seropositivos es parecido al detectado en un estudio seroepidemiológico realizado en 5,861 estudiantes adolescentes (11-24 años) de escuelas públicas pertenecientes a 33 municipios del estado de Morelos, México, en donde la seroprevalencia total de *H. pylori* fue del 47.6%; 40.6% en preadolescentes (11-14 años), 48.6% en adolescentes (15-17 años) y 59.8% en adultos jóvenes (18-24 años).³⁷

Nosotros detectamos que la edad promedio del 47.3% de los pacientes con niveles séricos bajos de IgG (≤ 20 u/mL) fue de 25.5 años ($n = 36$), la edad promedio del 32.8% con niveles medios (40-80 u/mL) fue de 35.7 años ($n = 25$) y la edad promedio del 19.7% con niveles elevados (> 120 u/mL) fue de 39.1 años ($n = 15$). Se ha descrito que los títulos de IgG contra *H. pylori* en pacientes infectados se incrementan significativamente con la edad.⁴ En nuestro país se han detectado títulos importantes de IgG contra *H. pylori* en niños menores de cinco años de edad,

los cuales continúan en aumento hasta estabilizarse a la edad de 20 años.³¹ Estos datos sugieren que en México las infecciones por *H. pylori* ocurren durante los primeros años de vida y que las infecciones nuevas en adultos son poco frecuentes.

El 84.2% (n=64) de nuestros pacientes seropositivos acostumbraban comer en la calle, dentro de los cuales el 43.4% (n=33) eran estudiantes, 17.1% (n = 13) amas de casa, 17.1% (n = 13) empleados, 11.8% (n = 9) profesionistas, 6.5% (n = 5) obreros y 3.9% (n = 3) personas dedicadas al comercio. Se ha descrito que los mecanismos de transmisión más comunes de *H. pylori* son la vías fecal-oral y oral-oral⁴ y las deficientes condiciones sanitarias y el bajo nivel socioeconómico, principalmente en los países subdesarrollados, se han asociado con el incremento de la prevalencia de infección por *H. pylori*.^{5,7}

Detección de *H. pylori* por PCR anidado en la saliva de los pacientes seropositivos. Con el propósito de detectar *H. pylori* en las muestras de saliva, utilizamos los primers EHC-U/ECHC-L con los que se logró amplificar un fragmento de 417 pb del ADN de *H. pylori*. Se ha descrito que los primers EHC-U/ECHC-L son más sensibles y más específicos que los utilizados para amplificar el gen de la ureasa o el gen del ARNr 16S; permiten detectar un mínimo de cinco células de *H. pylori* en la saliva o en la placa dental.³⁸ En este estudio detectamos *H. pylori* en el 78.9% (n = 60) de las muestras de saliva de los pacientes seropositivos (n = 76) (*Cuadro III*). Varios autores han reportado la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y han propuesto, que ésta podría representar el origen de la reinfección del estómago después de la terapia, así como también la ruta de transmisión a otros sujetos.^{9,11} La prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral no había sido establecida antes en pacientes mexicanos con gastritis; sin embargo, nuestro porcentaje es más elevado que los obtenidos en un estudio reciente realizado en 57 pacientes japoneses atendidos en el Hospital Médico y Dental de Tokio, en donde la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral fue del 35.1%,¹¹ y que los registrados en el estudio realizado en la Universidad de Ulm, Alemania, en 42 pacientes, en donde la prevalencia de *H. pylori* en la saliva fue del 52%.²⁵ La elevada prevalencia de *H. pylori* encontrada por nosotros puede deberse a que en México, al igual que en otros países subdesarrollados, el porcentaje de infección por *H. pylori* es más elevado que el de los países industrializados,^{6,7} y ello puede ocasionar que aumente la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral.

Con el propósito de establecer si existía relación entre la prevalencia de *H. pylori* en la saliva y la edad, agrupamos a los pacientes por intervalos de edad (*Cuadro III*), y encontramos que la presencia de *H. pylori* fue más elevada (46.6%, n = 28) en los pacientes con edades comprendidas entre 17-27 años, seguida por los intervalos de 28-38 años (23.3%, n = 14), de 39-49 (16.7%, n = 10), de 50-60 (11.7%, n = 7) y de 61-72 (1.7%, n = 1). La elevada prevalencia de *H. pylori* detectada en el grupo de 17-27 años de edad corrobora lo descrito por otros autores,³¹ quienes establecieron que la infección por *H. pylori* en los países subdesarrollados se adquiere en los primeros años de vida, la cual continúa en aumento hasta alcanzar porcentajes muy elevados en las primeras dos décadas de vida,^{30,36} para finalmente decrecer a partir de los 50 años.⁸

Amplificación de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex en las muestras de saliva. En este trabajo detectamos variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* en 27 (45%) de las 60 muestras de saliva PCR positivas (*Cuadro IV*). El alelo m2 de *vacA* se presentó en seis muestras (10%), s1 en cinco (8.3%), s2 y m1 en cuatro muestras cada uno (6.6%, en cada caso). La presencia de los genotipos detectados por nosotros coinciden con la gravedad de la gastritis de los pacientes, corroborando lo propuesto en un estudio realizado en el Centro Médico de Tennessee, en el cual se compararon los genotipos de las citotoxinas de *H. pylori* en el estómago y la saliva de 31 pacientes con gastritis y úlcera péptica.³⁹ Estos autores detectaron tanto *vacA* m2 como s1 en 77% de las muestras de saliva (17/22), m1 en cinco (23%) y *cagA* en cinco (23%); no se detectó s2.

Nosotros detectamos solamente la asociación s1/m1 en un paciente, s1/cagA en otro y s2/cagA en cuatro muestras. Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* que presentan la combinación de los alelos de *vacA* s1/m2 o s1/m1 son responsables de los altos y medios niveles de producción de la citotoxina,⁴⁰ mientras que la presencia de los genotipos *vacA* s1/cagA (identificados en uno de nuestros pacientes) se ha asociado con la gastritis severa.⁴¹ Una muestra de saliva fue positiva para los alelos *vacA* s1 y *vacA* s2 (*Cuadro IV*), lo que indica que en el paciente coexistían dos subclonas diferentes de *H. pylori*.

La elevada prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos citotóxicos detectados en la cavidad oral de nuestros pacientes muestra que probablemente estas cepas podrían encontrarse también en el estómago y ser responsables de los problemas gástricos o, qui-

zá, como se ha propuesto, cepas distintas de *H. pylori* podrían existir en el estómago y en la saliva del mismo paciente.³⁸

En este estudio se correlacionó la presencia sérica de IgG contra *H. pylori* con la detección del ADN de la bacteria en la saliva de los pacientes por PCR.

Miehlke y colaboradores,⁴² en su estudio realizado en 34 pacientes con cáncer gástrico y en 35 sujetos asintomáticos, encontraron una mayor asociación de *vacA* s1 y m1 (24/34, 70.6%) y del gen *cagA* (30/34, 88.2%) en los pacientes con cáncer gástrico, con respecto al grupo control; por lo que creemos que los pacientes que presentaron las variantes alélicas de *vacA* (s1, s2, m1, m2) y el gen *cagA* (Cuadro IV) podrían estar expuestos a un riesgo importante de desarrollar enfermedades gástricas más severas.

La elevada prevalencia de *H. pylori* encontrada en la saliva de nuestros pacientes adultos con gastritis refleja que probablemente la bacteria se encuentre también en la mucosa gástrica de los individuos, en donde el tiempo de evolución de esta enfermedad, que en algunos casos ha sido de décadas, podría presentarse en el futuro como patologías más severas, si no reciben el tratamiento médico adecuado, sobre todo si consideramos la importante carga genética bacteriana detectada (*vacA* y *cagA*) en este estudio. De tal manera que el gen *vacA* que codifica la citotoxina vacuolizante *vacA*, causa degeneración vacuolar de las células gástricas epiteliales y ulceración de la mucosa gástrica⁴³ y el gen *cagA* presente en las cepas de *H. pylori* han sido asociadas con la ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y recientemente se ha demostrado que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de cinco veces más que la inducida por cepas que no presentan el gen *cagA*.⁴⁴

Los resultados obtenidos mostraron que la cavidad oral podría ser reservorio y una importante fuente de transmisión de *H. pylori* de individuo a individuo. Por otro lado, los genotipos *vacA* m2 y *vacA* s1 predominaron en la saliva de los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGA-PA, UNAM), Proyecto PAPIME PE200705.

BIBLIOGRAFÍA

- International Agency for Research on Cancer (IARC). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 61. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1994.
- Moss SF. The carcinogenic effect of *H. pylori* on the gastric epithelial cell. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 847–856.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784–789.
- Mitchell HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori* *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 241: 11–30.
- Souto FJ, Fontes CJ, Rocha GA, de Oliveira AM, Mendes EN, Queiroz DM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 171–174.
- Mitchell A, Silva TM, Barrett LJ, Lima AA, Guerrant RL. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1326–1328.
- O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-México border. *Am J Epidemiol.* 2003; 158: 816–824.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A Community-Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 178: 1089–1094.
- Li CF, Ha T, Ferguson DA Jr, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G, Thomas E. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2142–2149.
- Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; 4: 185–197.
- Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; 74: 129–134.
- Mobley HLT. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. *Gastroenterology* 1997; 113: S21–S28.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111–2115.
- Peek RM, Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 863–868.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771–17777.
- Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint WGV. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 13–17.
- Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG. Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J Microbiol Methods* 2003; 52: 197–207.
- Ching C, Wong BC, Kwok E, Ong L, Covacci A, Lam SK. Prevalence of *cagA* bearing *Helicobacter pylori* strains

- detected by the anticagA assay in patients with peptic ulcer disease and in control. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 949-953.
19. Tummuru MK, Cover TL, Blazer MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1999; 61: 1799-1809.
 20. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci (Wash)* 1996; 93: 14648-14653.
 21. Gusmão VR, Mendes EN, Queiroz DM. *vacA* Genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2853-2857.
 22. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira NA, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MMDA, Nogueira AMMF. *cagA* positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer* 1998; 78: 135-139.
 23. Alam S, Brailsford SR, Whiley RA, Beighton D. PCR based methods for genotyping viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2772-2776.
 24. Li C, Musich PR, Ha T, Ferguson DA Jr, Patel NR, Chi DS, Thomas E. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995; 48: 662-666.
 25. Song QT, Lange A, Spahr, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49: 349-353.
 26. Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy T, Chowdhury A, Santra A, Dhali GK, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J Clin. Microbiol* 2004; 42: 2821-2824.
 27. Graham DY, Adam E, Reddy GT. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1084-1088.
 28. Ramanampamony RM, Randria MJ, Razafimahefa SH, Ratsimandisa R, Rajaonarivelo P, Rajaona HR. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Malagasy population. *Bull Soc Pathol Exot* 2007; 100 (1): 57-60.
 29. Oliveira AMR, Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 2201-2204.
 30. Goodman KJ, Correa P, Tengana HJ. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 290-299.
 31. Staat MA, Kruszon-Moran D, McQuillan GM, Kaslow RA. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. *J Infect Dis* 1996; 174: 1120-1123.
 32. Lindkvist P, Asrat D, Nilsson I. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: Comparison of a high and a low prevalence country. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 181-184.
 33. Hornemann F, Nilius M, Malfertheiner P, Bartmann P. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in German infants and children. *Helicobacter* 1997; 2: 176-179.
 34. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991; 302: 1302-1305.
 35. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131.
 36. Holcombe C, Omotara BA, Eldridge J, Jones DM. *H. pylori*, the most common bacterial infection in Africa: A random serological study. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 28-30.
 37. Camargo MC, Lazcano PE, Torres J, Velasco ME, Quiterio M, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* seroprevalence in Mexican adolescents. *Helicobacter* 2004; 9: 106-114.
 38. Song QT, Haller, B, Schmid RM, Adler, G, Bode G. *Helicobacter pylori* in dental plaque. A comparison of different PCR primers sets. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 479-484.
 39. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA Jr, Litchfield P, Thomas E. Comparison of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig Dis Sci* 2002; 8: 1850-1856.
 40. Gzyl A, Berg DE, Dzierzanowska D. Epidemiology of *cagA/vacA* genes in *H. Pylori* isolated from children and adults in Poland. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 333-343.
 41. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin Pathol* 1998; 51: 55-61.
 42. Miehke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000; 87: 322-327.
 43. Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 1056-73.
 44. Lai CH, Kuo CH, Chen YC, Chao FY, Poon SK, Chang CS. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2002; 40: 3860-3862.

Correspondencia:

M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras
 París 259,
 Jardines de Bellavista
 54054 Tlalnepantla
 Edo. de México
 Tel./fax: 56 23 13 91
 E-mail:mya@servidor.unam.mx