



ARTÍCULO ORIGINAL

Frecuencia de genes de virulencia en infecciones mixtas con cepas de *Helicobacter pylori* de una población mexicana



R. González-Vázquez^{a,b}, M.G. Córdova-Espinoza^b, A. Escamilla-Gutiérrez^{c,b},
I. Morales-Méndez^d, S.A. Ochoa-Pérez^e, F. Armendáriz-Toledano^f,
J. Fonseca-Nájera^g y S. Giono-Cerezo^{b,*}

^a Laboratorio de Hematología Especial, Instituto Mexicano del Seguro Social CMN-La Raza, Hospital de Especialidades, México D.F., México

^b Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

^c Laboratorio de Urgencias y Servicio de Transfusiones, Instituto Mexicano del Seguro Social CMN-La Raza, Hospital General, México D.F., México

^d Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinosa de los Reyes», México D.F., México

^e Laboratorio de Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México «Federico Gómez», México D.F., México

^f Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

^g Departamento de Endoscopias Pediátricas, Instituto Mexicano del Seguro Social CMN-La Raza, México D.F., México

Recibido el 16 de junio de 2015; aceptado el 5 de octubre de 2015

Disponible en Internet el 23 de enero de 2016

PALABRAS CLAVE

Helicobacter pylori;
Factores de
virulencia;
Genotipificación;
Infección mixta;
ADN polimórfico
amplificado al azar

Resumen

Antecedentes: La infección por *Helicobacter pylori* se asocia con gastritis. La variabilidad genética de las cepas tiene importancia clínica. Los estudios de microdiversidad en cepas aisladas de diferente sitio anatómico en un mismo paciente revelan la posibilidad de recuperar 2 o más cepas diferentes.

Objetivos: Genotipificar por PCR multiplex según la virulencia de aislados clínicos de *H. pylori* para determinar la frecuencia de cada genotipo y relacionarlo con la evolución clínica con la finalidad de prevenir el desarrollo de enfermedades graves.

Métodos: Se estudió a 210 pacientes con alteraciones gastroduodenales; 127 cepas fueron identificadas por PCR (*glmM* y *cagE*) y después clasificadas según su virulencia por PCR multiplex. Se hizo la prueba de Fisher para evaluar la relación entre genotipo y resultado clínico. La técnica de RAPD-PCR se empleó como método de huella genética y para analizar la presencia de infecciones mixtas.

* Autor para correspondencia. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Col Casco de Sto. Tomás. Del Miguel Hidalgo. CP 11340. Teléfono: +57296000, ext. 62374; fax: +46211.

Correo electrónico: sgiono@yahoo.com (S. Giono-Cerezo).

Resultados: *cagA*, *vacAs₁* y *vacAm₁* estuvieron presentes en todos los aislados clínicos. Las cepas se clasificaron como: tipo I, 40.15% (51/127); tipo II, 22.04% (28/127), y triples positivas, 28.4% (36/127); se detectaron 2 genotipos nuevos: 1) *babA₂⁺*, *cagA⁺*, *vacAs₁⁺*, 6.29% (8/127), y 2) *babA₂⁺*, *cagA⁻*, *vacAs₂/m₂⁺*, 3.14% (4/127). *cagE* se detectó en las cepas tipo II.

Conclusiones: La prueba de Fisher no mostró una asociación significativa entre el resultado clínico y el genotipo en la población estudiada. Los genotipos circulantes en la población mexicana fueron *cagA⁺*, *vacAs₁*, *vacAm₁*. La PCR multiplex puede usarse para genotipificar rápidamente las cepas de *H. pylori*. *cagE* es un buen marcador para identificar cepas *cag*-PAI+.

© 2016 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Helicobacter pylori;
Virulence factors;
Genotyping;
Mixed infection;
Random Amplified
Polymorphic DNA

Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is associated with gastroduodenal diseases. Virulence of clinical isolates is related to clinical outcome. Moreover, with microdiversity studies in clinical isolates from a single patient, but from a different origin (antrum or corpus), it is possible to demonstrate that there are simultaneous mixed infections.

Aims: To genotype *H. pylori* strains with multiplex PCR, according to their clinical virulence, and in this manner know the frequency of each genotype and relate it to clinical outcome in order to prevent the development of severe diseases.

Methods: A total of 210 patients with gastric alterations were studied. Virulence classification of *H. pylori* strains was carried out with multiplex PCR and 127 strains were identified as *H. pylori* by PCR (*glmM* and *cagE*). Genotype and clinical outcome were evaluated with the Fisher's exact test. In addition, RAPD-PCR was performed as a fingerprinting method to analyze mixed infections.

Results: The *cagA*, *vacAs₁*, and *vacAm₁* genes were detected in all the clinical isolates. Strains were classified as: type I, 40.15% (51/127); type II, 22.04% (28/127); and type III, 28.4% (36/127), but two new different genotypes were also detected: (1) *babA₂⁺*, *cagA⁺*, *vacAs₁⁺*, 6.29% (8/127) and (2) *babA₂⁺*, *cagA⁻*, *vacAs₂/m₂⁺*, 3.14% (4/127). The *cagE* gene was detected in type I strains.

Conclusions: The Fisher's exact test did not support a significant association between clinical outcome and genotype. The main circulating genotypes in the Mexican population studied were: *cagA⁺*, *vacAs₁*, and *vacAm₁*. Multiplex PCR can be used as a screening test for *H. pylori* strains. Furthermore, the *cagE* gene is a good marker for identifying *cag*-PAI positive strains.

© 2016 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa, espiriforme, microaerofílica, que se asocia a gastritis y enfermedad ulcerosa péptica (EUP) y se le considera como factor de riesgo en cáncer gástrico^{1,2}. La mitad de la población mundial está infectada con esta bacteria pero solamente el 10% de los infectados presentarán manifestaciones clínicas. La infección por *H. pylori* puede inducir gastritis crónica, EUP y adenocarcinoma gástrico³. Existe evidencia que muestra la importancia clínica en la variabilidad genética de cepas de *H. pylori*. Se conocen 3 factores de virulencia como marcadores epidemiológicos y para determinar la presentación clínica: los genes *vacA* (toxina vacuolizante), *cagA* (asociado a la citotoxina) y *babA* (BabA adhesina)⁴.

El gen *vacA*, que codifica la toxina vacuolizante (VacA), se encuentra en la mayoría de las cepas. Dentro de *vacA* en la

región media (*m*) se encuentra un polimorfismo significativo con 2 alelos, *m₁* o *m₂*, así como en la región de la secuencia señal (*s*) con 3: *s_{1a}*, *s_{1b}*, o *s₂*. Los posibles genotipos son: *s_{1b}m₁*, *s_{1a}m₁*, *s_{1a}m₂*, *s_{1b}m₂*, *s₂m₁* y *s₂m₂*, aunque el genotipo *s₂m₁* se reporta como inusual⁵. El genotipo *s_{1a}m₁*, más que el *m₂*, se asocia a EUP³. Una tercera determinante polimórfica de actividad vacuolizante ha sido descrita y se le conoce como la región intermedia (*i*). Existen 2 subtipos de región *i*: *i₁* e *i₂*, y se han observado variaciones entre poblaciones. Los estudios han mostrado una relación significativa entre el alelo *i₁* y la producción de CagA y la presencia del alelo tipo *s₁* en varias cepas de *H. pylori* aisladas en individuos de varios países. Esta asociación podría indicar que la región intermedia tiene un papel importante en manifestaciones clínicas más severas de infección crónica de *H. pylori*⁶. CagA se asocia a un riesgo incrementado para cáncer gástrico. CagA es una proteína que es inyectada al interior celular a través de un sistema de secreción tipo IV, en el

interior celular es fosforilada e induce cambios morfológicos y probablemente de proliferación celular lo que favorece el desarrollo de gastritis y cáncer gástrico⁷. Es parte de la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) que también contiene el gen *cagE*, el cual ha sido asociado a EUP en niños y adultos con presentaciones clínicas severas, especialmente en los países desarrollados^{8,9}. *BabA* media la adherencia de *H. pylori* al antígeno de grupo sanguíneo humano Lewis-b en células epiteliales gástricas. Tiene un gen silencioso *babA₁* (no expresado) y un gen *babA₂* sí expresado. La secuencia de estos genes difiere por una delección de 10 pares de bases en el péptido señal de *babA₁*. Numerosos estudios indican la relación entre cepas *babA₂* positivas, con un incremento de mayor densidad de *H. pylori* e inflamación celular de la mucosa, y un riesgo para desarrollar manifestaciones clínicas severas¹⁰⁻¹².

Anteriormente, se clasificaron las cepas como tipo I (*cagA*⁺, *vacA*⁺) y tipo II (*cagA*⁻, *vacA*⁻), de acuerdo con la presencia/ausencia de los genes. Las cepas de tipo I se consideran más virulentas que las cepas tipo II¹³. Existe un tercer tipo de cepa, llamada «cepa triple positiva», con la presencia de los genes *babA*⁺, *vacA*⁺ y *cagA*⁺. Se han asociado las cepas «triple positiva» a EUP y adenocarcinoma gástrico¹⁴.

Estudios de huella genética han mostrado que cepas independientes de *H. pylori* se distinguen unas de otras a través de la técnica ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Los estudios de microdiversidad en aislados clínicos de diferente sitio anatómico en un mismo paciente confirman la posibilidad de recuperar 2 o más cepas diferentes. Mutaciones espontáneas después del pasaje seriado en cerdos gnotobióticos revelaron que *H. pylori* puede adaptarse al portador permitiendo la transferencia genética intercepas para inducir a la reorganización de su genoma para adaptarse a un nuevo ambiente¹⁵⁻¹⁷.

También podrían emerger cepas recombinantes con diferentes combinaciones de genotipos parentales en infecciones mixtas. Varios métodos de huella genética de ADN aplicados a diversos aislados de *H. pylori* tomados de un mismo paciente muestran que todas las distintas cepas se pueden derivar de una cepa parental ancestral pero que han experimentado cambios independientes en su genoma, un fenómeno conocido como «microevolución». Por lo tanto, es capaz que un mismo paciente sea portador de 2 o más cepas con distinto genotipo^{17,18}.

En México, hay estudios que relacionan la presencia del microorganismo con la manifestación clínica, cáncer gástrico, y con la presencia de infecciones mixtas, obteniendo en un mismo paciente diferentes genotipos¹⁹. Un estudio reciente reportó la presencia en la misma cepa de 2 alelos distintos del gen *iceA*²⁰. El objetivo de nuestro estudio fue genotipificar cepas clínicas de *H. pylori* a través de PCR multiplex según su clasificación de virulencia y así determinar la frecuencia de cada genotipo y relacionarlo con la presentación clínica con la finalidad de prevenir el desarrollo de enfermedades graves como el cáncer gástrico o la EUP.

Métodos

Pacientes y muestras clínicas. Se estudió a 210 pacientes con alteraciones gástricas que fueron sometidos a endoscopia gastrointestinal superior en el Hospital General «La Raza»

del Instituto Mexicano del Seguro Social en la ciudad de México. Los pacientes de los cuales se aisló *H. pylori* tenían entre 4 y 17 años de edad. El único paciente adulto del que se aisló *H. pylori* tenía 62 años. De aquellos pacientes, 11 de 18 eran masculinos y 7 de 18 femeninos. Los diagnósticos predominantes fueron: enfermedad de reflujo gastroesofágico, enfermedad ácido péptica y dolor abdominal recurrente.

Entre enero del 2003 y enero del 2005 se obtuvieron 210 biopsias del cuerpo gástrico de cada uno de los pacientes y fueron evaluadas para la presencia de *H. pylori* por medio de la prueba rápida de ureasa (PRU) y cultivo. La PRU produjo 30 biopsias positivas (14.3%) del cuerpo gástrico. Por medio de cultivo se recuperó *H. pylori* en 18 pacientes: 17 fueron niños y un adulto. Previamente al estudio, se obtuvo de cada paciente su consentimiento informado por escrito para la participación en este estudio. Fue aprobado con antelación el protocolo de estudio por el Comité de Ética del Hospital General.

Cultivo de *H. pylori* y subclonaje. Se cultivó *H. pylori* de las biopsias. Los especímenes fueron homogenizados en un triturador de tejidos estériles con un diluyente (buffer de fosfato salino, pH 7.5). Los homogeneizados fueron colocados en placas Agar Casman (Difco®) suplementadas con 10% de sangre de oveja desfibrinada y el suplemento selectivo de Skirrow (vancomicina, trimetoprim, polymixina B, OXOID®) y se incubaron a 37 °C con un suministro del 5% CO₂, el 85% NO₂ y el 5% O₂ durante 4 días. Colonias típicas fueron identificadas como *H. pylori* a través de morfología, por coloración de Gram (varillas en forma curva o espiral gramnegativa) y pruebas bioquímicas (ureasa positiva, oxidasa y pruebas de la catalasa). Como se mencionó anteriormente, se cultivó *H. pylori* ATCC 43504 y se utilizó como el control positivo. Se aislaron un total de 18 cepas clínicas (porcentaje de recuperación, 13.3%) y se les refirió a cada una como un «pool» de cultivo bacteriano. Durante el proceso de aislamiento primario, 4-8 aislados clínicos se tomaron de cada placa por separado y luego se propagaron en placas individuales. A cada una de estas cepas que se obtuvieron se le llamó «colonia individual» o aislado clínico (n = 127). Los aislados clínicos se conservaron en criotubos a -70 °C en solución suplementada de Hank con 20% glicerol (tabla 1)^{16,21}.

Extracción de ADN. Fue extraído el ADN de la cepa de referencia y de los aislados clínicos de las colonias y colectado en tubos de microcentrífuga que contenían 100 µL de PBS (buffer de fosfato salino, pH 7.5). Las suspensiones fueron agitadas vigorosamente en vórtex por 2 min y hervidas en un baño de agua por 15 min. Se empleó el método de tiocianato de guanidina para la extracción de ADN. El «pellet» de ADN se suspendió en TE (Tris-EDTA, pH 8.0) y se congeló a -70 °C hasta su uso.

Detección del gen *glmM*. La presencia del gen *glmM* fue utilizada para monitorizar la pureza de las muestras de ADN y para validar todos los análisis subsecuentes. El ADN genómico de las muestras bacterianas se amplificó con «primers» oligonucleótidos sintéticos GLMM y GLMMR1 (tabla 2), previamente descrito²².

Los perfiles de las huellas genéticas por RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar ADN-PCR). Se llevó a cabo RAPD-PCR para evaluar la variedad genética entre las cepas. La reacción se realizó en 25 µL que contenía: 65 ng de ADN *H. pylori*, 0.8 µM de los «primers» 1254, 1281, 1283 y 1247, 0.4 mM de cada dNTP, 1.5 U de *Taq*DNA polimerasa

Tabla 1 Aislados y subclonas de *H. pylori* obtenidos de pacientes mexicanos

Identificación de cepa	Sujeto	Edad (años)	Aislados clínicos	Subclonas RAPD	Genotipo	Diagnóstico
73	N	10	8	2	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GA
126	N	14	8	1	<i>babA₂⁺, cagA⁻, vacAs₂m₂⁺</i>	UG
B075	N	7	10	3	<i>babA₂⁻, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GN
78	N	14	8	2	<i>babA₂⁻, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	UD
94	N	11	8	1	<i>babA₂⁻, cagA⁻, vacAs₂m₂⁺</i>	GN
144	N	17	8	1	<i>babA₂⁻, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GN
175	N	16	6	1	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GL
39	N	11	10	1	<i>babA₂⁻, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GL
B046	N	9	8	2	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GL
B119	N	17	7	3	<i>babA₂⁺, cagA⁻, vacAs₁m₁⁺</i>	UG
58	N	8	6	1	<i>babA₂⁻, cagA⁻, vacAs₂m₂⁺</i>	GN
62	N	7	4	2	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GL
29	N	5	4	2	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁⁺</i>	GN
36	N	17	6	3	<i>babA₂⁻, cagA⁻, vacAs₂m₂⁺</i>	GN
63	N	7	7	1	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GN
163	N	15	7	2	<i>babA₂⁻, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GN
110	N	5	4	1	<i>babA₂⁺, cagA⁺, vacAs₁m₁⁺</i>	GN
54	Ad	60	8	2	<i>babA₂⁻, cagA⁻, vacAs₂m₂⁺</i>	GL

Ad: adulto; clonas: cepas de subclonaje; GA: gastritis aguda; GL: gastritis leve; GN: gastritis nodular; N: niño o niña; RAPD-PCR: perfil RAPD-PCR diferente; UD: úlcera duodenal; UG: úlcera gástrica.

Tabla 2 «Primers» utilizados para la amplificación de alelos *vacA*, *cagA*, *babA₂*, *cagE* y *glmM* por PCR convencional y multiplex

Gen	«Primer»	«Primer» con secuencia 5'-3'	Amplificación bp	Referencia
<i>vacAm₁/m₂^a</i>	VAGF	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570/645	Atherton et al., 1994
	VAGR	GCGTCAAATAATCCAAGG		
<i>vacAs₁/s₂^a</i>	VAIF	ATGGAAAATACAACAAACACAC	259/286	Atherton et al., 1994
	VAIR	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>cagA^a</i>	F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGGAGG	340	Tummuru et al., 1993
	R1	CTGCAAAAAGAATGTTTGGCAG		
<i>babA₂^a</i>	babA ₂ F	AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA	812	Mizushima et al., 2001
	babA ₂ R	TGTTAGTGATTTCCGGTGTAGGAC		
<i>cagE^b</i>	F1	GCGATTGTTATTGTGCTGTAG	329	Tsuneo et al., 2001
	R1	GAAGTGGTTAAAAATCAATGCCCC		
<i>glmM^b</i>	GLMMF	GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG	140	Córdova et al., 2011
	GLMMR	GCA TTC ACA AAC TTA TCC CCA ATC		

^a Conjuntos de «primers» en multiplex.

^b Se llevó a cabo la amplificación por medio de PCR convencional.

(Invitrogen®), y 3 mM de MgCl₂. El programa de amplificación utilizado fue de 4 ciclos a 94 °C, 5 min; 36 °C, 5 min, y 72 °C, 5 min, y 30 ciclos de 94 °C, 1 min; 36 °C, 1 min, y 72 °C, 2 min, y luego 72 °C, 10 min en un Perkin-Elmer®, descrito anteriormente^{22,23}. Las bandas RAPD-PCR se evaluaron como presente o ausente y se ensambló una matriz binaria. Las bandas se asignaron según los marcadores moleculares (1 Kb, 100 pb). Se realizó un dendrograma con NTSYSpc-2.02j por el método de grupos de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA por su sigla en inglés) y con un coeficiente de asociación sencillo^{24,25}. Finalmente, el coeficiente de correlación cofenético (CCrC) se obtuvo utilizando la prueba de Mantel y la prueba del mejor punto de corte²⁶.

Detección de los genes *vacA*, *cagA* y *babA₂* por PCR multiplex. La PCR multiplex se llevó a cabo para genotipificar

los genes de virulencia (*vacA*, *cagA*, *babA₂*). Fue utilizado el ADN genómico de *Proteus mirabilis* como el control negativo y H₂O como el control en la reacción. Los «primers» utilizados para la PCR se muestran en la [tabla 2](#). Se llevó a cabo amplificación en una reacción con un volumen de 25 µL que contenía 10 pM del «primer» *babA₂* y 5 pM de los «primers» *cagA* y *vacA*, 10 X solución Buffer (Invitrogen®), 1.5 mM MgCl₂, 25 mM dNTPs (Invitrogen®), 80 ng de plantilla de ADN y 1 U *Taq* de ADN polimerasa (Invitrogen®). Los ciclos se realizaron en un termociclador Perkin Elmer® con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 57 °C por 45 s y 72 °C por 1 min. Se distinguieron los amplicones por su tamaño después de la separación por medio de electroforesis en una agarosa de 1.5% y revelados con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

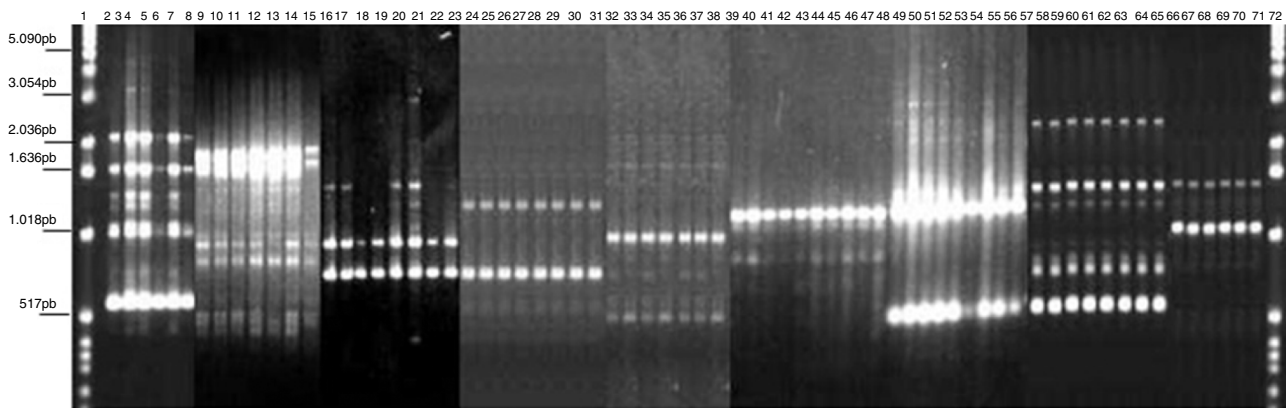


Figura 1 RAPD-PCR, 1281 oligonucleótido. 1Kb escalera, marcador de talla molecular, carril 1, reactivos de control, 2-8: Bx78 (cepas 78C2, 7b, 10, 11, 13, 14); 9-15: 63 cepa (63 C1, 2, 4, 5, 6, 7, 22); 16-23: B046 cepa (B046 C1, 5, 9, 10, 11, 13, 14, 15); 24-31: 29 cepa (29 C5, 7, 8, 12, 16, 17, 19, 20); 32-38: 58 cepa (58 C1, 2, 4, 8, 9, 13, 15); 39-48: 144 cepa (144 C1, 2, 4, 6, 8, 20, 21, 22, 23, 25); 49-57: 54 cepa (54 C1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13); 58-65: 163 cepa (163 C1, 2, 5, 10, 11, 30, 31, 34); 66-71: 175 cepa (175 C2, 4, 7a, 11, 20, 24); 72: escalera marcador de talla molecular 1Kb.

Los amplicones *H. pylori* ATCC 43504 obtenidos por PCR multiplex fueron purificados con un kit Marligen (Bioscience®) en acuerdo con las instrucciones del fabricante y secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación IBT, UNAM, en Cuernavaca, Morelos, para validación PCR multiplex. Las secuencias fueron comparadas con las secuencias reportadas en la literatura médica publicada en la base de datos de la NCBI por análisis BLAST. Adicionalmente, se llevaron a cabo los métodos Southern Blot y Dot Blot para comparar y validar los resultados obtenidos de la PCR.

Detección del gen *cagE*. Se realizó la amplificación del gen *cagE* como marcador *cag*-PAI, en vez de *cagA*. Los «primers» utilizados se muestran en la tabla 2. Se realizó la amplificación en una reacción con volumen de 25 µL que contenía: 10 pM de cada «primer», 10 X solución Buffer (Invitrogen®), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 25 mM dNTPs (Invitrogen®), 80 ng ADN y 1 U *Taq* de polimerasa de ADN (Invitrogen®). El protocolo de PCR incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 1 min.

Análisis de datos, análisis univariados. Se llevó a cabo una matriz de genotipos para todos los genes codificados como presente (1) o ausente (0). Se calculó el porcentaje de alelos positivos (presente) para cada gen a partir de los datos de todas las cepas. Para evaluar si existía variación entre la PCR convencional y multiplex en la detección de genes de virulencia (*babA*₂, *cagA*, *vacAs*₁*m*₁), se obtuvo el porcentaje de verdaderos y falsos verdaderos usando la prueba de la chi al cuadrado. Para valorar si la presencia o ausencia de los alelos (*vacAs*₁, *vacAs*₂, *vacAm*₁, *vacAm*₂, *cagA*, *babA*₂) se asociaba a la presentación clínica (gastritis aguda, úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastritis nodular y gastritis leve), se realizó una prueba de Fisher para cada gen usando una tabla de contingencia de 2 × 2 en relación con el número de cepas, con o sin alelo, y la presentación clínica²⁷.

Resultados

RAPD-PCR. El perfil RAPD-PCR reveló 3 a 17 bandas para cada cepa que se analizó. Los clones aislados de cada paciente

se mencionan en la tabla 1. La RAPD-PCR detectó la presencia de múltiples cepas de *H. pylori*, cada una diferente de la otra, en una misma persona. Cuatro «primers» produjeron marcadores genéticos y perfiles RAPD reproducibles (la genotipificación de virulencia se realizó solamente para 127 cepas) entre las cepas estudiadas. El análisis RAPD agrupó cepas basado en la enfermedad clínica. La mayoría de los niños estaban colonizados por una sola cepa. La información sugiere, aunque la población *H. pylori* consistía de bacterias estrechamente relacionadas, que no era completamente homogénea; variantes genéticas de las mismas cepas de *H. pylori* pueden existir entre los aislados. Dos poblaciones de *H. pylori* con distintos patrones RAPD colonizaron a 7 niños. Sin embargo, 3 niños fueron colonizados por clones más estrechamente relacionados con cepas de individuos independientes que entre ellos mismos (tabla 1; figs. 1 y 2). Los resultados del estudio indicaron que hubo una colonización de múltiples cepas en niños mexicanos. El CCRc fue 0.86801 (rango 0.6-0.9), mostrando una representación significativa de la relación genética entre los aislados.

Evaluación por PCR multiplex. Ciento veintisiete cepas clínicas de *H. pylori* obtenidas de una población pediátrica se caracterizaron por PCR convencional y multiplex (fig. 3) y los resultados de los métodos Southern Blot y Dot Blot fueron correlacionados. La capacidad de detección del Dot Blot fue: *cagA* (100 pg/µl), *vacAs*₁ (100 pg/µl), *vacAm*₁ (100 pg/µl) y *babA*₂ (1 pg/µl). Ambos métodos detectaron el mismo número de positivos verdaderos y/o cepas negativas para *vacAs*₁*m*₁, *vacAs*₂*m*₂ y *cagA*. Sin embargo, el gen *babA*₂ tuvo una diferencia estadísticamente significativa (chi al cuadrado) (χ^2) (tabla 3).

Cepas *H. pylori*: clasificación y genotipificación. Se detectó una alta cantidad de los genes *cagA*, *vacAs*₁ y *vacAm*₁ en todos los aislados clínicos. Los resultados de los genes se muestran en la tabla 4. Las cepas genotipificadas por PCR multiplex se clasificaron como tipo I, tipo II y triple positivas, clasificados así por Atherton et al.⁵ y Gerhard et al.¹⁴. Encontramos 2 genotipos diferentes de las cepas del tipo I, II y triple positivas, que se describieron como «no tipificable». En una cepa (B119) y sus aislados clínicos (n = 7), el gen *cagA* fue negativo utilizando PCR convencional

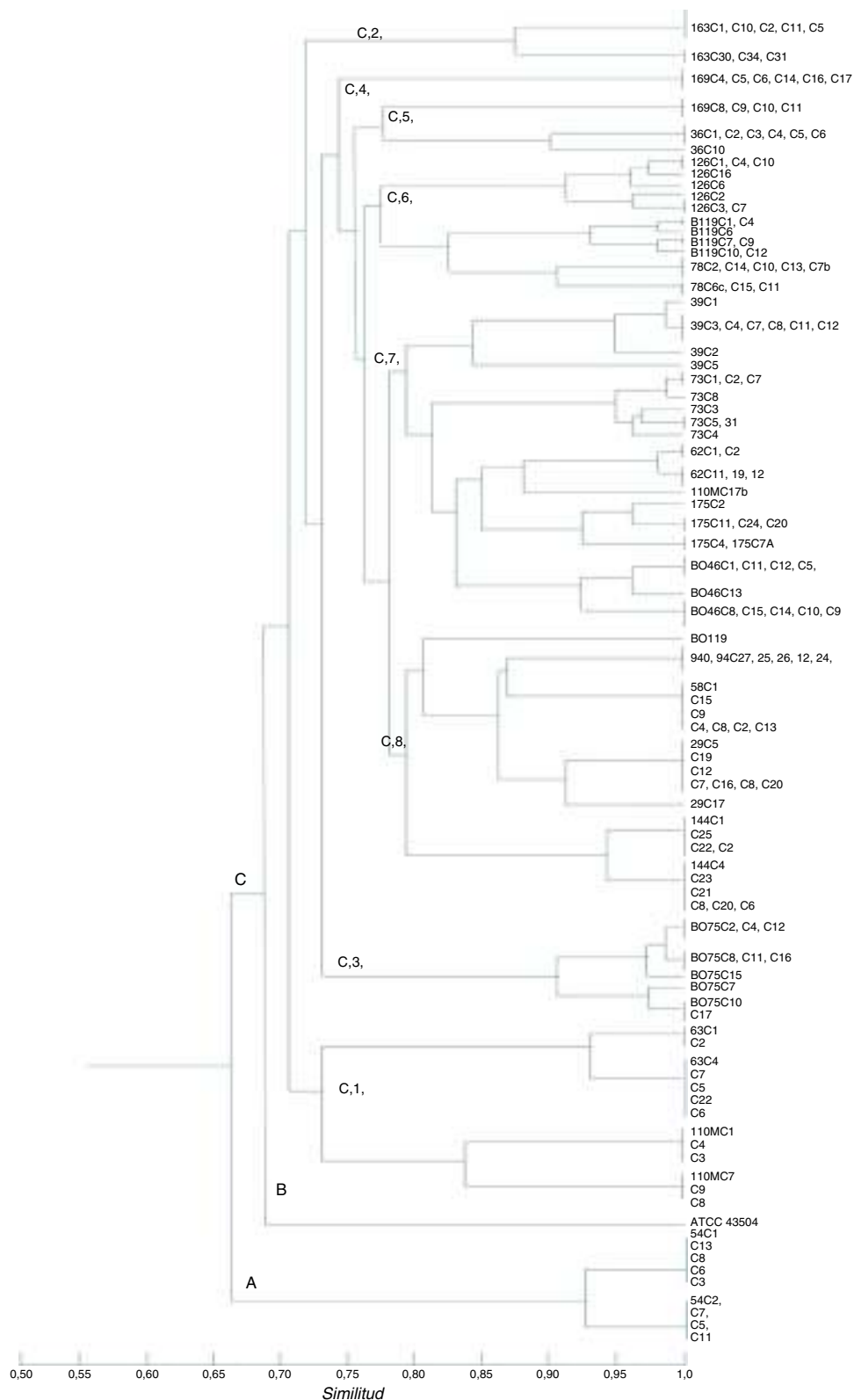


Figura 2 Dendrograma RAPD-PCR de cepas de *H. pylori*. Tres racimos separados se indican con A, B y C. El racimo A muestra la cepa adulta (54); el racimo B consiste de la cepa ATCC 43504; el racimo C consiste de las cepas pediátricas mexicanas (73, 126, B075, 78, 94, 144, 175, 39, B046, B119, 58, 62, 29, 36, 63, 163, 110 y 169); 169 cepas no se genotificaron. El grupo C muestra 8 racimos. El CCrC fue 0.86801. Fueron utilizados el programa pasado y el coeficiente de asociación sencillo.

Tabla 3 Comparación de detección de gen de virulencia entre PCR convencional y multiplex

Gen/alelo	Valor	Convencional	Multiplex	χ^2	P
<i>babA</i> ₂	P	48	15	82.323	1.16 × 10 ⁻¹⁹
	N	79	112		
<i>cagA</i>	P	84	87	0.32845	0.56657
	N	43	40		
<i>vacAs</i> ₁	P	91	91	0	n.s.
	N	36	36		
<i>vacAs</i> ₂	P	36	36	0	n.s.
	N	91	91		
<i>vacAm</i> ₁	P	87	87	0	n.s.
	N	40	40		
<i>vacAm</i> ₂	P	36	36	0	n.s.
	N	91	91		

N: valor negativo; n.s.: no significativo; P: valor positivo; χ^2 : estadística de chi al cuadrado. Obtuvimos valores falsos negativos cuando comparamos los resultados por PCR convencional.

Tabla 4 Porcentaje y cantidad total de los marcadores de virulencia de cepas pediátricas de *H. pylori* *babA*₂, *cagA* y *vacAs*₁*m*₁

Gen/alelo	Cantidad total	95% límite de confianza	Porcentaje
<i>vacAm</i> ₁ ¹	89	61.3-77.9	68.5
<i>vacAm</i> ₂	34	19.3-35.4	28.34
<i>vacAm</i> ⁻	4	0.9-7.9	3.16
<i>vacAs</i> ₁	93	64.6-80.7	71.63
<i>vacAs</i> ₂	34	19.3-35.4	28.34
<i>cagA</i> ⁺	84	57.2-7.3	66.14
<i>cagA</i> ⁻	43	25.7-42.8	33.86
<i>babA</i> ₂ ⁺	48	29.3-46.8	37.79
<i>babA</i> ₂ ⁻	79	53.2-70.7	62.21

Altos porcentajes. Programa EpiInfo™ 2000.

*babA*₂: gen codificante de BabA adhesina dirigido a antígenos del grupo sanguíneo Lewis-b (α -1, 3/4-difucosilados); *cagA*: gen codificante de una proteína CagA altamente inmunogénica; *vacA*: gen de citotoxina vacuolizante. En negrita: porcentajes más altos de cada gen o alelo.

Tabla 5 Asociación entre virulencia de gen y presentación clínica

Gen	GA	UD	UG	GN	GL	Cantidad total
%	n = 1/18	n = 1/18	n = 2/18	n = 9/18	n = 5/18	
<i>vacAm</i> ₁	1(100) [*]	1(100) [*]	1(50) [*]	5(55.5) [*]	4(80) [*]	12
<i>vacAm</i> ₂	0(0) [*]	0(0) [*]	1(50) [*]	3(33.3) [*]	1(20) [*]	5
<i>vacAs</i> ₁	1(100) [*]	1(100) [*]	1(50) [*]	6(66.6) [*]	4(80) [*]	13
<i>vacAs</i> ₂	0(0) [*]	0(0) [*]	1(50) [*]	3(33.3) [*]	1(20) [*]	5
<i>cagA</i>	1(100) [*]	1(100) [*]	0(0) [*]	6(66.6) [*]	4(80) [*]	12
<i>babA</i> ₂	0(0) [*]	0(0) [*]	2(100) [*]	3(33.3) [*]	3(60) [*]	8

GA: gastritis aguda; GL: gastritis leve; GN: gastritis nodular; UD: úlcera duodenal; UG: úlcera gástrica;

^{*} p ≥ 0.05, prueba de Fisher.

o multiplex, pero detectable cuando se usó el método Dot Blot, por lo tanto, todos se clasificaron como cepas triple positivas. Los genotipos *vacAs*₁ y *vacAm*₁ estuvieron presentes en la mayor parte de las presentaciones clínicas y los genes *cagA* fueron asociados con mayor frecuencia a gastritis y enfermedad de úlcera gástrica. El gen *babA*₂ se encontró en pacientes con úlcera gástrica y gastritis leve, pero la prueba de Fisher no apoyó una asociación significativa

entre la presentación clínica y los genes estudiados (tabla 5). El gen *babA*₂ se detectó en 48 aislados clínicos y se distribuyó principalmente en cepas triple positivas (n = 29). El gen *babA*₂ también se detectó en las cepas «no tipificables» mencionadas anteriormente de la siguiente manera: *babA*₂⁺, *cagA*⁺, *vacAs*₁⁺ (n = 8), *babA*₂⁺, *cagA*⁻ *vacAs*₂/*m*₂⁺ (n = 4). Cada paciente estaba infectado con solo un tipo de cepa (tipo I, II, triple positiva o con la cepa «no tipificable»)

Tabla 6 Clasificación de los genotipos de las cepas de *H. pylori*

Clasificación	Genotipo	Cepas totales n = 127 (%)	RC	Número de pacientes
I	<i>babA</i> ₂ ⁻ , <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacAs</i> ₁ <i>m</i> ₁ ⁺	51 (40.15)	GA,GN,UD, GL	6
II	<i>babA</i> ₂ ⁻ , <i>cagA</i> ⁻ , <i>vacAs</i> ₂ <i>m</i> ₂ ⁺	28 (22.04)	GN, GL	4
III	<i>babA</i> ₂ ⁺ , <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacAs</i> ₁ <i>m</i> ₁ ⁺	29 (22.83)	GN, GL	5
1	<i>babA</i> ₂ ⁺ , <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacAs</i> ₁ ⁺	8 (6.29)	GN	1
2	<i>babA</i> ₂ ⁺ , <i>cagA</i> ⁻ , <i>vacAs</i> ₂ <i>m</i> ₂ ⁺	4 (3.14)	UG	1
3	<i>babA</i> ₂ ⁺ , <i>cagA</i> ⁻ , <i>vacAs</i> ₁ <i>m</i> ₁ ⁺	7 (5.51)	UG	1

GA: gastritis aguda; GL: gastritis leve; GN: gastritis nodular; RC: resultado clínico; UD: úlcera duodenal; UG: úlcera gástrica.

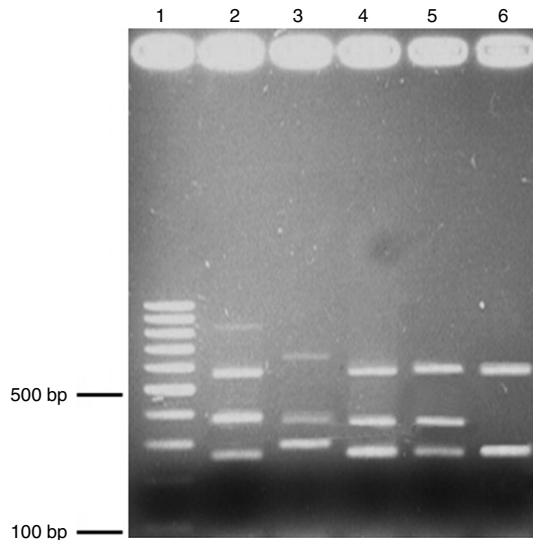


Figura 3 PCR multiplex. Electroforesis en gel de agarosa (1.7%); muestra los amplicones obtenidos a través de PCR multiplex. Carril 1, 100-bp escalera; carril 2, control positivo de cepas de virulencia triple, carriles 3-6, aislados clínicos. *babA*₂ (812 bp); *vacAs*₁ (259 bp); *vacAs*₂ (286 bp); *vacAm*₁ (570 bp); *vacAm*₂ (645 bp) y *cagA* (340 bp). El ADN genómico de la cepa *H. pylori* ATCC 43504 se utilizó como control positivo.

(tabla 6). El gen *cagE* se amplificó por PCR. La amplificación del gen *cagE* se ha utilizado para evaluar la presencia o ausencia de *cag*-PAI, ya que la ausencia del gen *cagA* en cepas *H. pylori* no significa que el *cag*-PAI está del todo ausente. El gen *cagE* se detectó en todas las cepas de tipo II de pacientes con enfermedad de úlcera (100%), por lo tanto, el gen *cagE* puede ser útil y es mejor marcador que el gen *cagA* en la detección de la presencia de la isla de patogenicidad completa *cag*-PAI.

Discusión

Existen muchas ventajas en el empleo de la PCR multiplex. Un ejemplo es cuando se trabaja con microorganismos exigentes o nosocomiales, ya que esta metodología incrementa la efectividad de detección y reduce el costo de examinación. La PCR multiplex puede ser útil para genotipificar aislados clínicos obtenidos de biopsias o cultivos y diagnosticar efectivamente la presencia de una infección por *H. pylori*, pero también para diferenciar las especies de *Helicobacter* aparte de *H. pylori*^{28,29}. En

nuestro estudio, la sensibilidad y la especificidad de la PCR multiplex fueron excelentes para todos los genes. La PCR multiplex puede utilizarse como un examen discriminador para distinguir las cepas tipo I, que son más virulentas y que se asocian a desenlaces clínicos más severos. Algunos autores han descrito que puede existir una relación entre genotipo de la cepa y la presentación clínica, permitiendo la predicción del segundo³⁰. Otros autores han reportado que cepas triple positivas (*babA*₂⁺, *cagA*⁺, *vacAs*₁*m*₁⁺) se asociaban a úlcera duodenal y adenocarcinoma¹⁴. En poblaciones adultas, cepas triple positivas se vinculan a enfermedades severas. Sin embargo, no encontramos relación alguna entre genotipo de la cepa y la presentación clínica en la población pediátrica que se estudió. De acuerdo con nuestros resultados, los aislados clínicos de tipo II se relacionaban más a gastritis no atrófica.

Los aislados clínicos se clasificaron como tipo I (n=51), tipo II (n=28) y triple positivas (n=29). Usamos la valoración Dot Blot para detectar el gen *cagA* en la cepa B119 (n=7) porque no fue posible detectar el gen por PCR convencional ni multiplex. Por lo tanto, la cantidad de cepas triple positivas (n=36) se incrementó. Diecinueve aislados clínicos no se pudieron genotipificar utilizando la clasificación convencional (tipo I, II o triple positiva), entonces los nombramos cepas «no tipificables»: *babA*₂⁺, *cagA*⁺ y *vacAs*₁⁺ (n=4) y *babA*₂⁺, *cagA*⁻ y *vacAs*₂*m*₂⁺ (n=8).

La variabilidad del gen *vacA* se ha asociado previamente con regiones geográficas que incluyen Colombia, la región sureste de Brasil y los Estados Unidos, así como otras poblaciones occidentales, y cepas con un genotipo *vacAs*₁*m*₁ se consideraron productoras más altas de citotoxina, asociadas en lo principal con niños sintomáticos, en pacientes con EUP y en pacientes con dispepsia funcional. Sin embargo, en China, Japón y Corea del Sur no es tan predominante este genotipo y no existe relación³¹. En el presente estudio, la forma alélica *m*₁ del gen *vacA* estaba en todos los aislados clínicos y en aquellos pacientes con EUP (68.5%). Los pacientes infectados con cepas que tenían la forma alélica *s*₁ (71.63%), así como cepas conteniendo los genotipos *vacAs*₂*m*₂ y *vacAs*₁*m*₁, se correlacionaron con gastritis aguda, gastritis leve, gastritis nodular y úlcera duodenal. Sin embargo, no se encontró una relación concluyente entre el genotipo de la cepa y la presentación clínica. En nuestro estudio, las cepas *cagA*⁺ (66.14%) se aislaron de pacientes con gastritis y enfermedad ulcerosa péptica.

Detectamos cepas tipo II (n=28) aisladas de pacientes con gastritis nodular y leve. La amplificación del gen *cagE* se realizó para verificar la presencia de *cag*-PAI, ya que este gen

se encuentra en todas las cepas tipo II. Dada que la ausencia de *cagA* no significa necesariamente la falta, la interrupción o la pérdida parcial del *cag*-PAI, amplificamos el gen *cagE*, utilizándolo como un marcador opcional para verificar la falta de *cag*-PAI y finalmente correlacionar las cepas tipo II, *cagE*⁺, y desenlaces clínicos severos. En nuestra población, el gen *babA* se detectó con un porcentaje bajo (37.79%). En contraste, estudios sudamericanos alternos han reportado una frecuencia que va del 46 al 82.3%³¹. En nuestro estudio, el gen *babA* se encontró principalmente en pacientes con gastritis (n=6) y EUP (n=2), al igual que ha sido reportado en otros países^{32,33}.

Cepas tipo I (n=51) se aislaron de pacientes con gastritis (n=5) y enfermedad de úlcera duodenal (n=1). Nuestros resultados son similares a aquellos reportados en una población occidental, en la cual el predominio de este genotipo era del 60-90%. Sin embargo, el tamaño de la muestra debe de ser incrementado para así establecer una relación entre el genotipo de cepa y la presentación clínica.

Las cepas triple positivas (*cagA*, *vacAs₁m₁*, *babA₂*) se aislaron de pacientes con gastritis (n=5), pero no pudimos establecer una relación entre el genotipo y la presentación clínica. Aun así, en varios estudios en Colombia fue posible correlacionar la EUP y el carcinoma gástrico con estos genotipos^{14,31}. En países occidentales, estos tipos de cepas son un factor de riesgo, pero no se ha encontrado una relación con desenlaces clínicos severos en poblaciones japonesas. En el presente estudio, todos los aislados clínicos se analizaron por RAPD-PCR y en un mismo paciente observamos algunos aislados clínicos con diferentes patrones de huella genética, indicando que el paciente se presentó con una infección mixta (2 cepas con diferencias genéticas derivaron de la cepa 73). Todos los resultados de la PCR multiplex de estos distintos aislados de un mismo paciente tenían el mismo genotipo (*babA₂*, *cagA*, *vacAs₁m₁*). Se observaron resultados similares en los aislados clínicos 39C5, B119C2, 29C17, 36C10 y 110M17.

La cepa 126 y sus clones respectivos (126C1, 126C2, 126C3, 126C4, 126C6, 126C7, 126C10 y 126C16) fueron aislados de un paciente de 14 años de edad con úlcera gástrica. En esta cepa, se observó el mismo patrón RAPD de huella genética con el mismo genotipo (*babA₂*⁺ *cagA*⁻, *vacAs₂m₂*⁺). Por lo tanto, el gen *babA*⁺ en estas cepas podría incrementar el factor de riesgo para el desarrollo de úlcera gástrica.

En conclusión, la PCR multiplex se ha utilizado como un rápido ensayo para la detección de más de un factor de virulencia en una sola reacción y también como un método para diagnosticar enfermedades, reduciendo los costos de los exámenes para los pacientes y mejorando el tratamiento. Nuestro estudio propone el uso de la PCR multiplex como una estrategia de cribado para aislados clínicos de *H. pylori* y clasificarlos de acuerdo con los factores de virulencia de una manera rápida y eficaz, para prevenir el desarrollo de enfermedades severas y para ser utilizadas como una herramienta de monitorización clínica para pacientes que ya han sido diagnosticados. Los resultados obtenidos en este estudio muestran una variedad de genotipos de virulencia en México. El genotipo de cepa prevalente que circula en la población mexicana fue el tipo I (*babA₂*⁻, *cagA*⁺, *vacAs₁m₁*) y se encontró en todas las presentaciones clínicas. El gen *cagE* era un mejor marcador que el *cagA* en la detección de cepas *cag*-PAI-positiva.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiamiento

Se recibió apoyo financiero para este estudio de las instituciones SIP-IPN (20130644), CONACYT, SNI, EDI, y COFAA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener algún conflicto de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Mexicano del Seguro Social y al Dr. Consuelo Ruelas-Vargas del Departamento de Endoscopias Pediátricas del Hospital General «La Raza» por la ayuda recibida en la recolección de especímenes.

Referencias

1. Saribas Z, Demir H, Saltik T, et al. Detection of *cagA* prevalence in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44:461-5.
2. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol.* 2012;12:203-368.
3. Yamaoka Y. Mechanism of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7:629-41.
4. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997;40:701-3.
5. Atherton JC, Cao P, Peek Jr R.M., et al. 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.
6. Chung C, Olivares A, Torres E, et al. Diversity of *VacA* intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. *J Clin Microbiol.* 2010;48:690-6.
7. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor *cagA* is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14428-33.
8. Day AS, Jones NL, Lynett J, et al. *cagE* is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulceration in Children. *J Infect Dis.* 2000;181:1370-5.
9. Pelz C, Steininger S, Weiss C, et al. A novel inhibitory domain of *Helicobacter pylori* protein CagA reduces CagA effects on host cell biology. *J Biol Chem.* 2011;286:8999-9008.

10. Homan M, Sterbenc A, Kocjan B, et al. Prevalence of the *Helicobacter pylori* babA2 gene and correlation with the degree of gastritis in infected Slovenian children. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;106:637–45.
11. Almeida N, Donato MM, Romãoziinho JM, et al. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Dig Dis Sci*. 2015;60:74–85.
12. Fujimoto S, Ojo OO, Arnqvist A, et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:49–58.
13. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44:151–6.
14. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12778–83.
15. Akopyanz NS, Eaton KA, Berg DE. Adaptive mutation and co-colonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun*. 1995;63:116–21.
16. Patra R, Chattopadhyay S, de R Gosh P. Multiple infection and microdiversity among *Helicobacter pylori* isolates in a single host in India. *PLoS One*. 2012;7:e43370.
17. Marouni MJ, Sela S. Fate of *Streptococcus pyogenes* and epithelial cells following internalization. *J Med Microbiol*. 2004;53:1–7.
18. Prouzet MV, Abid MH, Lamouliatte H, et al. Pathogen evolution in vivo: Genome dynamics of two isolates obtained 9 years apart from duodenal ulcer patient infected with a single *Helicobacter pylori* strain. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4237–41.
19. Sampieri CL, Mora M. Gastric cancer research in Mexico: A public health priority. *World J Gastroenterol*. 2014;20:4491–502.
20. González VR, Herrera GS, Córdova EMG, et al. *Helicobacter pylori*: Detection of *iceA₁* and *iceA₂* genes in the same strain in Mexican isolates. *Arc Med Res*. 2012;43:339–46.
21. Majalca MC, Rivera CJ, Ochoa PSA, et al. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*. 2001;25:85–89.
22. Córdova EMG, González VR, Morales MI, et al. Detection of the *glmM* gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1650–2.
23. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:5137–42.
24. Crisci JV, López AMF. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Washington D.C.: Secretaría General de la OEA. Programa Regional de desarrollo científico y tecnológico; 1983. p. 128.
25. Lynch M, Milligan BG. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecology*. 1999;43:91–9.
26. Manly BF. Randomization, bootstrap, and Monte Carlo methods in biology. 2nd edition. London: Chapman and Hall; 1997.
27. Zar JH. Biostatistical analysis. 5th ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall; 2010.
28. Baele M, van de Bulck K, Decostere A, et al. Multiplex PCR assay for differentiation of *Helicobacter felis*, *H. bizzozeronii*, and *H. salomonis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1115–22.
29. Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy T. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 2014;42:2821–4.
30. Yu J, Leung WK, Go YYM, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* babA₂ status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*. 2002;51:480–4.
31. Goncalves MH, Silva CI, Braga NMB, et al. *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol*. 2013;51:988–9.
32. Wang J, van Door LJ, Robinson PA, et al. Regional variation among *vacA* alleles of *Helicobacter pylori* in China. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1942–1945.
33. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, et al. Clinical relevance of the babA₂ genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2463–5.