

Inmunodiagnóstico empleando péptidos sintéticos de CagA para el estudio de la infección por *Helicobacter pylori*

Autor Diana Ortiz-Princz¹, Estefani De Sousa², Esteban Kosak², Ricardo López², Angelita Lorenzo³, Henry Bermudez³, Oscar Noya⁴, María Eugenia Cavazza⁵

Afiliación 1 Laboratorio de Microbiología Molecular. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" MPPS-UCV y Cátedra de Inmunología. Escuela José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. Correo electrónico: dprincz@gmail.com
2 Escuela José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
3 Laboratorio de Química de Proteínas y Laboratorio de Síntesis de Péptidos. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
4 Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
5 Cátedra de Bioquímica. Escuela José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

Revista GEN (Gastroenterología Nacional) 2020; 74(Supl 1): 3-10.

© Sociedad Venezolana de Gastroenterología. Caracas, Venezuela- ISSN 2477-975X.

Fecha de recepción: 19/09/2020

Fecha de revisión: 08/10/2020

Fecha de Aprobación: 19/10/2020

Resumen

Introducción: *H. pylori* tiene alta variabilidad genética, sus genes *cagA* y *vacA* le confieren mayor virulencia. Es necesario contar con pruebas de diagnóstico no invasivas que detecten los factores de virulencia. **Objetivo:** estandarizar un ensayo de ELISA utilizando péptidos sintéticos para determinar anticuerpos IgA secretores en saliva e IgG séricos anti CagA de *H. pylori*. **Pacientes y Métodos:** Se evaluaron 61 pacientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Vargas de Caracas. Se realizó: estudio histológico, diagnóstico molecular de *H. pylori* y genes *vacA* y *cagA*. Se estandarizaron ensayos de ELISA para la detección de IgA secretora e IgG utilizando péptidos sintéticos de CagA y antígeno de *H. pylori*. **Resultados:** 73,7% fue positivo para *H. pylori* por histología, 62,3% tuvo gastritis crónica activa, 21,3% atrofia gástrica y 13,11% metaplasia intestinal. 85% fue positivo para *H. pylori* por PCR, 44,68% *cagA*+ y 32,65% *vacA* s1m1. Los péptidos de CagA fueron inmunogénicos, valores de anticuerpos IgA secretores e IgG anti péptidos de CagA fueron significativamente más elevadas ($p < 0,0001$) en pacientes *cagA*+ por PCR que en pacientes *cagA*-. **Conclusiones:** El desarrollo de péptidos sintéticos de CagA y su utilización en el inmunodiagnóstico, puede contribuir como prueba no invasiva de primera línea y estudios epidemiológicos.

Palabras clave: *H. pylori*, *cagA*, péptidos sintéticos, ELISA, diagnóstico serológico, diagnóstico molecular.

IMMUNODIAGNOSIS USING SYNTHETIC CAGA PEPTIDES FOR THE STUDY OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Summary

Introduction: *H. pylori* has high genetic variability, *cagA* and *vacA* genes confer greater virulence. Noninvasive diagnostic tests that detect virulence factors are necessary. **Objective:** to standardize an ELISA assay using synthetic peptides to determine secretory IgA antibodies in saliva and serum IgG anti CagA from *H. pylori*. **Patients and Methods:** 61 patients were evaluated in the Gastroenterology Service of Hospital Vargas de Caracas. The histological study and molecular diagnosis of *H. pylori* and *vacA* and *cagA* genes was made. ELISA assays for the detection of secretory IgA and IgG were standardized using synthetic peptides from CagA and *H. pylori* antigen. **Results:** 73.7% were positive for *H. pylori* by histology, 62.3% had active chronic gastritis, 21.3% gastric atrophy and 13.11% intestinal metaplasia. 85% were positive for *H. pylori* by PCR, 44.68% *cagA* + and 32.65% *vacA* s1m1. CagA peptides were immunogenic, secretory IgA antibody and IgG anti CagA peptide values were significantly higher ($p < 0.0001$) in *cagA*+ patients by PCR than in *cagA*- patients. **Conclusions:** The development of synthetic CagA peptides and their use in immunodiagnosis can contribute as a first-line non-invasive test and epidemiological studies.

Key words: *H. pylori*, *cagA*, synthetic peptides, ELISA, serological diagnosis, molecular diagnosis.

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo Gram-negativo flagelado que coloniza la mucosa gástrica de más de la mitad de la población mundial⁽¹⁾. La infección por esta bacteria se ha asociado a condiciones socioeconómicas bajas, hacinamiento e inadecuadas condiciones de la vivienda^(1,2). Su prevalencia es elevada en diversas regiones de Latinoamérica y países subdesarrollados mientras que, es relativamente baja en países industrializados o poblaciones con condiciones socioeconómicas altas⁽³⁾. La persistencia de la infección con *H. pylori* puede ocasionar el desarrollo de diversas patologías como gastritis, úlcera gástrica o duodenal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) y adenocarcinoma gástrico; por lo que es considerado el primer agente etiológico para la mayoría de los desórdenes gastroduodenales siendo declarado como agente carcinógeno humano tipo I en 1994, por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional del Cáncer⁽⁴⁾. La infección por *H. pylori* induce un proceso inflamatorio que produce gastritis crónica, la cual puede permanecer asintomática durante años o evolucionar desde una gastritis no atrófica a patologías gástricas severas⁽⁵⁾, es por ello que existe consenso a nivel mundial sobre la importancia de su diagnóstico y erradicación, la cual ha sido planteada como estrategia para la prevención de cáncer gástrico en el mundo⁽⁶⁾. *H. pylori* tiene alta variabilidad genética y sus genes *cagA* y *vacA* le confieren mayor virulencia, siendo las cepas *cagA+* las que están asociadas con mayor cronicidad de la infección, patologías gástricas severas y desarrollo de cáncer gástrico⁽⁵⁾. En Venezuela, la infección gástrica por *H. pylori* es de alta prevalencia en niños y adultos, los estudios han demostrado que más de la mitad de la población está infectada, siendo que el 50% de los infectados lo están por cepas *cagA+*⁽⁷⁻¹⁰⁾, por otro lado, nuestro país tiene una alta incidencia de cáncer gástrico, con énfasis en la zona Andina⁽¹¹⁾.

El diagnóstico de la infección es complejo, principalmente por la descrita inconsistencia entre las diferentes pruebas disponibles, dicha inconsistencia está determinada por las diferencias de sensibilidad y especificidad de las pruebas, la calidad y precisión de la toma de muestra, la experticia del evaluador (examen histológico) y el tipo de prueba de diagnóstico utilizada. En general, las pruebas no invasivas están conformadas por la prueba de Carbono radiactivo (¹³C y ¹⁴C), también conocida como la prueba del aliento, la detección de antígenos en heces y la serología. De éstas, la primera es considerada la prueba de oro⁽¹²⁾. Ninguna de las dos primeras detecta el tipo de cepa de acuerdo a sus factores de virulencia. Existen algunos estuches comerciales serológicos que detectan anticuerpos anti *CagA*, sin embargo solo pueden ser poco accesibles, sobre todo en poblaciones de bajos recursos. Por su parte, las pruebas invasivas requieren la toma de biopsias gástricas a partir de las cuales se puede realizar el cultivo, la examinación histológica, PCR y la prueba de ureasa rápida. Estas pruebas se fundamentan en la detección directa de la bacteria, sus genes o productos metabólicos.

Es indiscutible que existe una gran necesidad de disponer de pruebas de diagnóstico no invasivas, que además éstas determinen los factores de virulencia de la cepa que son de importancia clínica, que sean de alta sensibilidad y especificidad, de costos accesibles y que den respuesta a los requerimientos existentes en el país.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando péptidos sintéticos desarrollados en Venezuela, para detectar anticuerpos IgA secretores en saliva e IgG séricos anti *CagA* de *H. pylori*.

Pacientes y Métodos

Se evaluaron las muestras de 61 pacientes con gastropatías y presencia sugestiva de *H. pylori*, tratados o no con terapia antimicrobiana, que por criterio médico requirieron someterse a estudio endoscópico de las vías digestivas superiores en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Vargas de Caracas (años 2013 y 2016).

Se excluyeron: pacientes que habían consumido antibióticos durante los últimos seis meses e inhibidores de la bomba protones dos semanas previas a la intervención, pacientes con cáncer gástrico, úlceras sangrantes y/o cuadros de anemias.

Bajo criterio médico y previo consentimiento informado de cada paciente y aprobación del protocolo por parte del Comité de Bioética, se realizó toma de biopsias de antro gástrico a cada paciente, destinadas a: diagnóstico de *H. pylori* por biología molecular utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y evaluación histopatológica. Fueron tomadas de último las biopsias destinadas a anatomía patológica para evitar el contacto con formol de las muestras para PCR, realizando la adecuada desinfección de la pinza entre cada paciente para evitar la infección cruzada.

Estudio histológico:

El estudio anatomopatológico fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vargas de Caracas y estuvo basado en el Sistema de Clasificación Sydney actualizado⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Diseño y síntesis de Péptidos:

Los péptidos de *CagA* utilizados en este estudio fueron diseñados y sintetizados en estudios previos⁽¹⁶⁾. Las secuencias de las proteínas de *CagA* fueron adquiridas de la base de datos del Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank-PDB) NCBI. Se realizó Blast de todas las secuencias con la finalidad de seleccionar secuencias conservadas y se utilizó el programa ClustalW para alinear las secuencias y realizar el análisis de las regiones conservadas. Posteriormente se analizaron las secuencias empleando el programa ANTHEPROT 4.5 y se seleccionaron secuencias de 15 a 20 aminoácidos que cumplieran con los parámetros de antigenicidad, hidrofiliidad y accesibilidad del solvente⁽¹⁷⁾. La síntesis simultánea de péptidos

se realizó siguiendo el sistema de síntesis de péptidos en fase sólida⁽¹⁸⁾, utilizando la metodología de T Boc⁽¹⁹⁾ los péptidos fueron clivados con ácido fluorhídrico (HF) y liofilizados para ser utilizados en los inmunoensayos. La caracterización de los péptidos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas, para lo cual se empleó un espectrómetro 3200 API-QTRAP de Applied Biosystem. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Péptidos del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

Antígeno de *H. pylori*:

El antígeno fue preparado a partir de cepas de *H. pylori* previamente crecidas en cultivo, las cuales fueron cosechadas y sometidas a sonicación determinando concentración de proteínas por el método de Lowry, siguiendo el procedimiento previamente descrito⁽²⁰⁾.

Determinación de IgG e IgAs anti-péptidos y Ag de *H. pylori* a través de la técnica de ELISA.

Se utilizaron muestras de sueros y salivas previamente recolectadas de los pacientes. Las placas de ELISA Nunc MaxiSorp fueron sensibilizadas durante dos 2 horas a 37°C con 2,5µg/pozo de antígeno de *H. pylori* y los péptidos se utilizaron a una concentración de (20µg/ml), ambos diluidos en buffer carbonato pH 9,6. Luego de 3 lavados PBS-Tween 0,05%, se bloqueó durante 2 horas a 37°C. Las muestras se colocaron a una dilución de 1:10 para las salivas y de 1:100 para los sueros en PBST-BSA al 0,5% y se incubaron 1 hora a 37°C. Se utilizó Anti IgA (1/2000) o Anti IgG (1/6000) marcados con peroxidasa como anticuerpos secundarios para cada caso y fueron incubados por una hora a 37°C. Para el revelado se utilizó una solución de 10mg de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) en buffer citrato pH 5,4 y H₂O₂. La determinación de absorbancia se realizó a 450nm en el lector de ELISA.

Identificación de genes de virulencia de *H. pylori* a través de la técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico a partir de biopsias de antro gástrico se obtuvo por medio del método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Los cebadores utilizados para cada gen identificado en este estudio y las condiciones de amplificación se utilizaron de acuerdo a lo descrito previamente⁽²¹⁾.

Análisis estadístico

Las proporciones fueron comparadas utilizando la prueba exacta de Fisher y Chi-cuadrado. Los valores de Densidad Óptica de las determinaciones de anticuerpos fueron analizados calculando las medianas, las cuales fueron comparadas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Se evaluaron 61 pacientes con gastropatías crónicas; 70,49% (43/61) mujeres y 29,51% (18/61) hombres, con edades comprendidas entre 23 a 84 años (media de 53,26 ± 13,32 años).

Estudio Histopatológico de las biopsias gástricas

Se detectó la presencia de *H. pylori* en el 73,77% (45/61) de las muestras histológicas (Tabla 1). De acuerdo al sistema de clasificación Sydney, 62,3% (38/61) presentaron gastritis crónica activa, 21,31% (13/61) atrofia gástrica, 13,11% (8/61) metaplasia intestinal y un 3,28% (2/61) de los pacientes no presentaron ningún cambio histológico ($*p < 0,0001$) (Tabla 2).

Tabla 1. Distribución según sexo y edad de pacientes pediátricos con diagnóstico de COVID-19.

Variables (n = 61)	n	(%)
Presente*	45	73,77
Ausente	16	26,23

* $p < 0,0001$ al comparar el número de biopsias con *H. pylori* presente por análisis histológico con el número de biopsias con ausencia de *H. pylori*.

Tabla 2. Prevalencia del diagnóstico anatomopatológico de biopsias gástricas de los pacientes evaluados.

Diagnóstico Anatomopatológico (n = 61)	n	(%)
Normal	2	3,28
Gastritis crónica activa	38	62,3
Atrofia gástrica	13	21,31
Metaplasia Intestinal	8	13,11

* $p < 0,0001$ al comparar el número de pacientes con cada patología.

Detección de los genes *ureC*, *vacA* y *cagA* por PCR

Se detectó el gen *ureC* en el 80,7% (46/57) ($p < 0,0001$) de las muestras de ADN extraídas a partir de las biopsias gástricas de los pacientes, 85,96% (49/57) ($p < 0,0001$) de las muestras presentó alguna de las variantes alélicas s/m del gen *vacA* y en 44,68% (21/47) de las muestras positivas para *H. pylori* se detectó el gen *cagA* ($p < 0,0001$) (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia de los genes de virulencia de *H. pylori* determinados por PCR en biopsias gástricas de los pacientes evaluados.

Gen	Positivos		Negativos	
	n	(%)	n	(%)
ureC (n=57)*	46	80,70	11	19,30
vacA (n=57)*	49	85,96	8	14,04
cagA (n=47)*	21	44,68	26	55,31

*p<0,0001 al comparar:

Número de positivos y negativos para el gen ureC.

Número de positivos y negativos para el gen vacA.

Número de positivos para el gen cagA con positivos para el gen ureC y vacA.

La variante alélica s1/m1 del gen vacA se observó con mayor frecuencia en un 32,65% (16/49) (p<0,0001) de las muestras, seguido de la variante s1 sin detección de la región m en un 22,45% (11/49). En menor frecuencia se detectaron las variantes s2/m2 12,24% (6/49) y s1/m2 en 10,2% (5/49), así como la variante s2 sin detección de la región m en 2,04% (1/49). También se evidenció infección mixta determinada por la presencia de distintas variantes alélicas del gen, detectándose: 8,16% (4/49) de muestras s1/m1 y s2/m2, 4,08% (2/49) s1 y s2/m2, 4,08% (2/49) s1s2 sin detección de m, 2,04% (1/49) s1/m1 y m2 y 2,04% (1/49) s1 y s2/m1 (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de las variantes alélicas del gen vacA de *H. pylori* determinados por PCR en biopsias gástricas de los pacientes evaluados.

Alelos del gen vacA Positivos (n=49)	s1/m1*	s1	s2/m2	s1/m2	s1 y s2/m1 y m2
n	16	11	6	5	4
%	32,65	22,45	12,24	10,20	8,16

Alelos del gen vacA Positivos (n=49)	s1 y s2/m2	s1 y s2	s1/m1 y m2	s1 y s2/m1	s2
n	2	2	1	1	1
%	4,08	4,08	2,04	2,04	2,04

*p< 0,05 al comparar la prevalencia de los alelos s1/m1 con s2/m2.

**p<0,0001 al comparar la prevalencia del alelo s1 con s2 y m1 con m2.

Determinación por ELISA de los anticuerpos IgA secretores en saliva e IgG séricos anti-CagA y anti-antígeno de *H. pylori*.

Se estandarizó un ensayo de ELISA para la evaluación de los péptidos y la determinación de anticuerpos IgA secretores e IgG séricos. Se evaluaron seis péptidos de la proteína CagA de *H. pylori*, así como también una mezcla de los mismos a la que se denominó pool CagA. La inmunogenicidad de dichos péptidos fue evaluada previamente utilizando el Ensayo de Unión a Múltiples Antígenos (MABA)⁽²²⁾ mostrando una importante reactividad antigénica⁽¹⁶⁾. La Figura 1 representa gráficamente las medianas de los valores en Densidad Óptica (D.O.) obtenidos de la lectura de los ensayos de ELISA al detectar anticuerpos IgA secretores anti *H. pylori* y anti CagA, utilizando los péptidos sintéticos, en las muestras de saliva de los pacientes evaluados. Evidenciando que las medianas de los valores de anticuerpos IgA secretores anti el antígeno de *H. pylori*, detectados en saliva, fueron significativamente más elevados (p<0,0001) en pacientes infectados por *H. pylori* que en pacientes no infectados. Al evaluar cada péptido de CagA así como el pool se determinó que la mediana de los valores obtenidos para cada péptido también fue significativamente más elevada (p<0,0001) en los pacientes infectados al compararlos con los controles negativos.

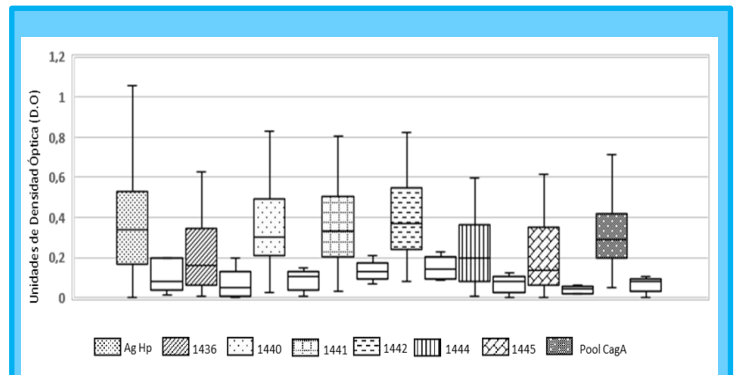


Figura 1. Detección de IgA secretora en saliva anti *H. pylori* y anti. péptidos de CagA por el método de ELISA.

Al evaluar los sueros para detectar anticuerpos específicos IgG anti antígeno de *H. pylori*, así como anti los péptidos de CagA, se evidenció que éstos fueron significativamente más elevados (p<0,0001) en pacientes infectados por *H. pylori* que en pacientes no infectados en todos los casos con excepción del péptido 1441 (p<0,05) y el péptido 1436 donde no hubo diferencia estadísticamente significativa (Figura 2).

Detección de los anticuerpos IgA secretores anti-*H. pylori* y anti-péptidos de CagA de acuerdo a la positividad por PCR.

Con el objeto de evaluar los péptidos que mostraron mayor inmunogenicidad, se seleccionaron los péptidos 1442, 1444 y 1445 y se determinaron anticuerpos IgA secretores e IgG

séricos en muestras de pacientes positivos y negativos para el gen *cagA* detectado por PCR (Figuras 3 y 4).

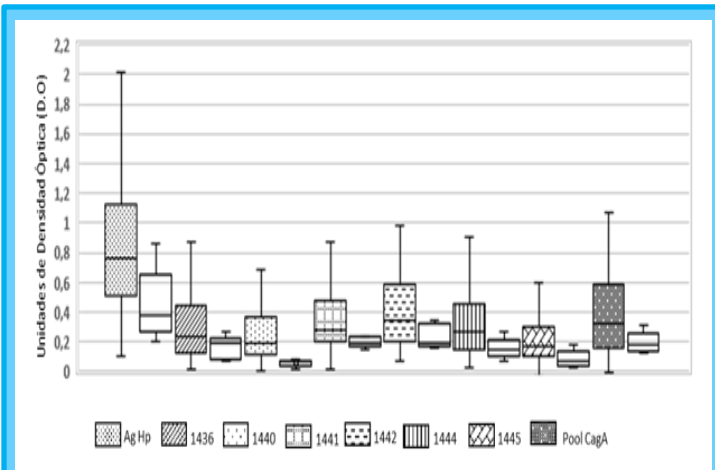


Figura 2. Detección de IgG sérica anti-*H. pylori* y anti-péptidos de CagA por el método de ELISA.

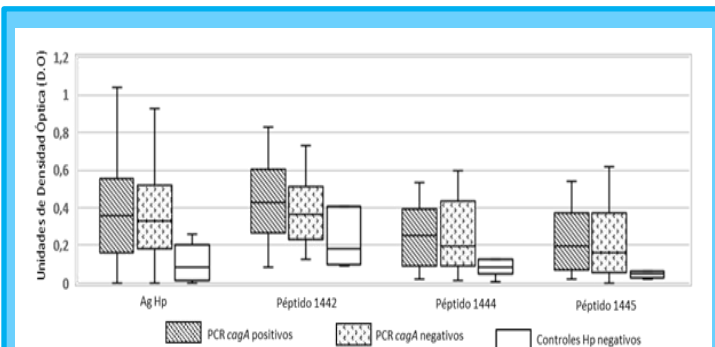


Figura 3. Detección de anticuerpos IgA secretores anti-*H. pylori* y anti-péptidos de CagA por ELISA, de acuerdo a la presencia del gen *cagA*.

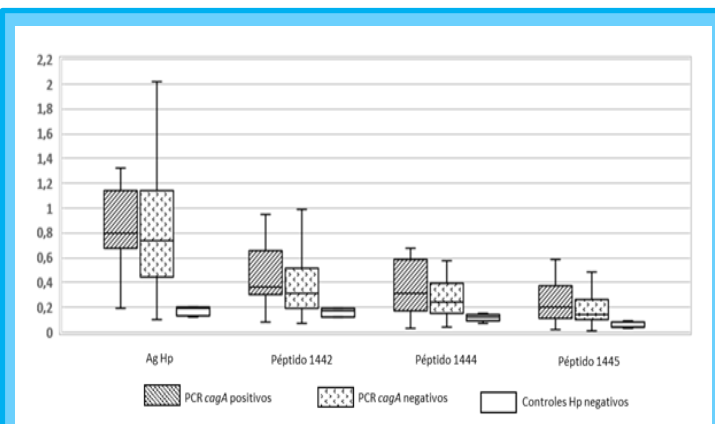


Figura 4. Detección de anticuerpos IgG séricos anti-*H. pylori* y anti-péptidos de CagA por ELISA, de acuerdo a la presencia del gen *cagA*.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas de las medianas de los valores de anticuerpos IgA secretores ($p < 0,0001$) e IgG séricos ($p < 0,05$) entre los pacientes en los que se detectó el gen *cagA* al compararlos con los pacientes negativos para el gen *cagA* y estos a su vez con los pacientes controles no infectados con *H. pylori*.

Discusión

La infección por *H. pylori* es de alta prevalencia en Venezuela y el mundo, siendo la causa de diversas patologías gástricas. El cáncer gástrico es la cuarta causa de cáncer en el mundo y la segunda causa de mortalidad por cáncer⁽²³⁾, siendo la infección por *H. pylori*, sus factores de virulencia y el establecimiento de la infección, uno de los factores etiológicos descritos en los eventos de la cascada que va desde lesiones preneoplásicas al desarrollo de cáncer gástrico⁽⁵⁾. En este estudio se evidenció la presencia de *H. pylori* en las muestras histológicas de 73,77% (45/61) de los pacientes evaluados, además lesiones gástricas encontradas fueron gastritis crónica activa 62,3% (38/61), atrofia gástrica 21,31% (13/61) y metaplasia intestinal 13,11% (8/61).

Ha sido establecido que la inflamación superficial de la mucosa gástrica desencadenada por *H. pylori*, representa el primer eslabón de la cadena de lesiones que en algunos pacientes pueden culminar en cáncer gástrico⁽⁵⁾ de manera que la prevención y la detección temprana de los factores de riesgo así como la comprensión de las diferentes fases de la cascada precancerosa, son estrategias que contribuirían favorablemente a la disminución de la incidencia de enfermedades gástricas severas en nuestra población⁽⁹⁾.

La realización del diagnóstico molecular a través de la detección de genes conservados y genes de virulencia de *H. pylori* en el ADN de biopsias de los pacientes, arrojó un 85,96% de positividad para *H. pylori* por PCR, evidenciando una mayor sensibilidad de la técnica molecular lo cual concuerda con otros reportes^(21,24,25) y evidencia la importancia de realizar diferentes pruebas para concluir el diagnóstico certero, tomando en cuenta las diferencias de sensibilidad y especificidad en las distintas pruebas y sobre todo en la distribución desigual de la bacteria en la mucosa gástrica, cuando se trata de pruebas que dependen de la toma de biopsia, lo cual puede traducirse indiscutiblemente en errores de su detección⁽²⁶⁾. Además, es importante destacar que se ha reportado que el uso de medicamentos como bismuto, antibióticos e inhibidores de la bomba de protones y hemorragias en la mucosa, pueden transformar la forma típica de *H. pylori* de espiral a cocoide, indetectable por microscopía de rutina^(27,12).

El gen *ureC* fue detectado en el 80,7% de las muestras evaluadas y el gen *vacA* en el 85,96%. Por lo tanto, el porcentaje de positividad para ambos genes conservados de *H. pylori* (*ureC* y *vacA*) fue similar. Los alelos del gen *vacA* asociados a mayor virulencia, s1/m1, fueron detectados en mayor frecuencia en un 32,65%, seguido de s1 sin detección de la región m, en 22,45%. Evidenciándose además varios casos

de infección mixta. Ha sido ampliamente reportado que las cepas con variantes alélicas s1/m1 presentan mayor citotoxicidad debido a la elevada producción de la proteína VacA, quien induce vacuolización en la célula epitelial y el consecuente daño al epitelio gástrico, la producción de esta proteína es menor en las variantes alélicas s1/m2, no evidenciándose actividad citotóxica en las formas s2/m2⁽²⁸⁻³⁰⁾. Estos resultados coinciden con otros reportes nacionales y de la región Latinoamericana donde la prevalencia de cepas con las formas alélicas más virulentas de vacA es elevada^(21,24,31-33). Se detectó la presencia del gen *cagA* en 44,68% de las muestras positivas para *H. pylori*, similar a lo conseguido en trabajos previos en Venezuela donde la prevalencia de este gen alcanza la mitad de los infectados⁽²¹⁾. La proteína CagA, codificada por el gen *cagA*, el cual se localiza en el extremo 3' de la isla de patogenicidad (*cagPAI*), es translocada al interior de la célula epitelial a través del sistema secretor tipo IV y y su fosforilación resulta en cambios morfológicos de la célula y activación de las vías de señalización para la activación de factores de transcripción nuclear de citocinas pro inflamatorias^(30,34). Se han reportado los efectos combinatorios entre la expresión de factores de virulencia de *H. pylori* como *cagA*, *vacA* s1 m1, mostrando que el riesgo a desarrollar cáncer se incrementa hasta 50 veces más cuando se expresan ambos factores⁽³⁴⁾, por lo que la determinación de los mismos es de gran importancia clínica, epidemiológica y predictiva de la posible evolución del paciente infectado.

Determinar la presencia de *H. pylori* con certeza mediante un solo método diagnóstico es complejo, debido a las inconstancias existentes entre las distintas pruebas, lo cual abarca las fortalezas y debilidades de cada una⁽²⁷⁾. Por su parte, la serología es un método no invasivo que brinda como principales beneficios ser una opción simple y de bajo costo, no se altera por hemorragias gastrointestinales, e identifica factores de virulencia; sin embargo, no permite discernir entre infecciones activas o respuesta de memoria, ni tampoco permite confirmar la erradicación de la infección inmediatamente posterior a tratamiento. Sus aspectos positivos la convierten en una prueba útil para estudios de primera línea y epidemiológicos^(35,36).

En la búsqueda de métodos no invasivos que contribuyan al diagnóstico de *H. pylori* y sus factores de virulencia y entendiendo la importancia que tiene la detección de los mismos, se estandarizaron ensayos ELISA, utilizando péptidos sintéticos de CagA para detectar anticuerpos IgA secretores en saliva e IgG séricos asumiendo como prueba de oro la PCR. En este ensayo preliminar, solo cinco pacientes fueron utilizados como controles negativos, razón por la cual no se estableció un punto de corte ni se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba; sin embargo, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al analizar las medianas de las densidades ópticas (D.O.) detectadas. Cabe destacar las limitaciones que existen para recolectar biopsias de pacientes negativos, entendiendo que los pacientes con criterios endoscópicos de las vías digestivas superiores y toma de biopsias son siempre sintomáticos, donde la prevalencia de la infección por *H. pylori* es elevada y razones éticas obvias

impiden la realización de este tipo de estudio y toma de biopsias en pacientes asintomáticos.

Todos los péptidos de CagA evaluados, así como el antígeno completo de *H. pylori*, fueron reconocidos por los anticuerpos IgA secretores e IgG séricos de los pacientes evaluados, siendo significativamente más elevados ($p < 0,0001$) los valores de anticuerpos medidos en D. O en pacientes infectados por *H. pylori* al compararlos con los controles negativos, con excepción del péptido 1441 ($p < 0,005$) y el péptido 1436 que no mostró diferencia significativa en la detección del anticuerpo IgG.

Es conocido que los títulos séricos de IgG e IgA aumentados se encuentran relacionados con gastritis activa, así como con mayor nivel de daño en gastritis crónica, infiltración por *H. pylori* y cepas *cagA* positivas⁽³⁷⁾. Trabajos previos muestran que la determinación de anticuerpos IgAs específicos puede ser un indicador del proceso activo de la infección por *H. pylori*⁽²⁰⁾, de manera que los anticuerpos en saliva pueden jugar un papel importante en la inmunidad gástrica frente a la infección⁽³²⁾.

Vale la pena destacar, que en el caso del antígeno *H. pylori*, los valores fueron similares entre pacientes PCR positivos para *cagA* y pacientes con PCR negativo para el gen, puesto que el antígeno es un extracto proteico completo de la bacteria que no discrimina entre la presencia o no de CagA, lo cual corrobora su valor para detectar respuesta de anticuerpos frente a cualquier variante genética de *H. pylori*.

Al evaluar los tres péptidos de CagA que mostraron mayor inmunogenicidad tanto en la detección de anticuerpos IgA secretores como de IgG, de acuerdo a la positividad de *cagA* por PCR, se encontró que la mediana de los valores detectados fue mayor en pacientes PCR positivos para el gen *cagA* que en pacientes PCR negativos y pacientes no infectados ($p < 0,0001$). Además, los resultados mostraron que la IgA secretora obtuvo mayor reconocimiento a todos los péptidos así como al *pool* que la IgG, y que en general, algunos péptidos fueron capaces de inducir mayor respuesta IgA secretora (determinada en saliva) que IgG (determinada en suero), lo cual pudiera sugerir que estos dos tipos de anticuerpos reconocen epítopes distintos de los péptidos, reflejando las variaciones existentes entre la respuesta sistémica tipo IgG y la del sistema inmunitario de las mucosas determinada por IgA secretora.

El desarrollo de secuencias peptídicas específicas de CagA puede contribuir respuesta al diagnóstico eficaz y oportuno de la infección por *H. pylori* y sus factores de virulencia, de alta prevalencia en Venezuela y cuya detección temprana contribuye a la prevención del cáncer gástrico. La determinación de anticuerpos IgA secretores para el diagnóstico de *H. pylori* ha sido poco estudiado; sin embargo, el empleo de la saliva como fuente para la detección de anticuerpos IgAs específicos, pudiera tener valor en el diagnóstico y entendimiento de la progresión de la infección por *H. pylori*. Estos resultados preliminares muestran que es importante realizar estudios con un número más amplio de pacientes para así poder determinar con certeza la sensibilidad y especificidad de esta técnica basada en péptidos sintéticos, la cual puede ser un aporte importante a la problemática que existe en el uso de técnicas de diagnóstico para esta infección.

Conclusiones

El desarrollo de péptidos sintéticos y el hallazgo de epítopes específicos de *H. pylori*, en particular de CagA, y su utilización en el inmunodiagnóstico a través del ensayo de ELISA, puede ser una importante contribución en el diagnóstico no invasivo, de primera línea, así como también en estudios epidemiológicos, fundamentales en poblaciones de alto riesgo y alta prevalencia de infección.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Guillermo Veitía del Servicio de Gastroenterología y a la Dra. Teresa Gledhill del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vargas de Caracas por la evaluación histológica de las muestras.

Referencias

- Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection, *Aliment Pharmacol Ther* 2018;47(7):868-876.
- Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission, *Epidemiol Rev* 2000;22(2):283-297.
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis, *Gastroenterol* 2017;153(2):420-429.
- Infection with *Helicobacter pylori*, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:177-240.
- Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade, *J Dig Dis* 2012;13(1):2-9.
- Malfetheriner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report, *Gut* 2012;61(5):646-664.
- Bohórquez AE, Chiurillo J, Valderrama JM, et al. Hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos asociados a la infección por *Helicobacter pylori* considerando los genotipos cagA y vacA en pacientes con dispepsia. Servicio de Gastroenterología. Hospital central Universitario "Antonio María Pineda". Barquisimeto Estado Lara, *GEN* 2010; 64(2):76-81.
- Cavazza ME, Correnti M, Ortiz D, et al. Evaluación de los niveles de IgA secretora anti-*Helicobacter pylori* en población infantil venezolana, *Rev Soc Ven Microbiol* 2006; 25:22-26
- Ortiz-Princz D, Villalta B, Urresterazu M, et al. Detección de genes de *Helicobacter pylori* en niños venezolanos con dolor abdominal recurrente: una infección para vigilar de cerca, *Rev Soc Ven Microbiol* 2013;33(1):322-327.
- Ortiz-Princz D, Daoud G, Salgado-Sabel A, et al. *Helicobacter pylori* infection in children: Should it be carefully assessed?, *Eur Rev for Med and Pharmacol Science* 2016;20(9):1798-813.
- Rivera Y, Dorsant L, Hechavarría E, et al. Intervención educativa sobre cáncer gástrico en pacientes de Táchira, Venezuela, *Rev Inf Cient* 2014; 86(4):661-670.
- Patel SK, Pratap CB, Jain AK, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard?, *World J Gastroenterol* 2014;20(36):12847-12859.
- Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago, *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:31-34.
- Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment, *Can J Gastroenterol* 2001;15(9):591-598.
- Valdivia M. Gastritis y gastropatías, *Rev gastroenterol Perú* 2011; 31(1):38-48.
- Ortiz D. Perfil inmunológico, genotipo bacteriano y patologías gastroduodenales asociadas a la infección por *Helicobacter pylori* en individuos venezolanos [Tesis doctoral]. Caracas: Universidad central de Venezuela. Facultad de Medicina 2015.
- Deleage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C. Antheprot. An Integrated Protein Sequence Analysis Software With Client/server Capabilities, *Comput Biol Med* 2001;31: 259-267.
- Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis, *J Am Chem Soc* 1963;85: 2149-2154.
- Houghten R, Pinilla C, Blondelle S, Appel J, Dooley C, Cuervo J. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery, *Nature* 1991;354:84-86.
- Ortiz D, Daoud G, Daoud N, et al. Evaluación de los niveles de IgA secretora en niños con gastritis crónica infectados con *Helicobacter pylori*, *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 2002;65(2):44-48.
- Aguilera J, Ortiz-Princz D, Veitía G, et al. Susceptibilidad antibacteriana y diagnóstico molecular de cepas de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastropatías crónicas, *GEN* 2019; 73(4):117-124.
- Noya O, Alarcón de Noya B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens, *Immunol Lett* 1998;63(1):53-56
- Torres J, Correa P, Ferreccio C, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America, *Cancer Causes Control* 2013;24(2):249-256.
- Perrone M, González-Valencia G, Camorlinga M, Correnti M, Cavazza ME, Torres J. Genotipos vacA de *Helicobacter pylori* en una población venezolana, *Rev Soc Ven Microbiol* 2009;29(1), 39-43.

25. Armanie E, Bohórquez J, Chiurillo M. Hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos asociados a la infección por *Helicobacter pylori* considerando los genotipos cagA y vavA en pacientes con dispepsia: Servicio de Gastroenterología. Hospital Central Universitario Antonio María Pineda. Barquisimeto estado Lara, GEN 2010;64(2), 76-81.
26. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments, *World J Gastroenterol* 2015;21(40):11221-11235.
27. Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M, et al. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38(1):55-66.
28. González L, Rodríguez B. Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*, *Rev cubana med* 2011; 50(4):441-452.
29. Suzuki H, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10(3):168-174.
30. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis, *Biomed J* 2016;39(1):14-23.
31. Atrisco-Morales J, Martínez-Santos VI, Román-Román A, et al. vacA s1m1 genotype and cagA EPIYA-ABC pattern are predominant among *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis, *J Med Microbiol* 2018;67(3):314-324.
32. Ortiz-Princz D, Guariglia-Oropeza V, Avila M, et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes in Cuban and Venezuelan populations, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(3):331-335.
33. Chiurillo MA, Moran Y, Cañas M, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela, *Int J Infect Dis* 2013;17(9):750-756.
34. Chang WL, Yeh YC, Sheu BS. The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases, *J Biomed Sci* 2018;25(1):68.
35. Huh CW, Kim BW. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection, *Korean J Gastroenterol* 2018;72(5):229-236.
36. Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, et al. Assessment of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes and host serological response, *J Clin Microbiol* 2001;39:1339-1344.
37. Seo JH, Lim CW, Park JS, et al. Correlations between the CagA Antigen and Serum Levels of Anti-*Helicobacter pylori* IgG and IgA in Children, *J Korean Med Sci* 2016;31(3):417-422.