

Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección y genotipificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas incluídas en parafina: un estudio retrospectivo

Dr. Golijow C.D.,*
Dr. Abba, M.C.,*
Dr. Collura, J.,**
Dr. Laguens, R.M.***

* Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA), Fac. de Cs. Veterinarias - UNLP, Calle 60 y 118 s/n B1900VW.

** Centro Gastroenterológico Platense. Calle 3 N° 1096, B1900VW, La Plata.

*** Cátedra de Patología B, Fac. de Cs. Médicas, UNLP, Calle 60 y 120. B1900VW, La Plata
Argentina

SUMMARY

Background: *Helicobacter pylori* infection is presumed to be the major causal agent of chronic active gastritis in humans. The persistent infection with this pathogen would be an important factor in the pathogenesis of peptic ulcer and also gastric cancer. **Methods:** We investigated relationship between *H. pylori* characteristics in 42 patients with normal mucosa or gastritis with minor changes and 40 patients with mild and severe gastritis. Detection and typing of *vacA* and *cagA* genes were performed using a polymerase chain reaction method.

Results: The analysis of *vacA* prevalence and the type (S1 or S2) showed non-significant differences between the two groups studied ($p > 0.05$). However, *cagA* analysis showed highly significant differences between the groups classified as normal tissue-weak gastritis and mild-severe gastritis ($p < 0.0001$; OR= 8.4; CI= 3.1-22.8).

Conclusions: *cagA* status is associated to the grade of gastritis, finding higher frequencies of *H. pylori cagA+* in the moderate-severe gastritis group. These highly significant differences could make *cagA* status a genetic marker for disease progress.

Index: *Helicobacter pylori*, *vacA* gen, *cagA* gen, dyspeptic disease.
Acta Gastroent. Lat.Amer. 33:2003

INTRODUCCION

Helicobacter es una bacteria bacilar, gram negativa, espiralada y flagelada. *Helicobacter pylori* infecta naturalmente a los humanos y los simios, aunque ha sido recientemente descrita en otras especies (1-3). *H. pylori* habita principalmente en el mucus que recubre la mucosa gástrica, pero una pequeña proporción de bacterias habita directamente sobre las células de la mucosa. Posee un eficiente sistema de producción de ureasa, el que la protege del ácido clorhídrico del estómago, catalizando la hidrólisis de la urea para la producción de amonio, con el consecuente aumento del pH de la zona (4).

H. pylori es una bacteria microaerófila y requiere de medios complejos para su crecimiento, lo que torna dificultoso su cultivo. Su crecimiento es lento y los cultivos viejos están compuestos por formas cocoides, las que presentan un bajo metabolismo (4). Además, la aparición de formas cocoides ha sido asociada a la utilización sin éxito de terapia antibiótica, con la adquisición de un fenotipo más virulento (5).

Aunque la infección por *H. pylori* cursa generalmente de forma asintomática, casi todas las personas infectadas por este bacilo presentan, en algún momento de su vida, inflamación gástrica. La infección por *H. pylori* es la causa principal del desarrollo de úlcera péptica, la que afecta aproximadamente al 15% de los pacientes portadores (6, 7).

La infección por *H. pylori* induce la gastritis superficial crónica, la que se caracteriza por presentar infiltración mononuclear y polinuclear de la mucosa, con la consecuente injuria de las células epiteliales. En los Estados Unidos, el patrón de inflamación gástrica más predominante es la que involucra al antro, encontrándose más estrechamente ligado a la úlcera de duodeno. Sin embargo, en los países en desarrollo el tipo de inflamación predominante es la pangastritis, la que ha sido asociada tanto a la úlcera como al carcinoma gástrico (4).

Muchas de las personas infectadas por *H. pylori* no desarrollan secuelas clínicas. Esta ausencia de secuelas puede deberse tanto a factores bacterianos como a factores del hospedador, ambientales y geográficos (7-9). En este sentido, los factores bacterianos parecen jugar un rol preponderante (5, 8, 10, 11). Entre los factores de virulencia bacteriana, las investigaciones se han focalizado en dos genes bacterianos que aparecen ligados a la inflamación. Estos factores corresponden a la citotoxina VacA y la proteína de alto peso molecular CagA (8, 12, 13, 14). La función de la proteína CagA aún no ha sido claramente establecida, pero los pacientes infectados, y que presentan úlceras o carcinomas gástricos, poseen de manera predominante cepas bacterianas CagA-positivas, mientras que los pacientes con ausencia de sintomatología presentan predominantemente cepas CagA-negativas (13-15). Por otra parte, las variantes del gen *vacA* han sido también asociadas al desarrollo de úlcera y carcinoma gástrico (14, 16). En los últimos años, numerosos trabajos han utilizado las técnicas basadas en el análisis de ADN como herramientas para la identificación y genotipificación de esta bacteria en pacientes sintomáticos y asintomáticos (17-22). Las técnicas clásicas de diagnóstico, basadas en la microscopía o incluso el cultivo, presentan una baja sensibilidad, siendo imposible por estos métodos la tipificación correcta de los genes de virulencia.

En el presente trabajo se analizaron 82 biopsias gástricas de antro y cuerpo, de pacientes con dispepsia, con el fin de evaluar la aplicabilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *H. pylori*. Además, se estudió la prevalencia de las cepas virulentas mediante la tipificación por PCR del gen *cagA*.

MATERIALES Y METODOS

Toma de muestras y extracción de ADN

Se utilizaron 82 biopsias incluidas en parafina (muestras en duplicado, correspondiendo a antro y cuerpo), provenientes de pacientes de ambos sexos, cuyas edades variaron entre los 18 y los 72 años (Media: 49 años), los que fueron sometidos a procedimientos endoscópicos por presentar síntomas de dispepsia. La identificación de *H. pylori* fue realizada por microscopía, previa tinción con Giemsa, y por técnicas de amplificación de ADN por PCR.

Para el análisis de ADN se utilizaron secciones de 10 mm de espesor. Los cortes histológicos fueron lavados tres veces con xilol a 56°C para retirar la parafina. Luego del tercer lavado con xilol, se realizó un lavado con etanol 100% y otro con etanol 70%. Los restos de etanol 70% fueron evaporados a 56°C por 10 min. El tejido obtenido fue resuspendido en buffer de digestión (50 mM de Tris-HCl pH 8.5; 1 mM de EDTA; 1% de Triton X-100 y 0.5% de Tween 20) con 200 µg/ml de Proteínasa K (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e incubados a 56°C por 2 hs. Para la inactivación de la proteínasa, las muestras fueron incubadas a 100°C por 12 minutos. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

Detección de *H. pylori* por PCR

La calidad del ADN aislado de todas las muestras estudiadas fue evaluada por PCR, utilizando el locus de la timidina quinasa humana como locus control, según protocolos previamente descriptos (23). La presencia de *H. pylori* y la genotipificación del gen bacteriano *cagA* fue realizado por PCR, utilizando los cebadores para los loci *vacA* y *cagA* respectivamente (17). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 50 µl, compuesto por 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada juego de los cebadores correspondientes a los genes *vacA* o *cagA*, 1 U de Taq polimerasa (GIBCO-BRL, USA) y 10 µl del lisado de tejido como ADN molde. Las reacciones para el estudio de los genes *vacA* y *cagA* fueron realizadas por separado y en duplicado.

Las mezclas de reacción fueron cicladas con 2 min de desnaturalización a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 s a 92°C, 45 s a 50°C y 45 s a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C. En cada amplificación se utilizaron controles negativos (ADN humano obtenido de la línea celular K562) y controles positivos obtenidos de biopsias analizadas microscópicamente y diagnosticadas como *H. pylori* positivas mediante IFD con anticuerpos específicos anti-*H. pylori* marcados con fluoresceína.

Para el análisis de los productos de amplificación, 5

ml de cada reacción fueron sembrados en geles de poliacrilamida 6% y sometidos a electroforesis junto con un marcador de peso molecular (pGem, Promega, Madison, USA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación con luz UV de 320 nm (Figura 1).

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante la prueba Chi cuadrado con corrección de Yates. La estimación del riesgo relativo (OR) fue realizada utilizando el paquete estadístico SSPS (Versión 10.0.1) considerando un intervalo de confianza (IC) del 95%

RESULTADOS

El análisis microscópico de las muestras reveló una mucosa normal en el 23,17% (19/82) de las biopsias analizadas, una gastritis leve en el 28,05% (23/82) de las muestras, una gastritis moderada en el 6,1% (5/82) de las biopsias gástricas y un 42,68% (35/82) de muestras con signos de gastritis severa. De acuerdo a los resultados obtenidos por la microscopía, las muestras fueron clasificadas en dos grupos: uno involucrando las muestras con mucosa normal y gastritis leves (grupo A) y el segundo incluyendo las gastritis moderadas y severas (grupo B). Para realizar la clasificación, no se consideró la presencia de atrofia glandular.

El análisis microscópico reveló que un 19,04% (8/42) de las muestras del grupo A fueron positivas para la presencia de *H. pylori*, mientras que en el grupo B este valor alcanzó el 82,93% (34/40) (Tabla 1).

El análisis de ADN mostró que todas las muestras fueron normalmente amplificadas con los cebadores del locus control, indicando que el ADN era apto para su amplificación y confirmando la ausencia de

inhibidores de la reacción de PCR. La amplificación con los cebadores vacAF y vacAR dio como resultado la obtención de un amplicón de 176pb o 203pb, según se tratara de las variantes S1 o S2 de este locus, indicando la presencia del genoma de *H. pylori*. El análisis de la prevalencia del genoma de *H. pylori* en la población estudiada mostró que en el 91% (75/82) de las muestras la amplificación fue positiva, indicando infección bacteriana. Dentro de las muestras positivas, el 65% (49/75) presentó la variante S1 y el 35% (26/75) la variante S2 (Tabla 1). Dentro del grupo B, el 100% (40/40) de las muestras resultaron positivas para la presencia de *H. pylori*, mientras que en el grupo A, la prevalencia de la infección alcanzó el 76,19% (32/42). La presencia del factor de virulencia cagA fue analizada utilizando los cebadores cagAF y cagAR. En este sentido, el 53% (40/75) de las muestras analizadas resultó cagA (+). En el grupo A, el 24,39% (10/42) fue cagA (+), mientras que en el grupo B, la prevalencia del factor de virulencia alcanzó el 82,50% (33/40) (Tabla 1).

La comparación de la prevalencia en la detección de *H. pylori* entre las técnicas microscópicas y de amplificación de ADN mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$). La prevalencia de la infección analizada por PCR y medida a través de la presencia del gen vacA, no mostró diferencias significativas entre los dos grupos analizados ($p > 0,05$), indicando altos niveles de infección en la población de muestras estudiadas.

La comparación de la prevalencia del factor de virulencia cagA entre los grupos de muestras estudiados mostró diferencias altamente significativas entre los grupos ($p < 0,0001$; OR= 8,4; IC 95%= 3,1–22,8), alcanzando un valor superior al 80% en el grupo de biopsias con gastritis moderada/severa.

Figura 1: Corrida electroforética en minigel de poliacrilamida al 6%. Calles 1 a 4: muestras positivas para *H.pylori* tipo vacA-S1; calles 5 a 7: muestras positivas para *H.pylori* vacA-S2; calles 8 a 11: muestras infectadas con *H.pylori* positivas para el factor de virulencia cagA. Calle WM: marcador de peso molecular PGEM (Promega, Madison, WI, USA)

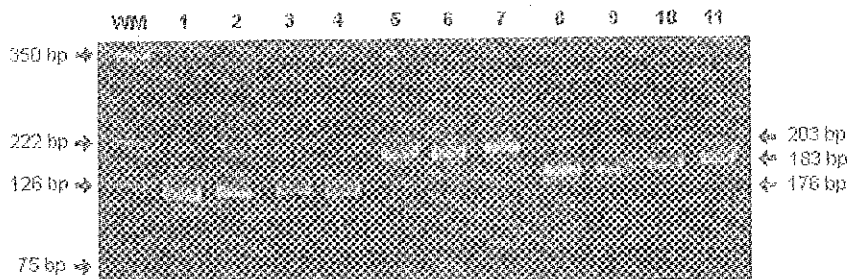


Tabla 1: Resultados obtenidos de la detección y genotipificación de *H. pylori* en los grupos de pacientes estudiados.

<i>H. pylori</i>	Mucosa normal		Gastritis moderadas y severas		Estadístico
	Y gastritis leves				
	n	(%)	n	(%)	
vacA (+)	34	(81)	38	(95)	p > 0,05
vacA (-)	8	(19)	2	(5)	
vacA-S1	25	(73,5)	24	(63,2)	p > 0,05
vacA-S2	9	(26,5)	14	(36,0)	
cagA (+)	11	(26)	30	(75)	p < 0,0001
cagA (-)	31	(74)	10	(25)	OR = 8,4 IC 95% = 3,1 - 22,8
Casos	42		40		82

DISCUSION

Helicobacter pylori es un patógeno humano de gran importancia y la colonización bacteriana persistente de la mucosa gástrica puede causar enfermedades gastrointestinales severas (17). Esta bacteria no es un organismo uniforme, presentando poblaciones constituidas por individuos fenotípicamente diversos, pero a la vez genéticamente relacionados (8). Muchos marcadores genéticos de *H. pylori* (como los genes vacA y cagA) han sido identificados y asociados a factores de virulencia, hecho que les conferirían implicaciones clínicas y epidemiológicas de relevancia (8, 13, 14, 15).

El presente estudio constituye el primer análisis retrospectivo, basado en técnicas de amplificación de ADN, realizado sobre biopsias gástricas de pacientes dispépticos de la República Argentina. En este trabajo, se analizaron las prevalencias del gen cagA y de las variantes del gen vacA. Además, se evaluó la aplicabilidad de la técnica PCR para la detección y genotipificación de *H. pylori* en muestras gástricas incluidas en parafina.

De acuerdo a lo reportado por otros autores (6, 19), los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que la técnica de PCR puede ser utilizada con éxito para la detección y genotipificación de *H. pylori* en estudios retrospectivos de material proveniente de muestras gástricas incluidas en parafina.

Los resultados obtenidos respecto de la prevalencia de la infección por *H. pylori* mostraron que es mucho mayor que la detectada por las técnicas convencionales de microscopía. En este sentido, el 91% de las muestras analizadas resultaron positivas para la detección del gen vacA, indicando infección bacteriana.

Además, la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica no presentó asociación con la histología del tejido afectado ($p > 0,05$). Estos resultados indicarían que la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica es un evento frecuente, y que no todas las cepas de esta bacteria producirían cambios a nivel histológico. Los mismos resultados han sido reportados por otros autores cuando se realizaron estudios caso-control (13). Por otra parte, los resultados obtenidos también mostraron una asociación entre la presencia de cepas bacterianas portadoras del gen cagA y la aparición de cambios histológicos, encontrando una asociación significativa a la presencia de gastritis moderada y severa ($p < 0,0001$). Estimándose, que aquellos pacientes con infección por *H. pylori* con el factor de virulencia (cagA positivas) presentaron un riesgo relativo incrementado en ocho veces para el desarrollo de gastritis severas en relación a aquellos infectados por *H. pylori* sin el factor de virulencia (cagA negativas) (OR = 8,4; IC 95% = 3,1 - 22,8). Esta asociación, ya ha sido reportada por otros autores para poblaciones de África, Europa, América y Asia (13-16), alcanzando una asociación casi absoluta en países como Corea o Japón, donde la prevalencia de *H. pylori* es muy elevada, con más del 90% de las cepas cagA-positivas y una prevalencia de cáncer gástrico muy elevada (24-26). Muchos estudios mantienen la idea de que el carcinoma gástrico es una enfermedad multifactorial, haciendo necesario considerar que los factores de virulencia bacterianos pueden influir en el desarrollo y progresión de esta enfermedad, pudiendo estar asociados a la presencia de determinadas secuencias de ADN, como por ejemplo el gen cagA (27).

En conclusión, el análisis de infección bacteriana por técnicas histológicas o moleculares no brindaría por sí

misma información sobre la probabilidad de progresión de la enfermedad hacia estadios más comprometidos de la mucosa gástrica. En cambio, la identificación y genotipificación de las cepas de *H. pylori*, a través del estudio de los genes *vacA* y *cagA*, indicaría la presencia de cepas bacterianas virulentas, con alta probabilidad de desarrollo de inflamación de la mucosa gástrica, con la consecuente progresión de la enfermedad.

La histología ha sido, hasta el momento, el método más confiable en el diagnóstico de infección por *H. pylori*, aportando a su vez, datos precisos sobre el estado de la mucosa infectada. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten aumentar la capacidad de detección de la infección, a la vez que otorga una mayor posibilidad de detectar la presencia de cepas virulentas, asociadas con una evolución no deseable de la infección. Debe considerarse, sin embargo, que la metodología de diagnóstico basada en la histología presenta dos problemas difíciles de subsanar: uno corresponde a

la chance de haberse efectuado un muestreo inadecuado de la mucosa gástrica, que en realidad no refleje el estado general del resto de la misma. El segundo problema radica en que la imagen histológica debe ser considerada como una fotografía estática de un momento de la evolución de una enfermedad, es decir, no es posible determinar con una sola biopsia si la lesión observada es una etapa inicial de la evolución de un proceso más importante, o si se está en presencia de un estadio final evolutivo, que no variará en el tiempo, o retrogradará hacia la normalidad.

Como ha sido sugerido por otros autores (5, 8, 17, 22), la detección de genes bacterianos asociados a factores de virulencia deberían ser incluidos en los estudios clínicos, epidemiológicos y terapéuticos, con el fin de identificar y estratificar a los pacientes portadores de cepas virulentas, con el objetivo último de implementar planes terapéuticos económicos y adecuados.

Resumen

Introducción: La infección por *Helicobacter pylori* actualmente es considerada el principal agente causal de la gastritis crónica activa en humanos. Las infecciones persistentes con este patógeno podría ser un factor importante en la patogénesis de las úlceras pépticas y en el cáncer gástrico. **Métodos:** Se estudió la relación entre las características genéticas de *H. pylori* en 42 pacientes con mucosa normal o gastritis leve y 40 pacientes con gastritis moderada y severa. La detección y tipificación de los genes *vacA* y *cagA* se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa. **Resultados:** No se detectaron diferencias significativas en la prevalencia de los genotipos *vacA* (S1 y S2) entre los grupos de pacientes estudiados ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando se analizó el gen *cagA*, se encontró un incremento significativas entre los pacientes con gastritis moderada o severa y aquellos con mucosa normal ($p < 0,0001$; OR= 8,4; IC 95%= 3,1-22,8). **Conclusiones:** Se confirmó la asociación entre en gen *cagA* y el grado de gastritis, encontrando una elevada prevalencia de *H. pylori cagA+* en las gastritis moderadas o severas. Debido al incremento en el riesgo relativo de los pacientes *vacA (+)-cagA (+)* para desarrollar gastritis severas, se sugerirían al estado del gen *cagA* como un marcador genético de progresión de la lesión.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Shinozaki JK, Sellon RK, Cantor GH, et al. Fecal polymerase chain reaction with 16S ribosomal RNA primers can detect the presence of gastrointestinal *Helicobacter* in dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16(4):426-32.
- 2 - Fox JG, Shen Z, Xu S, et al. *Helicobacter marmotae* sp. nov. Isolated from Livers of Woodchucks and Intestines of Cats. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2513-9.
- 3 - Won YS, Yoon JH, Lee CH, et al. *Helicobacter muricola* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from the ceca and feces of Korean wild mouse (*Mus musculus molossinus*). *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209(1):45-50.
- 4 - Atherton JC and Blaser MJ. *Helicobacter* infections. En: *Harrison's principles of internal medicine* 14th. ed./ editors, Anthony S. Fauci. The McGraw-Hill Companies Inc. 1998; Part 7, Section 6, 156.
- 5 - She FF, Su DH, Lin JY, et al. Virulence and potential pathogenicity of coccoid *Helicobacter pylori* induced by antibiotics. *World J Gastroenterol* 2001; 7(2):254-8.
- 6 - Toljamo KT, Niemela SE, Karttunen TJ, et al. The role of Herpes simplex and *Helicobacter pylori* infection in the etiology of persistent or recurrent gastric erosions: a follow-up study. *Dig Dis Sci* 2002; 47(4):818-22.
- 7 - Crespo A and Suh B. *Helicobacter pylori* infection: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Arch Pharm Res* 2001; 24(6):485-98.

- 8 - van Doorn LJ. Detection of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1(3):290-8.
- 9 - Ando T, Peek RM, Pride D, et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):239-46.
- 10 - Yakoob J, Hu G, Fan X, et al. *Helicobacter pylori* detection in Chinese subjects: a comparison of two common DNA fingerprinting methods. *Br J Biomed Sci* 2001; 58(4):239-43.
- 11 - Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, et al. Presence of *iceA1* but not *cagA*, *cagC*, *cagE*, *cagF*, *cagN*, *cagT*, or *orf13* genes of *Helicobacter pylori* is associated with more severe gastric inflammation in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 2002; 101(1):18-23.
- 12 - Andreson H, Loivukene K, Sillakivi T, et al. Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):298-300.
- 13 - Louw JA, Kidd MS, Kummer AF, et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Helicobacter* 2001; 6(4):268-73.
- 14 - Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, et al. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* *VacA* and *CagA* and gastric diseases in Chile. *J Med Microbiol* 2002; 51(4):300-4.
- 15 - Saruc M, Demir MA, Kucukmetin N, et al. Histological and clinical predictive value of determination of tissue *CagA* status by PCR in *Helicobacter pylori* infected patients; results of the large population based study in western Turkey. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(45):878-81.
- 16 - Chatopadhyay S, Datta S, Chowdhury A, et al. Virulence genes in *Helicobacter pylori* strains from West Bengal residents with overt *H. pylori*-associated disease and healthy volunteers. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2622-5.
- 17 - van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2597-2603.
- 18 - Chisholm SA, Teare EL, Patel B, et al. Determination of *Helicobacter pylori vacA* allelic types by single-step multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35(1):42-6.
- 19 - Ciesielska U, Jagoda E, Marciniak Z. Value of PCR technique in detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded material. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40(2):129-30.
- 20 - Piana A, Are BM, Maida I, et al. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains. *New Microbiol* 2002; 25(2):123-30.
- 21 - Smith SI, Miehke S, Oyedeji KS, et al. Fingerprinting of Nigerian *Helicobacter pylori* isolates by plasmid profile and PCR. *J Basic Microbiol* 2002; 42(1):45-53.
- 22 - Vaira D, Gatta L, Ricci C, et al. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 1:16-23.
- 23 - Abba MC, Mourón SA, Güercci A, et al. Amplificación del proto-oncogén *HER-2/neu* asociada a la infección por VPH de "bajo riesgo" en muestras de citología exfoliativa cervical. *Rev Mex Patol Clín* 2000; 1(47): 26-31.
- 24 - Miehke S, Kibler K, Kim JG, et al. Allelic variations in *cagA* of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1322-1325.
- 25 - Maeda S, Ogura K, Yoshida H, et al. Major virulence factors, *vacA* and *cagA*, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* 1998; 42:338-343.
- 26 - Adachi M, Mizuno M, Yokota K, et al. Reinfection rate following effective therapy against *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(1):27-31.
- 27 - Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, et al. Test of the hypothesis that *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* correlate with *cagA* status, cytotoxin production, or clinical outcome. *Gastroenterology* 1998; 114:A338.

SEPARATA

Dr. Golijow, Carlos Daniel
Centro de Investigaciones en Genética Básica y
Aplicada, Fac. Cs. Vet. Universidad Nacional de La
Plata, Calle 60 y 118. B1900VW, La Plata, Buenos Aires
Tel.Fax: 54-224-421-1799
e-mail: egolijow@fcv.medvet.unlp.edu.ar