



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
LOS GENOTIPOS DE VIRULENCIA EN
CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS
DE PACIENTES DISPÉPTICOS
PERUANOS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

LUIS JESUS JUNIOR GUZMAN
VELASQUEZ

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

Dr. Andrés Guillermo Lescano Guevara

JURADO DE TESIS

DRA. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO
PRESIDENTE

DRA. FRANCESCA SCHIAFFINO SALAZAR
VOCAL

DR. JUAN ANTONIO FLORES TUMBA
SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi familia, mi esposa Liz,
mis padres Luis y Gladys, mis
hermanos Sarita y José
Manuel y mi sobrina Abigail,
por compartir sus tiempos,
paciencia y comprensión
durante todo este proceso que
venido realizando, su cariño y
apoyo incondicional hicieron
de mí una mejor persona y que
de una u otra forma aliviaron
mi decaer en tiempos difíciles,
de forma que acompañaron
mis sueños hacia la
finalización de este trabajo de
tesis.

AGRADECIMIENTOS

A los equipos de investigación tanto en los Laboratorios de Investigación y desarrollo y del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú y en la Universidad Pontificia Javeriana de Bogotá, Colombia por haberme brindado las facilidades y transferencias de conocimientos para la culminación de mi tesis.

A mi Asesor Dr. Andrés G. Lescano Guevara, al Dr. Michel Sauvain y al Dr. Pablo Tsukayama por todo el apoyo que recibí para ejecución de mi tesis y las facilidades de integrarme a sus equipos de investigación que hicieron posible este trabajo.

A la mentoría del Dr. Alejandro Bussalleu y la Dra. Alba Alicia Trespalacios, de quienes recibí apoyo constante y desinteresado para alcanzar este objetivo y en quienes encontré la amicalidad de científicos admirables.

Al equipo de salud del servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional Cayetano Heredia, en especial al Dr. José Luis Pinto y al Dr. Jorge Espinoza Ríos por sus ánimos desinteresados en la investigación científica que contribuyeron a alcanzar este objetivo.

A mis colegas, amigos y estudiantes a quienes agradezco el consejo, el tiempo, las dudas y las respuestas asertivas que me brindaron.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

FONDECYT/PROCIENCIA

Beca de formación EF033-235-2015

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS GENOTIPOS DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES DISPÉPTICOS PERUANOS

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.wjgnet.com Fuente de Internet	1%
2	tumj.tums.ac.ir Fuente de Internet	1%
3	jbiomedsci.biomedcentral.com Fuente de Internet	1%
4	repositorij.svkst.unist.hr Fuente de Internet	<1%
5	bmcmicrobiol.biomedcentral.com Fuente de Internet	<1%
6	www.researchsquare.com Fuente de Internet	<1%
7	www.frontiersin.org Fuente de Internet	<1%
8	legacy-etd.library.emory.edu Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Generalidades sobre el patógeno <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2.	Genómica y diversidad de <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.3.	Patogénesis de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.4.	Tratamiento y resistencia antibiótica en la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.5.	Cáncer gástrico y epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> .	10
II.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	13
III.	CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y ROL DEL INVESTIGADOR.....	18
IV.	INVESTIGACIÓN 1.....	22
	Genotipos de virulencia en cepas de <i>Helicobacter pylori</i> y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos	22
4.1.	Resumen.....	23
4.2.	Abstract	24
4.3.	Introducción	25
4.4.	Material y métodos.....	27
4.4.1.	Diseño, población y criterios de inclusión	27
4.4.2.	Consideraciones éticas	30

4.4.3.	Procedimientos de estudio.....	30
4.4.3.1.	Reactivación de cepas aisladas de <i>Helicobacter pylori</i>	30
4.4.3.2.	Extracción de ADN genómico	31
4.4.3.3.	Genotipificación de factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	31
4.4.3.4.	Procesamiento de datos y análisis estadístico	33
4.5.	Resultados	33
4.6.	Discusión.....	42
V.	INVESTIGACIÓN 2.....	48
	Detección de variantes genéticas de virulencia basados en secuenciación de última generación y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos	48
5.1.	Resumen.....	49
5.2.	Abstract	50
5.3.	Introducción	52
5.4.	Material y métodos.....	53
5.4.1.	Diseño, población y criterios de inclusión	53
5.4.2.	Consideraciones éticas	55
5.4.3.	Procedimientos de estudio.....	56
5.4.3.1.	Reactivación de cepas aisladas de <i>Helicobacter pylori</i>	56
5.4.3.2.	Extracción de ADN genómico	57

5.4.3.3.	Ensamblaje y anotación de los genomas completos de <i>Helicobacter pylori</i>	57
5.4.3.4.	Análisis filogenético de los genomas completos de <i>Helicobacter pylori</i>	60
5.4.3.5.	Determinación del viruloma y resistoma de los genomas completos de <i>Helicobacter pylori</i>	61
5.4.3.6.	Procesamiento de datos y análisis estadístico	63
5.5.	Resultados	64
5.6.	Discusión.....	91
VI.	LIMITACIONES	98
VII.	CONCLUSIONES	100
VIII.	RECOMENDACIONES	102
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
X.	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes, cebadores y protocolos empleados para la genotipificación de factores de virulencia de *Helicobacter pylori*.

Tabla 2. Características moleculares de las cepas aisladas de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori*.

Tabla 3. Factores moleculares de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Tabla 4. Factores moleculares de las cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Tabla 5. Características de calidad de los genomas completos de *H. pylori* secuenciados en este estudio.

Tabla 6. Genes y mutaciones con evidencia experimental relacionados a resistencia antibiótica a fármacos de uso convencional en el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Tabla 7. Características del viruloma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Tabla 8. Factores moleculares del viruloma de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Tabla 9. Factores moleculares del viruloma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Tabla 10. Características de los genes componentes y estructura de la Isla de patogenicidad *cagPAI* en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Tabla 11. Características de las mutaciones con evidencia experimental relacionadas a resistencia antibiótica en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Tabla 12. Factores moleculares del resistoma de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Tabla 13. Factores moleculares del resistoma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Tabla 14. Características del resistoma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de casos con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* elegibles en la investigación 1.

Figura 2. Flujograma de casos con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* elegibles en la investigación 2.

Figura 3. Árbol filogenético basado en MLST de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* provenientes de pacientes peruanos con dispepsia y 643 genomas de otras poblaciones filogenéticas.

Figura 4. Árbol filogenético basado en SNP de los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos y 32 genomas peruanos.

Figura 5. Características del viruloma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Figura 6. Características del pangenoma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* provenientes de pacientes peruanos con dispepsia.

Figura 7. Características del resistoma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

LISTAS DE ABREVIATURAS

Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC)

Gen de la ADN girasa A (*gyrA*)

Gen de la adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo (*babA2*)

Gen de la citotoxina relacionada al gen A (*cagA*)

Gen de la citotoxina vacuolizante A (*vacA*)

Gen de la flavin oxidoreductasa (*frxA*)

Gen de la nitroreductasa NAPDH independiente de oxígeno (*rdxA*)

Gen de la proteína de unión a penicilinas 1 (*pbp1A*)

Gen de la subunidad ribosómica 23S (*ARNr 23S*)

Gen de la subunidad ribosómica 16S (*ARNr 16S*)

Gen inducido por contacto con el epitelio (*iceA*)

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN)

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAvH)

Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Ministerio de Salud (MINSa)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Repeticiones de motivos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA)

Secuenciación de última generación (NGS)

Unidad de Investigación de Enfermedades Emergentes y Cambio Climático

(EMERGE)

Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)

RESUMEN

Introducción: El adenocarcinoma gástrico se considera la séptima causa de muerte por malignidad en la región las Américas. A nivel nacional, la cancerización del tejido estomacal corresponde a la primera causa de mortalidad asociada con lesiones neoplásicas. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un patógeno común en humanos y responsable de una variedad de enfermedades gastrointestinales como gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas y cáncer gástrico. La prevalencia de infección por *H. pylori* en Perú alcanza entre 45% a 83%, observándose que en los últimos 15 años no se ha modificado en los estratos socioeconómicos medio/alto y se ha incrementado en aquellas poblaciones con déficit socioeconómico y carencias de servicios de salud. Según la casuística del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) el 89.6% de los casos con adenocarcinoma gástrico presentan la infección por el patógeno *H. pylori*. La interacción de factores de virulencia presentes en *H. pylori* promueven cambios moleculares sobre la mucosa epitelial gástrica que se traducen en lesiones de riesgo de desarrollo de cáncer y, es posible que, los tipos de lesiones precancerosas observadas entre pacientes con infección por *H. Pylori* en Perú se relacionen a marcadores moleculares de virulencia presentes en el genoma de las cepas de *H pylori* circulantes en nuestro medio, lo que permitiría identificar patrones de riesgo de lesiones gástricas graves entre pacientes con infección por *H. pylori*. Algunos genes relacionados a factores de virulencia de *H. pylori* se asocian con el incremento de riesgo de enfermedad neoplásica; tal como, el gen de la citotoxina vacuolizante A (*vacA*) que codifica para la secreción de la proteína toxigénica VacA, la citotoxina relacionada al gen A (*cagA*) que confiere

una potente actividad proinflamatoria y mitogénica a *H. pylori*, el gen asociado a ulceración inducido por interacción con el epitelio (*iceA*) y el gen *babA2*, de adhesión a antígenos de grupo sanguíneo, que permiten la interacción del patógeno con la superficie de las células gástricas. Pero, los reportes de tipificación del gen *cagA* son aún insuficientes en nuestro medio y, la detección de genes de virulencia relacionados al gen *iceA* y al gen *babA2*, así como, la tipificación y sub-tipificación del gen *vacA* aún no se ha descrito. Por lo que resulta una necesidad no solo conocer la variabilidad y la distribución de las cepas virulentas de *H. pylori* en nuestro entorno sino también explorar de forma masiva características moleculares basadas en el viruloma y resistoma de los genomas completos de aislados de *H. pylori* y su impacto sobre los hallazgos histopatológicos de mucosa epitelial gástrica en pacientes infectados que presentan la lesiones precancerosas tipo metaplasia intestinal.

Preguntas de investigación: 1) ¿La lesión precancerosa metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica está asociada a la detección convencional del genotipo *cagA(+)/vacAs1am1* en las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos?; 2) ¿La lesión precancerosa metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica está asociada a la variante genética EPIYA-ABCC/*vacAs1am1ild1* en el genoma completo de cepas aisladas de *H. pylori* determinada mediante tecnologías de secuenciación de última generación provenientes de pacientes dispépticos peruanos?

Métodos: Los datos analizados provienen de un estudio primario conformado por una cohorte de 500 pacientes con dispepsia y cepas aisladas de *H. pylori* criopreservadas en el biobanco del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori*

del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTA vH), enrolados y colectados entre el año 2016 y 2017 en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia. En la primera investigación, el diseño fue de tipo transversal y utilizo los registros de casos con dispepsia diagnosticados para la infección por *H. pylori* y sus aislados criopreservados correspondientes. Los aislados procedentes del criobanco fueron reactivados y se extrajo su ADN genómico. En las muestras, se amplificó el ADN de *H. pylori* mediante PCR convencional para la detección de factores de virulencia del patógeno. Se analizó la asociación entre los estados de enfermedad según gastritis crónica no atrófica y la presencia de lesiones precancerosas tipo metaplasia de los pacientes con infección por *H. pylori* frente al genotipo de virulencia *cagA(+)/vacAs1am1*, y mediante un modelo lineal generalizado con enlace log, distribución binomial y varianza robusta, se estimó la razón de prevalencias; también se analizó la asociación de la detección de los motivos EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C; los alelos *s1*, *s2*, *i1*, *i2*, *d1*, *d2*, *m1*, *m2* y subtipos *s1a*, *s1b* y *s1c* del gen *vacA*, los alelos 1 y 2 del gen *iceA* y el gen *babA2* frente al estado clínico de metaplasia intestinal de los casos en estudio. En la segunda investigación, de tipo exploratoria, se utilizó el reporte histopatológico de los casos con infección por *H. pylori* y sus cepas aisladas correspondientes. Las cepas aisladas fueron reactivadas, se extrajo y purifico el ADN genómico. Las muestras se secuenciaron mediante tecnologías de última generación y se obtuvo el genoma completo de los aislados. Se analizó la asociación entre la variante genética de virulencia EPIYA-ABCC/*vacAs1am1i1d1* y la presencia de lesión precancerosa tipo metaplasia intestinal, se estimó la razón de prevalencias mediante un modelo lineal

generalizado con enlace log, distribución binomial y varianza robusta; también se tipificó el viruloma y resistoma para los genes relacionados con citotoxinas, genes de adherencia, genes moduladores de respuesta inmune y genes de resistencia antibiótica.

Resultados: En la primera investigación fueron incluidos 158 casos con dispepsia e infección por *H. pylori*, el 36.7% de los aislados presentó el genotipo *cagA(+)/vacAslamI* y el 38.6% de los pacientes presentó hallazgo histopatológico de metaplasia intestinal. Se encontró evidencia significativa que la prevalencia de aislados con genotipo *cagA(+)/vacAslamI* fue 67% mayor en los pacientes con metaplasia intestinal respecto a los pacientes con gastritis crónica no atrófica (RP: 1.67; IC95%: 1.13 a 2.45). Este resultado fue similar en el análisis multivariado luego de ajustar por sexo y edad (RP: 1.81; IC95%: 1.25 a 2.61; $p < 0.05$). También se observó asociación significativa del genotipo de riesgo de la región variable del gen *cagA* (RP: 1.56; IC95%: 1.02 a 2.41; $p < 0.05$), y de la región media (RPa: 2.22; IC95%: 1.01 a 4.99; $p < 0.05$) y la región intermedia (RPa: 1.94; IC95%: 1.05 a 3.58; $p < 0.05$) del gen *vacA*, frente al hallazgo histopatológico de metaplasia intestinal. En la segunda investigación se incluyeron 49 casos con síntomas de dispepsia que presentaron infección por *H. pylori*, el 12.2% de los genomas completos secuenciados correspondió a la variante genética EPIYA-ABCC/*vacAslamIldI* y el 57.1% de los casos presentó diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal. Se observó que la prevalencia de la variante genética de virulencia fue 77% mayor en pacientes con metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica, el hallazgo fue significativo (RPa: 1.77; IC95%: 1.13 a 2.77; $p < 0.05$). Se observó que los genes

de adhesinas *babB/hopT* (RPa: 1.19; IC95%: 0.70 a 2.04), *hopZ* (RPa: 1.49; IC95%: 0.87 a 2.56) y *sabB/hopO* (RPa:1.41; IC95%: 0.91 a 2.17) fueron prevalentes entre los casos con metaplasia intestinal, pero la evidencia no fue estadísticamente significativa. También hubo evidencia significativa que la prevalencia de aislados de *H. pylori* resistentes a macrólidos fue 92% mayor en pacientes con metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica (RPa: 1.92; IC95%: 1.24 a 3.11; $p < 0.05$).

Conclusiones: Se logró tipificar por PCR convencional los factores de virulencia de aislados de *H. pylori* procedentes de pacientes con síntomas de dispepsia, y se encontró evidencia que el genotipo *cagA(+)/vacAsIamI* presenta un efecto de riesgo en el desarrollo de metaplasia intestinal entre pacientes con dispepsia que presentan la infección por *H. pylori*. Las repeticiones del motivo EPIYA-C en la región variable del gen *cagA* se asocian a lesiones precancerosas en los pacientes peruanos con dispepsia, y los polimorfismos virulentos en el gen *vacA* muestran un efecto de riesgo en el desarrollo de lesiones graves sobre la mucosa epitelial gástrica, sin embargo estos polimorfismos no mostraron una asociación significativa a excepción de las variantes *mI* e *iI* del gen. Además, se logró secuenciar y obtener genomas completos de calidad de los aislados de *H. pylori* mediante técnicas de secuenciación de última generación, fue posible tipificar un mayor número de factores de virulencia y determinar variantes genéticas para la integridad del gen *cagA* y el gen *vacA*. Hubo evidencia de que la variante genética EPIYA-ABCC/*vacAsIamIiIdI* se relaciona a la lesión precancerosa, y que la frecuencia de estos aislados fue predominante entre los diagnósticos histopatológicos de metaplasia intestinal. Se logró tipificar el resistoma de los

asilados de *H. pylori* y permitió caracterizar a las cepas circulantes como microorganismos resistentes a fármacos macrólidos y quinolonas. En adición, al considerar limitaciones al explorar la relación genotipo – fenotipo la viabilidad de las cepas aisladas de *H. pylori* es un factor crucial dado que la bacteria es un microorganismo fastidioso de crecimiento lento que emplea un cultivo microbiológico nutricionalmente exigente, que en muestras provenientes de un biobanco compromete su capacidad de reactivación y/o obtención de densidad suficiente para estudios moleculares, no afectando a las técnicas moleculares convencionales de genotipificación de regiones cortas de genes pero si afectando la calidad de secuencias con mayor cobertura aplicados al estudio del genoma completo del microorganismo. Finalmente, ambos estudios aportan evidencias importantes del riesgo de la presencia de factores moleculares de virulencia presentes en las cepas aisladas de *H. pylori* circulantes en nuestro medio y su relación con las lesiones severas de tipo metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia, y se sugiere que ambos tópicos continúen estudiándose a fin de disponer información de utilidad terapéutica y reducir los casos de cáncer gástrico en nuestra población.

PALABRAS CLAVES

HELICOBACTER PYLORI, FACTORES DE VIRULENCIA, GENOMA COMPLETO, NEOPLASIAS GÁSTRICAS. (DeCS/BIREME)

ABSTRACT

Introduction: Gastric adenocarcinoma is considered the seventh leading cause of death by malignancy in the Americas region. In Perú, cancerization of stomach tissue is the leading cause of mortality associated with neoplastic lesions. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a common pathogen in humans and is responsible for a variety of gastrointestinal diseases such as gastritis, gastroduodenal ulcer, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and gastric cancer. The prevalence of *H. pylori* infection in Peru ranges from 45% to 83%, and in the last 15 years it has not changed in the middle/high socioeconomic strata and has increased in those populations with socioeconomic deficit and lack of health services. According to the casuistry of the National Institute of Neoplastic Diseases (INEN), 89.6% of cases with gastric adenocarcinoma are infected by the pathogen *H. pylori*. The interaction of virulence factors present in *H. pylori* promote molecular changes on the gastric epithelial mucosa that translate into lesions at risk of developing cancer, and it is possible that the types of precancerous lesions observed among patients with *H. pylori* infection in Peru are related to the molecular virulence markers present in the genome of *H. pylori* strains circulating in our environment, which would allow us to identify patterns of risk of gastric lesions. Pylori infection in Peru are related to molecular markers of virulence present in the genome of *H. Pylori* strains circulating in our environment, which would allow us to identify patterns of risk of severe gastric lesions among patients with *H. pylori* infection. Some genes related to virulence factors of *H. pylori* are associated with increased risk of neoplastic disease, such as the vacuolizing cytotoxin A (*vacA*) gene that encodes for the secretion of the toxigenic protein VacA, the cytotoxin A-related gene (*cagA*)

that confers a potent proinflammatory and mitogenic activity to *H. pylori*, the gene associated with ulceration induced by interaction with the epithelium (*iceA*), and the gene *babA2*, for adhesion to blood group antigens, which allows the interaction of the pathogen with the epithelium-interaction-induced ulceration-associated gene (*iceA*) and the blood group antigen-binding gene *babA2*, which allow the pathogen to interact with the gastric cell surface. However, the reports of *cagA* gene typing are still insufficient in our environment and the detection of virulence genes related to the *iceA* and *babA2* genes, as well as the typing and subtyping of the *vacA* gene have not yet been described. Therefore, it is necessary not only to know the variability and distribution of virulent strains of *H. pylori* in our environment but also to massively explore molecular characteristics based on the virulome and resistome of the complete genomes of *H. pylori* isolates and their impact on the histopathological findings of gastric epithelial mucosa in infected patients who present precancerous lesions such as intestinal metaplasia.

Research questions: 1) Is the precancerous lesion intestinal metaplasia on the gastric epithelial mucosa associated with the conventional detection of the *cagA(+)/vacAsIamI* genotype in *Helicobacter pylori* strains isolated from Peruvian dyspeptic patients? 2) Is the precancerous lesion intestinal metaplasia on the gastric epithelial mucosa associated with the EPIYA-ABCC/*vacAsIamIIdI* genetic variant in the whole genome of *H. pylori* isolates determined by next-generation sequencing technologies from Peruvian dyspeptic patients?

Methods: The data analyzed come from a primary study comprising a cohort of 500 patients with dyspepsia and cryopreserved *H. pylori* isolates in the biobank of the *Helicobacter pylori* Sentinel Laboratory of the Alexander von Humboldt

Institute of Tropical Medicine (IMTA_vH), enrolled, and collected between 2016 and 2017 in the Gastroenterology Service of the Cayetano Heredia Hospital. In the first investigation, the design was cross-sectional and used the records of cases with dyspepsia diagnosed for *H. pylori* infection and their corresponding cryopreserved isolates. Isolates from the sample bank were reactivated and their genomic DNA was extracted. In the samples, *H. pylori* DNA was amplified by conventional PCR for the detection of virulence factors of the pathogen. The association between disease states according to chronic non-atrophic gastritis and the presence of metaplasia-type precancerous lesions in patients with *H. pylori* infection against the virulence genotype *cagA(+)/vacAs1am1*, and using a generalized linear model with log linkage, binomial distribution and robust variance, the prevalence ratio was estimated; the association of the detection of the EPIYA-A, EPIYA-B and EPIYA-C motifs was also analyzed; *s1*, *s2*, *i1*, *i2*, *d1*, *d2*, *m1*, *m2* and subtypes *s1a*, *s1b* and *s1c* of the *vacA* gene, alleles 1 and 2 of the *iceA* gene and the *babA2* gene against the clinical state of intestinal metaplasia in the cases under study. In the second investigation of an exploratory type, the histopathological report of the cases with *H. pylori* infection and their corresponding isolated strains were used. The isolated strains were reactivated, and genomic DNA was extracted and purified. The samples were sequenced using state-of-the-art technologies and the complete genome of the isolates was obtained. The association between the virulence genetic variant EPIYA-ABCC/*vacAs1am1i1d1* and the presence of intestinal metaplasia-type precancerous lesion was analyzed, the prevalence ratio was estimated using a generalized linear model with log link, binomial distribution, and robust variance;

the virulome and resistome were also typed for genes related to cytotoxins, adhesion genes, immune response modulator genes and antibiotic resistance genes.

Results: In the first investigation 158 cases with dyspepsia and *H. pylori* infection were included, 36.7% of the isolates had the *cagA(+)/vacAsIamI* genotype and 38.6% of the patients had histopathological findings of intestinal metaplasia. Significant evidence was found that the prevalence of isolates with *cagA(+)/vacAsIamI* genotype was 67% higher in patients with intestinal metaplasia than in patients with chronic non-atrophic gastritis (PR: 1.67; 95%CI: 1.13 to 2.45). This result was similar in the multivariate analysis after adjusting for sex and age (PRa: 1.81; 95%CI: 1.25 to 2.61; $p<0.05$). Significant association of the risk genotype of the variable region of the *cagA* gene (PR: 1.56; 95%CI: 1.02 to 2.39; $p<0.05$), and of the middle region (PRa: 2.22; 95%CI: 1.01 to 4.99; $p<0.05$) and intermediate region (PRa: 1.94; 95%CI: 1.05 to 3.58; $p<0.05$) of the *vacA* gene, against the histopathological finding of intestinal metaplasia was also observed. In the second investigation, 49 cases with dyspepsia symptoms presenting *H. pylori* infection were included, 12.2% of the complete genomes sequenced corresponded to the EPIYA-ABCC/*vacAsIamIldI* genetic variant and 57.1% of the cases presented histopathological diagnosis of intestinal metaplasia. It was observed that the prevalence of the virulence genetic variant was 77% higher in patients with intestinal metaplasia compared to cases with chronic non-atrophic gastritis, the finding was significant (PRa: 1.77; 95%CI: 1.13 to 2.77; $p<0.05$). The adhesin genes *babB/hopT* (PRa: 1.19; 95%CI: 0.70 to 2.04), *hopZ* (PRa: 1.49; 95%CI: 0.87 to 2.56) and *sabB/hopO* (PRa:1.41; 95%CI: 0.91 to 2.17;) were prevalent among cases with intestinal metaplasia, but the evidence was not statistically significant.

There was also significant evidence that the prevalence of macrolide-resistant *H. pylori* isolates was 92% higher in patients with intestinal metaplasia relative to cases with chronic non-atrophic gastritis (PRa: 1.92; 95%CI: 1.24 to 3.11; $p < 0.05$).

Conclusions: We were able to type by conventional PCR the virulence factors of *H. pylori* isolate from patients with dyspepsia symptoms and found evidence that the *cagA(+)/vacAsIamI* genotype presents a risk effect in the development of intestinal metaplasia among patients with dyspepsia presenting with *H. pylori* infection. The EPIYA-C motif repeats in the variable region of the *cagA* gene are associated with precancerous lesions in Peruvian patients with dyspepsia, and the virulent polymorphisms in the *vacA* gene show a risk effect in the development of severe lesions on the gastric epithelial mucosa; however, these polymorphisms did not show a significant association except for the *mI* and *iI* variants of the gene. In addition, it was possible to sequence and obtain quality complete genomes of *H. pylori* isolates using next-generation sequencing techniques, to type a greater number of virulence factors and to determine genetic variants for the integrity of the *cagA* gene and the *vacA* gene. There was evidence that the EPIYA-ABCC/*vacAsIamIiIdI* genetic variant is related to precancerous lesion, and that the frequency of these isolates was predominant among histopathological diagnoses of intestinal metaplasia. The resistome of *H. pylori* isolates was typed and allowed characterizing the circulating strains as microorganisms resistant to macrolide and quinolone drugs. In addition, considering limitations in exploring the genotype-phenotype relationship, the viability of the isolated strains of *H. pylori* is a crucial factor given that the bacterium is a fastidious, slow-growing microorganism that uses a nutritionally demanding microbiological culture, which in samples from a

biobank compromises its ability to reactivate and/or obtain sufficient density for molecular studies, not affecting conventional molecular techniques for genotyping short regions of genes but affecting the quality of sequences with greater coverage applied to the study of the complete genome of the microorganism. Finally, both studies provide important evidence of the risk of the presence of molecular virulence factors present in the isolated strains of *H. pylori* circulating in our environment and their relationship with severe intestinal metaplasia type lesions on the gastric epithelial mucosa of Peruvian patients with symptoms of dyspepsia, and it is suggested that both topics continue to be studied in order to have useful therapeutic information and reduce the cases of gastric cancer in our population.

KEY WORDS

HELICOBACTER PYLORI, VIRULENCE FACTORS, WHOLE GENOME, GASTRIC NEOPLASIA. (MeSH/NLM)

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre el patógeno *Helicobacter pylori*

La Proteobacteria *H. pylori* es un microorganismo que pertenece a la familia *Helicobacteraceae* del orden *Campylobacteriales* (1). Es una bacteria gramnegativa microaerofílica, espiral o helicoidal, flagelada con tamaño de 2.4 μm a 3.5 μm de longitud y de 0.5 μm a 1 μm de diámetro, presenta un penacho de 2 a 6 flagelos unipolares de 3 μm de largo que la facultan de movilidad y le permiten colonizar y persistir en el epitelio de la mucosa gástrica (2, 3). La bacteria tiene la capacidad de generar una transición de su forma típica helicoidal a una forma cocoide, forma viable pero no cultivable, la cual le brinda ventajas para su supervivencia en el entorno de la cavidad gástrica (4).

H. pylori es un patógeno bacteriano fastidioso y de crecimiento lento, su cultivo *in vitro* es nutricionalmente exigente y responde a patrones bioquímicos positivos para catalasa, oxidasa y ureasa (5, 6). La bacteria es capaz de sintetizar biopelículas que juegan un rol en su persistencia, supervivencia y/o resistencia al tratamiento antibiótico en su huésped o medio ambiente (7).

En el año de 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) mediante la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) catalogó al patógeno *H. pylori* como agente causal de lesiones neoplásicas malignas en el tejido gástrico (8, 9). Se conoce que *H. pylori* es un patógeno exitoso en la colonización de células epiteliales gástricas y juega un rol esencial en un espectro de enfermedades en el tejido estomacal e intestinal que incluye gastritis atrófica, úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa y adenocarcinoma gástrico. Los mecanismos de

transmisión persona a persona tanto fecal-oral y oral-oral son posibles formas de exposición al patógeno *H. pylori* y, en adición, se conoce de su detección en sistemas de agua potable de baja salubridad (10, 11). Se estima que la prevalencia infección a nivel global es ~30% en los países desarrollados y de ~85% en los países en desarrollo, donde afecta principalmente a poblaciones con características socioeconómicas más desfavorecidas (12).

1.2. Genómica y diversidad de *Helicobacter pylori*

En 1997 fue reportado el primer genoma secuenciado de *H. pylori*, la cepa se denominó 26695, considerado el genoma de referencia del patógeno, y presenta un cromosoma circular compuesto de 1.67 Mpb con un 39% de G+C que incluye 1587 genes (13). En la actualidad, se conoce que el tamaño del genoma de *H. pylori* varía de entre 1.5 Mpb a 1.7 Mpb y se compone de ~1900 secuencias codificantes de las que se han reportado 1590 genes con un tamaño aproximado de cada gen de 945pb (14, 15).

La versátil adaptación de *H. pylori* al hospedero humano, se sugiere, se debe a su alta frecuencia de eventos de mutación y de recombinación genética respecto a otros microorganismos bacterianos (16). Estos eventos genéticos han permitido un grado extraordinario de heterogeneidad, diversidad y variabilidad genética en el patógeno facilitando su adaptación a nichos específicos a través de una larga coevolución con su hospedero, que permite distinguir poblaciones bacterianas mediante patrones genéticos que explican la migración y el establecimiento territorial en la historia humana (17, 18).

A pesar, de la alta diversidad alélica y variabilidad genética observada en las cepas de *H. pylori*, el patógeno muestra un patrón genéticamente estructurado que exhibe una consistente correlación de las poblaciones genéticas, las relaciones filogeográficas y distribuciones geográficas distintas entre las cepas provenientes de pacientes con la infección. Los patrones genéticamente estructurados permiten la identificación de siete principales grupos acorde a poblaciones geográficamente diferenciadas asignadas como hpEurope, hpAfrica1, hpAfrica2, hpAsia2, hpNEAfrica, hpSahul y hpEastAsia, donde la población hpEastAsia se subdivide en las poblaciones hspEAsia, hspMaori y hspAmerind (19-21).

En Perú, a partir de aislados provenientes de la comunidad amerindia Shimaá en zonas remotas de la Amazonia se ha reportado cepas hspAmerind que se relacionan con las cepas asiáticas hpEastAsia. Mientras que en una zona rural de Lima se ha reportado un desplazamiento progresivo de las cepas hspAmerind por cepas hpEurope (22-24). La comparación de genomas de regiones cultural y geográficamente distintas, provenientes de las comunidades Asháninkas y Shimaá en la Amazonia, de los andes en Puno y mestizas en Lima, sugieren la identificación de una nueva población denominada hspEuropePeru. Esta nueva población de cepas peruanas ha mostrado tener una ascendencia de las cepas hspAmerind, pero con una mayor presencia de elementos relacionados a genes de virulencia y patogenicidad (25). Eventos similares se han descrito para cepas provenientes de Colombia y Nicaragua que muestran una ascendencia de las poblaciones hpEurope y hpAfrica1, sugiriendo los linajes evolutivos independientes hspEuropeColombia y hspAfrica1Nicaragua respectivamente (26, 27).

1.3. Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*

En la mayoría de los casos la infección por *H. pylori* se presenta como una infección crónica asintomática y se sugiere que la bacteria se adquiere a muy temprana edad debido al contacto intrafamiliar persona-persona (28, 29). La fase clínica de la infección es variable y se puede manifestar como ulceración gástrica o duodenal que progresa a atrofia gástrica y posteriormente a adenocarcinoma gástrico o linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (30, 31).

H. pylori es una bacteria capaz de adaptarse a las condiciones extremadamente ácidas del entorno gástrico lo que le permite establecer una infección persistente y desregular los mecanismos de respuesta inflamatoria del hospedero, a través de alteraciones de las vías de señalización y modificaciones epigenéticas en las células de la mucosa epitelial (32). Estos mecanismos de supervivencia se acompañan de una actividad ureasa intrínseca que le facilita tamponar la acidez del entorno gástrico, de la presencia de flagelos que la disponen de una movilidad hacia las células epiteliales, de la presencia de adhesinas que facilitan la interacción con los receptores de membrana del hospedero y finalmente de un daño tisular mediado por toxinas y oncoproteínas (12, 33).

Se conoce que la interacción de factores de virulencia presentes en *H. Pylori* se relacionan a las lesiones precancerosas observadas sobre el tejido epitelial gástrico de los pacientes con infección. De forma independiente algunos genes asociados a factores de virulencia de *H. pylori* se relacionan con el incremento de riesgo de enfermedad; tal como, el gen de la citotoxina vacuolizante A (*vacA*) que codifica para la secreción de la toxina VacA. La toxina VacA puede adherirse a la membrana de las células epiteliales gástricas e inducir pérdida de estabilidad, vacuolización y

necrosis celular. No obstante, las variaciones atribuidas al polimorfismo del gen *vacA* generan diferencias de actividad vacuolizante entre cepas de *H. pylori*, debidas a las diferencias alélicas para las regiones señal (s1 o s2), media (m1 o m2) y; recientemente identificadas la región intermedia (i1 o i2) y los alelos d1/d2 que refieren a una delección de un fragmento de 81 pares de bases (bp) del gen (34, 35). La presencia de los alelos s1m1 para el gen *vacA* en cepas de *H. pylori* estarían asociadas con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer gástrico (Odds ratio [OR]: 1.75) respecto al genotipo s1m2 (OR: 0.81) y el genotipo s2m2 (OR: 0.62) (36).

La citotoxina relacionada al gen A (*cagA*), corresponde a un factor de virulencia putativo de *H. pylori* que confiere una potente actividad proinflamatoria y mitogénica al patógeno, y que de forma independiente al gen *vacA* se asocia con el riesgo de desarrollo de lesiones cancerosas (OR: 2.82). Similar a la toxina VacA, la actividad de la proteína CagA podría modificarse en base a polimorfismos presentes en su región c-terminal, que contiene repeticiones de motivos catalogados como EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala). Los motivos EPIYA podrían categorizarse según el tipo de motivo (EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D) y según el número de repeticiones del motivo EPIYA-C (EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC, y otros). Las cepas de *H. pylori* que presentan un único motivo EPIYA-C (OR: 7,3) se asocian a un menor riesgo de desarrollo de adenocarcinoma gástrico respecto a aquellas cepas de *H. Pylori* que presentan dos o más repeticiones del motivo EPIYA-C (OR: 12) (37, 38). Además, el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico entre pacientes infectados por *H. pylori* aumenta cuando se detectan de forma simultánea genotipos virulentos *cagA* y *vacA* (*cagA*(+)/*vacAs1m1*; OR: 4,8), y la frecuencia de variantes conocidas de riesgo de desarrollo de lesión severa alcanza un 67,5% entre pacientes

infectados por *H. pylori* con diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal (39, 40).

En adición al efecto de citotoxicidad de los genes mencionados, la virulencia de *H. pylori* está relacionada con su capacidad de interacción con el epitelio gástrico. El gen de *H. pylori* asociado a ulceración (*iceA*), inducido por interacción con el epitelio, es un factor de virulencia que presenta dos variantes alélicas *iceA1* y *iceA2*. La variante *iceA1* del gen es clínicamente relevante dada su relación con los hallazgos de úlcera péptica, mostrando un OR de 2.06 de riesgo de desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Además, el gen *babA2*, de adhesión a antígenos de grupo sanguíneo, presente en algunas cepas de *H. pylori* permite la interacción del patógeno con el epitelio gástrico. La interacción promovida por los productos del gen *babA2* se relacionan a riesgo de progresión de gastritis atrófica y cáncer gástrico (OR: 6.32) (41-43).

La diversidad de los genes de virulencia en cepas de *H. pylori* permite observar posibles asociaciones con la severidad de los hallazgos sobre la mucosa epitelial de los pacientes con infección; no obstante, la variabilidad observada entre aislados de *H. pylori* es un determinante en el riesgo de desarrollo de malignidad del tejido epitelial gástrico. En Perú, según Boehnke et al, 2017 en un Hospital Nacional de la ciudad de Lima, la frecuencia de cepas de *H. pylori cagA* positivas estaría presente en el 100% de los pacientes con infección, y según Flores et al, 2017 la frecuencia de cepas *H. pylori cagA* positivas representaría el 91.5% de los casos con infección en la ciudad de Trujillo. En adición, en ambos estudios el 100% de los casos presentó un perfil de cepas *H. pylori vacA* s1 positivas. Estas

observaciones reflejan un potencial riesgo de desarrollo de adenocarcinoma gástrico entre individuos con infección por *H. pylori* en Perú (44, 45).

1.4. Tratamiento y resistencia antibiótica en la infección por *Helicobacter pylori*

La OMS a través de la IARC propuso y recomendó desde el año 2013 que el tratamiento frente a infección por *H. pylori* permitiría evitar el desarrollo de lesiones severas asociadas a malignidad del tejido estomacal en pacientes con la infección (46). El tratamiento frente a la infección consiste en el empleo de dos o más antibióticos (47, 48) como claritromicina, levofloxacino, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina, doxiciclina, furazolidona y/o rifabutina, que se combinan con un inhibidor de la secreción de ácido gástrico (Inhibidores de la bomba de protones – IBP o Antagonistas del receptor H₂) o un protector de mucosa epitelial gástrica basado en un preparado de bismuto (49, 50).

El régimen terapéutico definitivo frente a la infección por *H. pylori* no se ha definido y según la combinación de fármacos el régimen podría denominarse dual, triple convencional basada en claritromicina, triple con levofloxacino, concomitante, secuencial, híbrido, cuádruple con bismuto o misceláneo (51). El consenso Maastricht en su sexta versión recomienda que el régimen terapéutico a elección debe proponerse en base al mapa microbiológico de resistencia antibiótica de *H. Pylori* a fin de demostrar una eficacia local ,y sugiere que es razonable recomendar que las pruebas de susceptibilidad (genotípica o fenotípica) se realicen de forma rutinaria, incluso antes de prescribir el tratamiento de primera línea, con respecto a la administración de antibióticos a fin de establecer una terapia

personalizada (52). Según Rokkas et al, 2022 la terapia personalizada ha demostrado una eficacia superior al tratamiento empírico con OR 2,07 para una eficacia de erradicación >90% (IC 95% 1,53-2,79) (53). En Perú en los últimos 20 años, la eficacia del tratamiento de la infección por *H. pylori* basado en el régimen triple convencional empleando claritromicina ha disminuido de 93% a 71.2% (54), es de considerar que un valor aceptable de eficacia para un protocolo frente a infección debe ser superior al 85% (8, 46). Se conoce que las principales causas de fracaso terapéutico frente a la infección por *H. pylori* se debe a la resistencia del patógeno a los antibióticos y a la falta de adherencia al régimen terapéutico (52, 55). Según Camargo et al, 2014 la resistencia antibiótica de *H. pylori* y la falta de respuesta al régimen convencional sugiere enfatizar la necesidad de programas de vigilancia microbiológica apropiados, mejores regulaciones en el uso de antibióticos y una mayor conciencia pública sobre la utilización de fármacos (56). A nivel local, los reportes de resistencia antibiótica del patógeno *H. Pylori* son heterogéneos. Estas variaciones se observan dadas las diferentes estrategias de evaluación de susceptibilidad empleadas (Métodos de difusión en disco, métodos de microdilución en agar, métodos de epsilometría “E-test” métodos de microdilución en caldo y métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa “PCR test”) (57, 58) y, se desde el año 2016 se han reportado tasas de resistencia antibiótica para levofloxacino de 51% a 68%, metronidazol 52% a 67%, amoxicilina de 7% a 57%, tetraciclina de 4% a 6.7% y claritromicina de 34% a 50% (44, 59-61).

La capacidad de *H. pylori* para evitar la acción de los antibióticos sobre sus dianas farmacológicas se relaciona a eventos genéticos de tipo deleciones, inserciones,

mutaciones sin sentido o mutaciones con cambio de marco de lectura (62). También se han descrito mecanismos relacionados a una reducción de la concentración intracelular del fármaco debido a cambios en la permeabilidad a los antibióticos a través de la membrana del patógeno, relacionados con la expresión de proteínas de membrana externa, proteínas de eflujo o la síntesis de biopelículas (63-65). Es de considerar, que solo algunas mutaciones han demostrado causalidad de forma experimental mediante la transformación de aislamientos fenotípicamente sensibles a fenotipos resistentes a antibióticos (62).

En relación con el mecanismo farmacológico de los antibióticos que actúan sobre *H. pylori* y sus mecanismos moleculares de resistencia, se conoce que la subunidad 23S del ARNr bacteriano es blanco farmacológico de macrolidos y las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 del gen del *ARNr 23S* se relacionan con fenotipos resistentes a claritromicina. En Perú, se han reportado transiciones de adenina a guanina en las posiciones 2142 y 2143 del gen de *ARNr 23S* en frecuencias que varían de 34% a 45% (59, 61). En adición, mutaciones en la subunidad menor ribosómica bacteriana relacionada el gen de *ARNr 16S*, blanco terapéutico de la tetraciclina, no se han reportado en nuestro medio. También se han reportado las mutaciones N87I (30%), N87K (21%) y D90G (21%) en el gen *gyrA*, el gen *gyrA* codifica para la ADN girasa que es blanco farmacológico del fármaco levofloxacino que pertenece a la familia de las quinolonas (61, 66).

El mecanismo molecular de resistencia antibiótica al profármaco metronidazol se ha conferido por cambios estructurales y de expresión en las enzimas relacionadas con su activación, que implican al gen *rdxA* que codifica para la nitroreductasa NAPDH independiente de oxígeno y al gen *frxA* que codifica para una flavin

oxidoreductasa (67). En nuestro medio, se ha reportado una frecuencia de 6% para la mutación R16H/C sobre el gen de *rdxA* (66). La resistencia antibiótica al betalactámico amoxicilina se relaciona con mutaciones sobre el gen de la proteína de unión a penicilinas *pbp1A*, responsable de codificar para proteínas con actividad catalítica que participan de la síntesis de peptidogluano de pared bacteriana, en Perú aún no se ha reportado mutaciones con evidencia de transformación experimental que confieran resistencia a amoxicilina (68, 69).

1.5. Cáncer gástrico y epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

Las enfermedades neoplásicas malignas son una importante causa de muerte a nivel global y se atribuye que en el año 2018 representaron 9.6 millones de defunciones, donde el 70% se observan en países en desarrollo. El adenocarcinoma gástrico ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte por malignidad y representa el 8.2% de los casos para ambos sexos, con una tasa de incidencia estandarizada de 19.6 casos por 100,000 habitantes para la región las Américas (70). En el Perú, el adenocarcinoma de tejidos estomacales corresponde a la primera causa de muerte entre lesiones malignas. Según el Ministerio de Salud (MINSA) en el año 2011 el adenocarcinoma exhibió una tasa de mortalidad ajustada de 17.1 defunciones por 100,000 habitantes entre ambos sexos y; de acuerdo con la casuística del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en el año 2016 el cáncer gástrico representó el 8% de los nuevos casos de cáncer, con un incremento del 42.6% de nuevos casos durante el periodo 2000 – 2016 (71-73).

En Perú la prevalencia de infección por *H. pylori* oscila entre 37% a 89%, observándose que en los últimos 15 años no se ha modificado en los estratos

socioeconómicos medio/alto y se ha incrementado en aquellas poblaciones con déficit socioeconómico y carencias de servicios de salud (74). Entre los años 2017 a 2020 se ha reportado prevalencias de 61.1% para la ciudad de Lima, 68.4% para Trujillo, 70.5% para Chiclayo, 78.8% para Cajamarca y 76.5% para Tarapoto (59, 75). El riesgo de adenocarcinoma atribuible a la infección por *H. pylori* es ~85.9% (10, 76) y según Custodio et al, el 89.6% de los casos diagnosticados con cáncer de tejidos estomacales registrados en el INEN presentan la infección por *H. pylori* (77, 78).

El adenocarcinoma gástrico es anticipado por una serie de lesiones de la mucosa epitelial con patrones histológicos muy bien diferenciados, conocidos como la cascada de Correa; y comprende la gastritis crónica no atrófica, gastritis atrófica multifocal sin metaplasia, metaplasia intestinal del tipo completo, metaplasia intestinal del tipo incompleto y displasia (30, 79). Un estado clínico relacionado con la lesión precancerosa de gastritis atrófica corresponde a la gastritis crónica ulcerativa (80). La enfermedad gástrica ulcerativa representa el 83.3% de los diagnósticos con gastritis crónica relacionada con la presencia de *H. pylori* (81) y según Stewart et al, 2014 las complicaciones por ulcera péptica corresponden al 27% de defunciones relacionadas con emergencias quirúrgicas, siendo la ulcera péptica la primera causa de mortalidad bajo estas circunstancias (82). Es así que, las estrategias de prevención frente a la infección por *H. pylori* no solo reducirían la incidencia de cáncer gástrico; sino también, la mortalidad relacionada al desarrollo de ulceración del tejido gastrointestinal (8, 46). En adición, la infección por *H. pylori* se relaciona con patologías extra-gastrointestinales como es purpura trombocitopenica idiopática y la anemia asociada a la deficiencia de hierro (83).

Por otro lado, según Lee et al, 2007 mediante un análisis de costo-efectividad reporta que la cura temprana de la infección en individuos de 30 años o el tamizaje anual de lesiones precancerosas en individuos de 50 años en contraste a la usencia de intervenciones de vigilancia frente a la infección resultaría en una razón incremental de costo-efectividad de US\$17.004 y US\$29.741 por año de vida ganado, respectivamente. Es así, que la presencia de enfermedades gastrointestinales y extra-gastrointestinales a causa del patógeno *H. pylori* sugiere tomar decisiones que permitan la identificación de sujetos de alto riesgo, la detección de casos de cáncer gástrico en estadio temprano, la determinación de perfiles fenotípicos y genotípicos del patógeno basados en la susceptibilidad antibiótica y la detección de factores de virulencia de riesgo asociados al desarrollo de cáncer (84, 85).

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDO

H. pylori es un patógeno común en humanos capaz de generar un proceso crónico de infección que desencadena en malestares gastrointestinales y a largo plazo en malignidad del tejido epitelial gástrico. La bacteria es un patógeno exitoso en el humano y es considerado por la OMS como un carcinógeno del grupo I, lo que explica su fuerte relación con el desarrollo de enfermedades severas (5, 8).

Se estima que a nivel global la infección por *H. Pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población. En Perú, la infección por *H. pylori* muestra una distribución variable y alcanza valores de prevalencia de 83% en poblaciones desprotegidas con bajos recursos económicos y de salud, lo que representa un problema de salud pública nacional (12, 74).

Se conoce que el desarrollo de enfermedad mediado por la presencia del patógeno está sujeto a condiciones específicas del hospedero, ambientales y a la presencia de genes de factores de virulencia en *H. pylori* (86, 87).

La presencia de factores de virulencia en aislados del patógeno *H pylori* permiten relacionar la severidad de enfermedad observada entre individuos con diagnóstico para la infección (83, 88). La genotipificación de factores de virulencia circulantes facilita una mejor aproximación del rol de *H. pylori* en el desarrollo de enfermedad e intervenciones en pacientes con potenciales riesgos de desarrollo de adenocarcinoma gástrico (89). De forma que, la tipificación de cepas virulentas a nivel poblacional es una estrategia importante para caracterizar patógenos y permite explorar relaciones de riesgo de lesiones precancerosas bajo la detección de genes de virulencia específicos en aislados de *H. Pylori* (36).

A nivel local, se ha descrito en un Hospital Nacional de la ciudad de Lima que las de cepas de *H. pylori cagA* positivas estaría presente en el 100% de los pacientes con infección, y según reportes en la ciudad de Trujillo la frecuencia de cepas *H. pylori cagA* positivas representaría el 91.5% de los casos con infección. En adición, en ambos estudios el 100% de los casos presentó un perfil de cepas *H. pylori vacA* s1 positivas. Estas observaciones reflejan un potencial riesgo de desarrollo de cáncer entre individuos con infección por *H. pylori* en Perú, pero no describen su relación con los estadios de enfermedad crónica entre pacientes con infección (44, 45).

En adición, la persistencia del patógeno dado el fracaso terapéutico de la infección a causa de mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *H. pylori* incrementa el riesgo de lesiones severas asociadas a malignidad en el tejido gástrico (90). En Perú, se ha observa una reducción progresiva de la eficacia de la terapia convencional frente a la infección, que alcanza valores inadecuados para un régimen que busca la erradicación del patógeno (<80%) (52, 54). También se han reportado tasas de resistencia antibióticas que según el consenso internacional de Maastricht VI cataloga a nuestra población como una población altamente resistente a fármacos macrolidos (>15%) y quinolonas (>30%), con un perfil de resistencia antibiótica para los fármacos de referencia que se utilizan en nuestro medio de 51% a 68% para levofloxacino, de 52% a 67% para metronidazol, de 7% a 57% para amoxicilina, de 4% a 6.7% para tetraciclina y de 34% a 50% para claritromicina. Reportes que sugieren un riesgo de progresión a lesiones severas en pacientes que presentan la infección por *H. pylori* (59-61, 66).

Por otro lado, los avances tecnológicos en la secuenciación de genomas han permitido la identificación de poblaciones bacterianas y la caracterización de aislados virulentos de *H. pylori* basado en la genotipificación detallada de genes de factores de virulencia específicos facilitando la determinación de variantes genéticas de riesgo de enfermedad severa (91). En Perú, las tecnologías de secuenciación de genomas completos recién han sido introducidas en los últimos 4 años con fines de prevención y control de brotes epidémicos locales donde se requieren conocer las variantes circulantes de los patógenos, genes de resistencia y virulencia. Además, en nuestro medio, los estudios basados en secuenciación de última generación de genomas de aislados de *H. pylori* han facilitado distinguir los rasgos migratorios de nuestra población lo que ha permitido identificar una predominancia de cepas hpEurope y el reporte de una nueva población cepas peruanas denominada hspEuropePeru. Se conoce, además, que las cepas hspEuropePeru se constituyen de una mayor presencia de elementos relacionados a genes de virulencia y patogenicidad, pero aún no se han descrito reportes de viruloma o resistoma que permitan distinguir a estas poblaciones de cepas *H. pylori* entre estadios de enfermedad (24, 25).

Teniendo en cuenta que, en Perú, la cancerización de tejidos estomacales es la primera causa de mortalidad por lesiones neoplásicas malignas y que el 89.6% de estos casos presentan la infección por *H. pylori*, la caracterización de marcadores moleculares basados en virulencia resulta esencial en la identificación de patologías gástricas severas entre pacientes que presentan la infección por *H. pylori*. En nuestro país, los reportes de tipificación del gen *cagA* son aún insuficientes y, la detección de los factores de virulencia relacionados al gen *iceA*

y al gen *babA2*, así como, la sub-tipificación del gen *vacA* aún no se ha descrito. Es importante, además, no solo conocer la variabilidad y la distribución de las cepas virulentas de *H. pylori* en nuestro entorno sino también explorar su distribución filogenética, describir su viruloma y resistoma y, explorar su impacto sobre los hallazgos histopatológicos de mucosa epitelial gástrica en pacientes con lesiones precancerosas tipo metaplasia que presentan la infección. El análisis de genomas completos obtenidos mediante estrategias de secuenciación de última generación permitiría explorar una estimación de riesgo de desarrollo de lesiones precancerosas en los casos con infección por *H. pylori* de nuestro entorno mediante la identificación de potenciales marcadores moleculares que caractericen a las cepas circulantes y presentan un adecuado perfil de relación con el riesgo de desarrollo de adenocarcinoma gástrico.

De este modo, a partir de los casos y cepas aisladas de una cohorte de pacientes con dispepsia enrolados entre los años 2016 y 2017 en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional Cayetano Heredia la presente tesis doctoral plantea las siguientes hipótesis de estudio:

Hipótesis 1: La presencia de genes *cagA(+)/vacAslam1* en las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos se asocia a la lesión precancerosa metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica.

Hipótesis 2: La variante genética *EPIYA-ABCC/vacAslam1i1dl* en el genoma completo de cepas aisladas de *H. pylori* determinada mediante tecnologías de secuenciación de última generación provenientes de pacientes dispépticos

peruanos se asocia a la lesión precancerosa metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica.

Así mismo, se exploró si la distribución de motivos EPIYA asociados al gen *cagA*, los genotipos *vacAi*, *vacAd*, *iceA* y *babA2* se relacionan con los fenotipos de lesión precancerosa observada en pacientes peruanos con dispepsia con diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*. En adición se describió el viruloma, resistoma y se determinó la diversidad y las relaciones filogenéticas de los genomas peruanos de *H. pylori*.

III. CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y ROL DEL INVESTIGADOR

El presente trabajo de tesis doctoral es una relevante contribución al estudio de las lesiones severas de cancerización del tejido estomacal ocasionadas por el patógeno *H. pylori* y el entendimiento de factores moleculares de virulencia presentes en el patógeno relacionados con el riesgo de desarrollo de lesiones precancerosas entre pacientes peruanos con síntomas de dispepsia. La contribución del tesista estuvo orientada en la concepción de la hipótesis en ambas investigaciones de la tesis. Es importante señalar que la tesis fue desarrollada a partir de un estudio primario ejecutado en la ciudad de Lima, Perú por el equipo de investigación del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori* del IMTAvH. El estudio primario consistió a un estudio de prevalencia de la infección por *H. pylori* y permitió la identificación de 500 pacientes con síntomas de dispepsia y la creación de un biobanco de cepas aisladas del patógeno *H. pylori* entre los años 2016 y 2017, el tesista tuvo una participación importante en el desarrollo del estudio primario. El estudio primario no evaluó las características moleculares de virulencia del patógeno *H. pylori*, por lo cual, los resultados del presente trabajo de investigación corresponden a una descripción basal de las características genéticas y genómicas de virulencia de los microorganismos *H. pylori* circulantes en nuestro medio que provienen de pacientes peruanos con dispepsia. En la primera investigación, el objetivo del estudio buscó caracterizar mediante técnicas moleculares convencionales la presencia de genotipos *cagA(+)/vacAs1am1* en las cepas aisladas de *H. pylori* y explorar su relación con la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada en pacientes con

dispepsia que presentan la infección. El aporte del tesista en este objetivo fue trabajar con el equipo de investigación del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori* del IMTAvH, en conjunto con el equipo de investigación del Laboratorio de Bacteriología Especial de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá y la Unidad de Investigación de Enfermedades Emergentes y Cambio Climático (EMERGE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), a fin de optimizar la reactivación de aislamientos del patógeno y el método molecular de PCR convencional dirigido a los factores moleculares de virulencia de las muestras provenientes de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia. El trabajo intelectual estuvo orientado además a los procesos de cultivo bacteriológico para microorganismos fastidiosos, extracción de ADN, amplificación del ADN de *H. pylori* así como en interpretación de los resultados, y revisión, recolección y digitalización de la información sociodemográfica, microbiológica e histopatológica de los casos enrolados en el estudio madre. De lo anterior, se coordinó una visita a las instalaciones del Laboratorio de bacteriología especial en la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá en Colombia y la participación allí fue de entrenamiento en la preparación de medios de cultivo exigentes para microorganismos fastidiosos, cultivo de cepas estandarizadas y cultivo de aislados locales del patógeno en condición microaerofílica, extracción de ADN genómico y amplificación convencional de ADN de *H. pylori*. La transferencia de conocimiento fue usada para el procesamiento de las muestras seleccionadas en el estudio. La optimización del cultivo microbiológico fue desarrollada en las instalaciones del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori* y la estandarización de la técnica molecular de detección de factores moleculares de virulencia fue desarrollada en

las instalaciones de EMERGE. En la segunda investigación, el tesista formuló la hipótesis para explorar la relación entre la variante genética de riesgo *EPIYA-ABCC/vacAsIamIldI* en el genoma completo de cepas aisladas de *H. pylori*, que fue determinada mediante tecnologías de secuenciación de última generación a partir de muestras provenientes de pacientes dispepticos peruanos, y su asociación a la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada sobre la mucosa epitelial gástrica, así como la relación de los genes relacionados con citotoxinas, los genes de adherencia, los genes moduladores de respuesta inmune y los genes de resistencia antibiótica con el estado histopatológico de los pacientes. Este segundo estudio contribuye con la literatura científica para conocer el conjunto de polimorfismos y mutaciones en los genes de virulencia y de resistencia antibiótica sobre cepas aisladas de *H. pylori* circulantes en nuestro medio y el rol que podrían desempeñar sobre el desarrollo de lesiones severas en el tejido epitelial gástrico de los pacientes con infección. El aporte del tesista en este objetivo fue trabajar con el equipo de investigación del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori* del IMTAvH, en conjunto con el equipo de investigación del Laboratorio de Microbiología Genómica de la UPCH, a fin de disponer genomas completos de calidad de los aislados de *H. pylori* con un trabajo intelectual dirigido a obtener cultivos en alta densidad del patógeno, extraer y purificar el ADN genómico de *H. pylori*, cuantificar mediante fluorometría el ADN genómico purificado de *H. pylori*, acondicionar la preparación de librerías genómicas de *H. pylori*, analizar la calidad de lecturas obtenidas de la secuencia de última generación, ensamblar las secuencias y obtener genomas completos de calidad. De lo anterior, el tesista fue capacitado a través de una beca de entrenamiento en el Curso avanzado en

Vigilancia genómica y epidemiológica de patógenos bacterianos, desarrolla por el equipo de Wellcome Genome Campus, UK en las instalaciones de la Unidad de Epidemiología Molecular de la UPCH. Finalmente los resultados mostrados en el presente trabajo de investigación manifiestan los desafíos en la caracterización de factores moleculares de virulencia en el patógeno *H. pylori* y explora su rol sobre el desarrollo de lesiones gástricas severas en pacientes con síntomas de dispepsia peruanos lo cual era un análisis parcialmente explorado.

IV. INVESTIGACIÓN 1

Genotipos de virulencia en cepas de *Helicobacter pylori* y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos

Jesus Guzman^{1,2,5}, Denis Castillo^{1,2}, Alejandro Bussalleu¹, Alba Alicia Trespacios³, Michel Sauvain^{1,2,4}, Andrés G. Lescano⁵

¹Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori*, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

²Laboratorio Mixto Internacional de Química de la Vida, Institut de Recherche Pour le Développement (IRD), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³Laboratorio de Bacteriología especial, Universidad Pontificia Javeriana de Bogotá, Bogotá, Colombia.

⁴UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, Toulouse, Francia

⁵Facultad de Salud Pública y Administración, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Título corto. Genotipos de virulencia en *H. pylori* y cáncer gástrico.

Agradecimientos. Un agradecimiento especial al equipo de investigación del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori*, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt por el procesamiento y recolección de la información primaria de la cohorte de casos con infección por *H. pylori* y al personal del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional Cayetano Heredia por su participación en el reclutamiento de los casos y obtención de las muestras biológicas empleadas en el estudio.

Financiamiento. Luis Jesús Junior Guzmán Velásquez es estudiante del programa de Doctorado en Ciencias en Investigación Epidemiológicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT/PROCIENCIA, número de beca: EF033-235-2015). Este estudio recibió además financiamiento parcial por el Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América (números de becas D43TW001140 y D43TW007393).

4.1. Resumen

Helicobacter pylori es un patógeno común en humanos y responsable de una variedad de enfermedades gastrointestinales. Su prevalencia en Perú alcanza entre 45% a 83%, y según la casuística de INEN el 89.6% de los casos con adenocarcinoma presentan la infección por el patógeno. Se conoce que los factores de virulencia presentes en *H. pylori* promueven lesiones sobre la mucosa epitelial gástrica con riesgo de desarrollo de cáncer. El objetivo del estudio fue analizar la asociación de la presencia de genotipos *cagA(+)/vacAsIamI* en cepas aisladas de *H. pylori* con la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada en pacientes peruanos con dispepsia. Se observó que el Genotipo *cagA(+)/vacAsIamI* (36.7%) fue comparable respecto al diagnóstico histopatológico de lesión severa de tipo metaplasia intestinal (RP: 1.67; IC95%: 1.13 a 2.45; $p < 0.05$), el hallazgo fue similar en el análisis multivariado luego de ajustar por sexo y edad (RPa: 1.81; IC95%: 1.25 a 2.61; $p < 0.05$). Con relación al gen de la citotoxina vacuolizante A, se observó una mayor frecuencia para los alelos *vacAsI* (94.9%) y el subtipo *vacAsIa* (48.1%) de la región señal del gen. Los hallazgos en la región media,

intermedia y la delección de la región intermedia del gen *vacA* mostraron una alta frecuencia para los genotipos *vacAmI* (81.7%), *vacAiI* (63.9%) y *vacAdI* (70.9%). También se observó asociación significativa del genotipo de riesgo de la región media (RPa: 2.22; IC95%: 1.01 a 4.99) y la región intermedia (RPa: 1.94; IC95%: 1.05 a 3.58) del gen *vacA*, frente al hallazgo histopatológico de metaplasia intestinal. La presencia de polimorfismos para los genes *cagA* y *vacA* se relacionan con los estadios de enfermedad severa en los casos con infección por *H. pylori*.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, Factores de virulencia, Genoma bacteriano, neoplasias gástricas. (DeCS/BIREME)

4.2. Abstract

Helicobacter pylori is a common pathogen in humans and responsible for a variety of gastrointestinal diseases. Its prevalence in Peru ranges from 45% to 83%, and according to INEN casuistry, 89.6% of cases with adenocarcinoma are infected by the pathogen. Virulence factors present in *H. pylori* are known to promote lesions on the gastric epithelial mucosa with risk of cancer development. The aim of the study was to analyze the association of the presence of *cagA(+)/vacAsIamI* genotypes in *H. pylori* isolates with the precancerous lesion intestinal metaplasia observed in Peruvian patients with dyspepsia. It was observed that the *cagA(+)/vacAsIamI* genotype (36.7%) was comparable with respect to the histopathological diagnosis of severe intestinal metaplasia type lesion (PR: 1.67; 95%CI: 1.13 to 2.45; $p < 0.05$), the finding was similar in the multivariate analysis after adjusting for sex and age (RPa: 1.81; 95%CI: 1.25 to 2.61; $p < 0.05$). Regarding the vacuolizing cytotoxin A gene, a higher frequency was observed for *vacAsI*

alleles (94.9%) and *vacAs1a* subtype (48.1%) of the signal region of the gene. Findings in the middle region, intermediate region, and deletion of the middle region of the *vacA* gene showed a high frequency for *vacAm1* (81.7%), *vacAi1* (63.9%) and *vacAd1* (70.9%) genotypes. Significant association of the risk genotype of the middle region (PRa: 2.22; 95%CI: 1.01 to 4.99) and the intermediate region (PRa: 1.94; 95%CI: 1.05 to 3.58) of the *vacA* gene versus the histopathological finding of intestinal metaplasia was also observed. The presence of polymorphisms for the *cagA* and *vacA* genes are related to the stages of severe disease in cases with *H. pylori* infection.

Key words: *Helicobacter pylori*, Virulence factors, Bacterial genome, Gastric cancer. (MeSH/NLM)

4.3. Introducción

A nivel global el adenocarcinoma de estómago es la séptima causa de muerte por malignidad y entre los diagnósticos de cáncer atribuibles a infección, la infección por *H. pylori* es la primera de causa de cáncer gástrico (92). En Perú el cáncer gástrico representa la primera causa de muerte por malignidad (70, 72). La prevalencia de *H. pylori* en el Perú oscila entre 45% a 83% y, se estima que el 89.6% de pacientes con diagnóstico de cáncer de tejidos estomacales presentan la infección por *H. pylori* (73, 74, 78).

Se conoce que el adenocarcinoma gástrico es anticipado por una secuencia de cambios patológicos sobre la mucosa epitelial con patrones histológicos muy bien diferenciados, descritos como la cascada de Correa; y que la presencia de genes relacionados a factores de virulencia en *H. pylori* se asocian con el riesgo de

aparición de lesiones precancerosas (30, 79, 93). Sin embargo, en el proceso de la infección crónica no todos los pacientes desarrollan lesiones severas del epitelio gástrico.

Se sugiere que la presencia y la variabilidad genética de genes relacionados a factores de virulencia en *H. pylori*, modulan el riesgo de desarrollo de lesiones malignas (94). Entre estos factores, se ha reportado que los genotipos asociados al gen de la citotoxina vacuolizante A, variante *vacAs1m1*, presenta una importante actividad promotora de desarrollo de lesiones neoplásicas y se diferencia de la menor agresividad observada para los genotipos del gen *vacA s1m2* o *vacA s2m2*. La toxina asociada al gen A (*cagA*), de forma independiente muestra asociación de riesgo con el desarrollo lesiones precancerosas y cancerosas (36, 95), y los factores de virulencia vinculados con la colonización y adherencia de *H. pylori* sobre la mucosa epitelial gástrica, como el gen inducido por contacto con el epitelio (*iceA1*) y el gen de adhesinas fijadoras de antígenos del grupo sanguíneo (*babA2*), se relacionan con la presencia de lesiones ulcerativas o atróficas del tejido gástrico promoviendo el riesgo de enfermedad (41-43).

Diversos estudios sugieren que la presencia del genotipo *cagA(+)* y el genotipo *vacAs1m1* presentan una fuerte relación con el desarrollo de lesiones gástricas severas, pero en Perú esta asociación aún no ha sido documentada. El objetivo del estudio fue explorar la presencia de genotipos *cagA+/vacAs1m1* en cepas aisladas de *H. pylori* y su relación con la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada en pacientes peruanos con dispepsia. Así como, describir si la distribución de motivos EPIYA asociados al gen *cagA*, los genotipos *vacAi*, *vacAd*, *iceA* y *babA2* se relacionan con los fenotipos de lesión.

4.4. Material y métodos

4.4.1. Diseño, población y criterios de inclusión

El diseño de estudio fue de tipo transversal e incluyó 158 aislados clínicos de *H. pylori* provenientes de pacientes adultos con dispepsia referidos para endoscopia en el servicio de gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia en la ciudad de Lima, Perú, y diagnosticados por primera vez para la infección por *H. pylori* (entre marzo 2016 y agosto 2017). Las cepas fueron obtenidas mediante un estudio de prevalencia realizado por los investigadores del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori* del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú. El estudio primario comprendió un enrolamiento de 1) pacientes de ambos sexos mayores de 18 años que acudieran al servicio de gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia y 2) que presentaran indicación de estudio endoscópico y toma de biopsia gástrica, 3) así como diagnóstico de dispepsia y 4) que no hayan recibido tratamiento antimicrobiano durante los tres meses previos a su consulta 5) ni tratamiento con inhibidores de bomba de protones durante las dos semanas previas a su procedimiento endoscópico. Además, en el estudio primario se consideró excluir 1) a los pacientes que a pesar de presentar diagnóstico de dispepsia no presentaron indicación de procedimiento endoscópico y toma de biopsia gástrica, 2) a aquellos que hayan recibido terapia de erradicación para *H. pylori* en los últimos seis meses previos a su procedimiento endoscópico y 3) a los pacientes que presentaron las siguientes características: pacientes gestantes, madres lactantes, pacientes con discapacidad física o mental, pacientes con presencia de enfermedades malignas u inmunosupresoras concomitantes,

pacientes con historia de cáncer gástrico, pacientes con enfermedad de ulcera péptica activa, pacientes con síndrome de Zollinger-Ellison, y también a aquellos pacientes que recibían tratamiento de quimioterapia (55).

El estudio primario no evaluó las características moleculares de virulencia, por lo cual, los resultados corresponden a una descripción basal por métodos convencionales del estado de genes relacionados a factores de virulencia en la infección por *H. pylori*. En el presente estudio se consideró 1) los casos con infección por *H. pylori* que presentaron diagnóstico positivo por histopatología, confirmados mediante cultivo microbiológico con disposición de aislado criopreservado y que 2) presenten reporte de hallazgos histopatológicos para el estadio clínico de gastritis crónica no atrófica o de metaplasia intestinal. Además, los casos con información faltante o reporte histopatológico de estado clínico de displasia o de gastritis crónica atrófica sin metaplasia fueron excluidos del estudio. En adición, durante el proceso de cultivo microbiológico de los aislados clínicos se excluyó los casos con aislamiento del patógeno *H. pylori* que no reactivaron al cultivo microbiológico. En la Figura 1 se detalla el flujograma de casos con dispepsia e infección por *H. pylori* elegibles para el estudio.

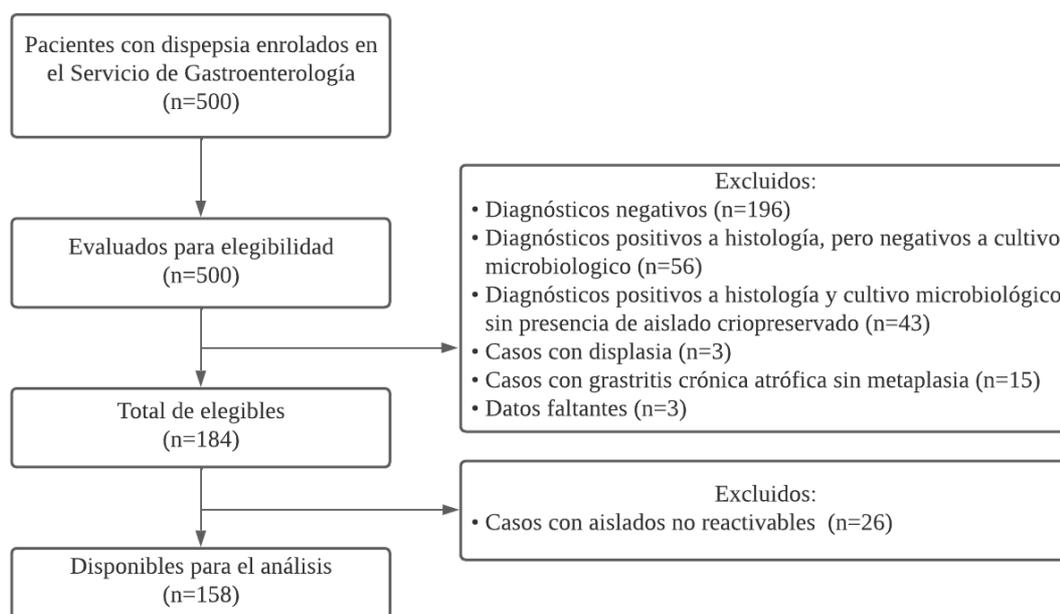


Figura 1. Flujograma de casos con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* elegibles en la investigación 1.

Las cepas fueron aisladas a partir de biopsias gástricas obtenidas según el protocolo Maastricht (52) y cada aislado correspondió a un paciente diferente. De los pacientes de quienes se aislaron las cepas, se obtuvo el reporte histopatológico y se clasificó para los casos en estadios clínicos de metaplasia intestinal (IM) (N=61, 38.6%) y de gastritis crónica no atrofica (CNAG) (N=97, 61.4%). El diagnóstico histopatológico fue desarrollado por los investigadores del estudio primario según las recomendaciones del sistema Sydney mediante tinción Hematoxilina-Eosina de las muestras gástricas (96). El tamaño de muestra del presente estudio fue estimado mediante el cálculo de poder, a partir de un ensayo piloto con una submuestra de la cohorte analizada, donde se consideró una prevalencia de casos con metaplasia intestinal que presentaron aislados con genotipo *cagA/vacAs1am1* de 58.3% y una prevalencia de 34.5% de casos con metaplasia intestinal que presentaron otros

genotipos. Se utilizó el comando POWER en el software Stata/SE versión 17.0 para determinar el poder estadístico resultando un 84.3% de poder.

4.4.2. Consideraciones éticas

La investigación fue registrada en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) – Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) con código 201182, y fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución con numero de constancia 059-03-20. Durante la implementación del estudio se respetaron los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y por el CIE-UPCH.

4.4.3. Procedimientos de estudio

4.4.3.1. Reactivación de cepas aisladas de *Helicobacter pylori*

Identificados los aislados a partir de los casos elegibles para el estudio, de forma independiente, se tomó una alícuota de 200 μ l de cada aislado criopreservado y fue colocada en placas de cultivo que contenían agar BHI (BD, Alemania) suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero, y un sistema de cribado microbiológico basado en anfotericina B (Sigma-Aldrich, E.E.U.U) y suplemento antibiótico de cribado Skirrow (Oxoid, Reino Unido) y, suplemento nutricional Isovitalax (BD, Alemania) para facilitar el crecimiento de cepas *H. pylori*. Las placas de cultivo fueron incubadas bajo condiciones de microaerobiosis empleando un sistema de mezcla de gases (10% de CO₂, 5% de O₂ y 85% de N₂)

(Praxair, Perú) a 37°C durante 4 a 7 días. Empleando los estándares para la identificación del microorganismo *H. pylori*, se procedió a cosechar las colonias considerando sus características de cultivo, tinción Gram y características bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa positivo) (97).

4.4.3.2.Extracción de ADN genómico

A partir de la reactivación y crecimiento de las cepas aisladas de *H. pylori* se extrajo el ADN total mediante el kit de purificación GeneJET Genomic DNA (ThermoFisher, E.E.U.U), siguiendo las instrucciones de fabricante. El purificado de ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría a través de Nanodrop y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.6%.

4.4.3.3.Genotipificación de factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

La genotipificación fue desarrollada mediante la estrategia de PCR convencional que permitió la obtención de productos de amplificación para el gen *cagA*, que incluye la detección de los motivos EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D; el gen *vacA* (alelos *s1*, *s2*, *i1*, *i2*, *d1*, *d2*, *m1*, *m2* y subtipos *s1a*, *s1b* y *s1c*), el gen *iceA* (alelos 1 y 2) y el gen *babA* (alelo 2) (35, 98-107). Los genes fueron amplificados empleando la enzima Taq ADN polimerasa GoTaq Green Master Mix (Promega, E.E.U.U), con volúmenes finales de reacción de 20 μ l y 10 μ M cebadores. Los protocolos de amplificación y el tamaño en pares de bases de los productos de amplificación esperados se detalla en la Tabla 1. Los productos de amplificación fueron teñidos durante el proceso de amplificación por colorantes incluidos de fabrica en la mezcla maestra de la Taq ADN polimerasa y su

visualización fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se empleó como control la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504 (108).

Tabla 1. Genes, cebadores y protocolos empleados para la genotipificación de factores de virulencia de *Helicobacter pylori*.

Genes	Cebadores (5' – 3')	Tamaño del producto (pb)	Protocolo de PCR
Gen <i>cagA</i> asociado a la citotoxina (<i>cagA</i>)			
Constante 5'	F: TTGACC AACAAACCACAAACCGAAG R: CTCCTTAATTGCGAGATTCC	183	1 ciclo de 95 °C por 9 min, 40 ciclos de: 95 °C por 30 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 45 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (98)
Variable 3'	F: ACCCTAGTCGGTAATGGG R: GCTTTAGCTTCTGAYACYGC	400 (AB) 500 (ABC) 600 (ABCC) 700 (ABCCC)	1 ciclo de 95 °C por 10 min, 39 ciclos de: 95 °C por 30 s, 52.3 °C por 30 s y 72 °C por 36 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (99)
Gen asociado a la citotoxina vacuolizante A (<i>vacA</i>)			
Señal	F: ATGGAAATACAACAAACACAC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	259 (s1) 286 (s2)	1 ciclo de 95 °C por 2 min, 40 ciclos de: 95 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (100, 101)
Señal (sub)	Fs1a: GTCAGCATCACACCGCAAC Fs1b: AGCGCCATACCGCAAGAG Fs1c: TTAGTTTCTCTCGCTTTAGTRGGGYT R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	190 (s1a) 187 (s1b) 220 (s1c)	1 ciclo de 95 °C por 2 min, 35 ciclos de: 95 °C por 60 s, 52 °C por 60 s y 72 °C por 60 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (100, 101)
Media	F: CCATCTGTCCAATCAAGCGAG R: GCGTCTAAATAATTCCAAGG	570 (m1) 645 (m2)	1 ciclo de 95 °C por 9 min, 40 ciclos de: 95 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (102)
Intermedia (i1)	F: GTTGGGATTGGGGGAATGCCCG R: TTAATTTAACGCTGTTTGAAG	426	1 ciclo de 95 °C por 4 min, 35 ciclos de: 95 °C por 30 s, 55 °C por 60 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (35, 103, 104)
Intermedia (i2)	F: GTTGGGATTGGGGGAATGCCG R: GATCAACGCTCTGATTGA	432	1 ciclo de 95 °C por 4 min, 35 ciclos de: 95 °C por 30 s, 55 °C por 60 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (35, 103, 104)
Delección 81bp	F: ACTAATATGGCACACTGGATTG R: CTCGCTTGATTGGACAGATTG	367 – 379 (d1) 298 (d2)	1 ciclo de 95 °C por 2 min, 35 ciclos de: 95 °C por 30 s, 53 °C por 60 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (105)
Gen inducido por contacto con el epitelio (<i>iceA</i>)			
A1	F: GTGTTTTTAACCAAAGTATC R: CTATAGCCASTYTCTTTGCA	247 (A1)	1 ciclo de 95 °C por 2 min, 40 ciclos de: 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (98, 106)
A2	F: GTTGGGTATATCACAATTTAT R: TTRCCCTATTTCTAGTAGGT	229 (A2)	1 ciclo de 95 °C por 2 min, 40 ciclos de: 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (98, 106)
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo (<i>babA</i>)			
A2	F: AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA R: TGTTAGTGATTTCGGGTAGGACA	832	1 ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de: 92 °C por 60 s, 52 °C por 60 s y 72 °C por 60 s y, 1 ciclo de 72°C por 5min (101, 107)

4.4.3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Las variables de estudio fueron descritas mediante estadísticos de resumen. La asociación entre los tipos de lesión precancerosas de mucosa epitelial gástrica y el genotipo virulento *cagA(+)/vacAslam1* en los aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia fue explorada de forma bivariada usando la prueba de ji-cuadrada. Además, se exploró la asociación entre los tipos de lesión precancerosas frente a los genotipos *cagA* (motivos EPIYA), *vacAi*, *vacAd*, *iceA* y *babA*, en caso de incumplimiento de supuestos se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideró un nivel de significancia $p < 0.05$. Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión bivariado y múltiple mediante una regresión de Poisson empleando un modelo lineal generalizado de familia binomial con enlace log a modo de lograr una aproximación a la distribución binomial, permitiendo el cálculo de la razón de prevalencias siendo este significativo para valores de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron desarrollados empleando el paquete estadístico Stata/SE versión 17.0.

4.5. Resultados

En la población de 158 casos con dispepsia elegibles para el estudio que presentaron la infección por *H. pylori*, se observó que el sexo mujer y grupo etario con edad superior a 50 años presentaron una mayor frecuencia de infección (70.3% y 58.8% respectivamente) y, que el 38.6% de los casos fue diagnosticado de forma histopatológica para metaplasia intestinal. Los hallazgos moleculares en las cepas de *H. pylori* mostraron que la totalidad de los aislados presentan el gen *cagA*, y que los motivos EPIYA de la proteína *cagA* respondieron para EPIYA-

A, EPIYA-B y EPIYA-C, donde se observó genotipos EPIYA simples y múltiples, y una predominancia para el genotipo EPIYA-ABC (68.4%). Se observó que 114 casos no presentaron co-infección (6 casos EPIYA-AB (3.8%); 108 casos EPIYA-ABC (68.4%)). Además, entre los casos con co-infección se observaron 33 casos con doble genotipo EPIYA con perfiles AB/ABC (3.2%) y ABC/ABCC (17.7%), y 11 casos con triple genotipo EPIYA (ABC/ABCC/ABCCC).

Con relación al gen de la citotoxina vacuolizante A, se observó una mayor frecuencia para los alelos *vacAsI* (94.9%) y el subtipo *vacAsIa* (48.1%) de la región señal del gen. La sub-tipificación de la región señal del gen *vacA* mostró co-infección con genotipos múltiples *sIa/sIb* (21.5%), *sIa/sIc* (15.2%) y *sIa/sIb/sIc* (15.2%). Los hallazgos en la región media, intermedia y la delección de la región intermedia del gen *vacA* mostraron una alta frecuencia para los genotipos *vacAmI* (81.7%), *vacAiI* (63.9%) y *vacAdI* (70.9%).

También se observó que las cepas de *H. pylori* presentaron en un 69.6% ambos alelos para el gen *iceA* y que el 52.5% de los aislados fue positivo al gen *babA2*. El genotipo *cagA+/vacAsIamI* presentó una frecuencia de 36.7% entre los aislados provenientes de pacientes peruanos con dispepsia (Tabla 2).

Tabla 2. Características moleculares de las cepas aisladas de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori*.

Características moleculares	N (%)
Sexo	
Mujer	111 (70.3)
Hombre	47 (29.7)
Edad	
<35 años	19 (12.1)
35-50 años	46 (29.1)
>50 años	93 (58.8)
Gen <i>cagA</i> asociado a la citotoxina	
<i>CagA</i>	158 (100.0)
Motivos EPIYA de la proteína <i>cagA</i>	
ABC	108 (68.4)
AB	6 (3.8)
AB/ABC	5 (3.2)
ABC/ABCC	28 (17.7)
ABC/ABCC/ABCCC	11 (6.9)
Región señal de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAs2</i>	8 (5.1)
<i>vacAs1</i>	150 (94.9)
Subtipos <i>s1</i> de la región señal de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAs1a</i>	76 (48.1)
<i>vacAs1a/s1b</i>	34 (21.5)
<i>vacAs1a/s1c</i>	24 (15.2)
<i>vacAs1a/s1b/s1b</i>	24 (15.2)
Región media de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAm2</i>	29 (18.3)
<i>vacAm1</i>	129 (81.7)
Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAi2</i>	44 (27.9)
<i>vacAi1</i>	101 (63.9)

<i>vacAi1/i2</i>	13 (8.2)
<i>Delección de la región intermedia de la citotoxina vacuolizante A</i>	
<i>vacAd2</i>	46 (29.1)
<i>vacAd1</i>	112 (70.9)
Gen inducido por contacto con el epitelio	
<i>iceA2</i>	15 (9.5)
<i>iceA1</i>	33 (20.9)
<i>iceA1/iceA2</i>	110 (69.6)
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo	
<i>babA2</i> negativo	75 (47.5)
<i>babA2</i> positivo	83 (52.5)
Genotipo <i>cagA+/vacAs1m1</i>	
Otros genotipos ^a	33 (20.9)
<i>cagA+/vacAs1m1</i>	125 (79.1)
Genotipo <i>cagA+/vacAs1am1</i>	
Otros genotipos ^a	100 (63.3)
<i>cagA+/vacAs1am1</i>	58 (36.7)
Hallazgo histopatológico	
Gastritis crónica no Atrófica	97 (61.4)
Metaplasia	61 (38.6)

^aOtros genotipos: Genotipos *cagA(+)* con variantes alélicas diferentes al genotipo *vacAs1m1* o *vacAs1am1*.

Entre los factores asociados al hallazgo histopatológico, se observó que en el grupo etario con más de 50 años los casos presentaron una mayor frecuencia de lesión de tipo metaplasia intestinal ($p < 0.05$). También se observó que los alelos relacionados al gen de la citotoxina vacuolizante A, para los subtipos *vacAs1* (genotipo *vacAs1a*: 43.4%), la región media (genotipo *vacAm1*: 43.4%) y la región intermedia (genotipo *vacAi1*: 47.5%) fueron estadísticamente diferentes respecto al hallazgos de tipo metaplasia. Además, se observó que las cepas de *H. pylori* fueron positivas al alelo 1 del gen inducido por contacto con el epitelio (*iceA1*) en

el 51.5% de los casos con metaplasia intestinal, esta observación fue estadísticamente significativa. El Genotipo *cagA+/vacAsIamI* (51.7%) y aquellos otros genotipos positivos para el gen *cagA+* con variantes alélicas diferentes al genotipo *vacAsIamI* o con múltiples variantes alélicas para el gen *vacA* (31.0%) detectados en los aislados de *H. pylori* fue significativo respecto al diagnóstico histopatológico de lesión severa de tipo metaplasia intestinal ($p<0.05$) (Tabla 3).

Por otro lado, se observó que en el análisis de regresión múltiple ajustado por sexo y edad la prevalencia de casos con diagnóstico de metaplasia intestinal que presentaron aislados de *H. pylori* con el genotipo *cagA+/vacAsIamI* es 1.81 veces respecto a aquellos casos con infección y hallazgo histopatológico de tipo gastritis crónica no atrófica ($p<0.05$). Este resultado fue similar en el análisis de regresión bivariado (RP:1.67; IC95%: 1.13 a 2.45; $p<0.05$) (Tabla 4).

Tabla 3. Factores moleculares de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes dispépticos con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Variables	Hallazgo histopatológico		<i>p</i> *
	Gastritis crónica no atrófica (N=97)	Metaplasia (N=61)	
	n (%)	n (%)	
Sexo			0.086
Mujer	73 (65.7)	38 (34.3)	
Hombre	24 (51.1)	23 (48.9)	
Edad			0.001
<35 años	15 (78.9)	4 (21.1)	
35-50 años	36 (78.3)	10 (21.7)	
>50 años	46 (49.5)	47 (50.5)	
Gen <i>cagA</i> asociado a la citotoxina			1.000
<i>CagA</i> positivo	97 (61.4)	61 (38.6)	
Motivos EPIYA			0.206**
ABC	71 (65.7)	37 (34.3)	
AB	4 (83.3)	1 (16.7)	
AB/ABC	3 (60.0)	2 (40.0)	
ABC/ABCC	13 (46.4)	15 (53.6)	
ABC/ABCC/ABCCC	5 (45.5)	6 (54.5)	
Región señal de la citotoxina vacuolizante A			0.120**
<i>vacAs2</i>	7 (87.5)	1 (12.5)	
<i>vacAs1</i>	90 (60.0)	60 (40.0)	
Subtipos <i>vacAs1</i> de la citotoxina vacuolizante A			0.036
<i>vacAs1a</i>	43 (56.6)	33 (43.4)	
<i>vacAs1a/s1b</i>	28 (82.4)	6 (17.6)	
<i>vacAs1a/s1c</i>	13 (54.2)	11 (45.8)	
<i>vacAs1a/s1b/s1c</i>	13 (54.2)	11 (45.8)	
Región media de la citotoxina vacuolizante A			0.009
<i>vacAm2</i>	24 (82.7)	5 (17.3)	

<i>vacAm1</i>	73 (56.6)	56 (43.4)	
<i>Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A</i>			0.007
<i>vacAi2</i>	35 (79.6)	9 (20.4)	
<i>vacAi1</i>	53 (52.5)	48 (47.5)	
<i>vacAi1/i2</i>	9 (69.2)	4 (30.8)	
<i>Delección de la región intermedia de la citotoxina vacuolizante A</i>			0.785
<i>vacAd2</i>	29 (63.1)	17 (36.9)	
<i>vacAd1</i>	68 (60.7)	44 (39.3)	
Gen inducido por contacto con el epitelio			0.007
<i>iceA2</i>	5 (33.3)	10 (66.7)	
<i>iceA1</i>	16 (48.5)	17 (51.5)	
<i>iceA1/iceA2</i>	76 (69.1)	34 (30.9)	
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo			0.522
<i>babA2</i> negativo	48 (64.1)	27 (35.9)	
<i>babA2</i> positivo	49 (59.1)	34 (40.9)	
Genotipos <i>cagA+/vacAs1m1</i>			0.007
Otros genotipos ^a	27 (81.8)	6 (18.2)	
<i>cagA+/vacAs1m1</i>	70 (56.0)	55 (44.0)	
Genotipo <i>cagA+/vacAs1am1</i>			0.010
Otros genotipos ^a	69 (69.0)	31 (31.0)	
<i>cagA+/vacAs1am1</i>	28 (48.3)	30 (51.7)	

^aOtros genotipos: Genotipos *cagA(+)* con variantes alélicas diferentes al genotipo *vacAs1m1* o *vacAs1am1*.

*Prueba estadística de ji-cuadrada; ** Prueba exacta de Fisher.

Tabla 4. Factores moleculares de las cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Características	Análisis bivariado			Regresión múltiple		
	RP	IC 95%	<i>p</i>	Rpa	IC 95%	<i>p</i>
Motivos EPIYA						
ABC	Ref.			Ref.		
AB	0.48	0.07 – 2.98	0.436	0.45	0.08 – 2.57	0.369
AB/ABC	1.16	0.38 – 3.53	0.784	1.60	0.39 – 6.54	0.516
ABC/ABCC	1.56	1.02 – 2.41	0.043	1.31	0.84 – 2.03	0.238
ABC/ABCC/ABCCC	1.59	0.87 – 2.91	0.130	1.19	0.65 – 2.20	0.573
Región señal de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAs2</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAs1</i>	3.19	0.51 – 20.3	0.218	2.38	0.38 – 14.8	0.353
Subtipos <i>vacAs1</i> de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAs1a</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAs1a/s1b</i>	0.40	0.18 – 0.88	0.022	0.35	0.17 – 0.77	0.007
<i>vacAs1a/s1c</i>	1.05	0.63 – 1.75	0.834	0.92	0.57 – 1.50	0.749
<i>vacAs1a/s1b/s1c</i>	1.05	0.63 – 1.75	0.834	0.86	0.54 – 1.39	0.539
Región media de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAm2</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAm1</i>	2.52	1.11 – 5.74	0.028	2.22	1.01 – 4.99	0.044
Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAi2</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAi1</i>	2.32	1.25 – 4.32	0.008	1.94	1.05 – 3.58	0.034
<i>vacAi1/i2</i>	1.50	0.55 – 4.11	0.426	1.53	0.58 – 4.06	0.390

<i>Delección de la región intermedia de la citotoxina vacuolizante A</i>						
<i>vacAd2</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAd1</i>	1.06	0.68 – 1.65	0.787	0.95	0.63 – 1.43	0.802
Gen inducido por contacto con el epitelio						
<i>iceA2</i>	Ref.			Ref.		
<i>iceA1</i>	0.77	0.47 – 1.26	0.301	0.78	0.48 – 1.25	0.303
<i>iceA1/iceA2</i>	0.46	0.29 – 0.73	0.001	0.46	0.30 – 0.70	0.001
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo						
<i>babA2</i> negativo	Ref.			Ref.		
<i>babA2</i> positivo	1.13	0.76 – 1.69	0.525	1.22	0.84 – 1.78	0.295
<i>Genotipo cagA(+)/vacAs1m1</i>						
Otros genotipos ^a	Ref.			Ref.		
<i>cagA+/vacAs1m1</i>	2.42	1.14 – 5.13	0.021	2.10	1.01 – 4.40	0.049
<i>Genotipo cagA(+)/vacAs1am1</i>						
Otros genotipos ^a	Ref.			Ref.		
<i>cagA+/vacAs1am1</i>	1.67	1.13 – 2.45	0.009	1.81	1.25 – 2.61	0.002

RP: razón de prevalencia; Rpa: razón de prevalencia ajustada por sexo y edad; IC95%: Intervalo de confianza al 95%.

^aOtros genotipos: Genotipos *cagA(+)* con variantes alélicas diferentes al genotipo *vacAs1m1* o *vacAs1am1*.

4.6. Discusión

La metaplasia intestinal puede ser considerada un punto de no retorno en la cascada de desarrollo del adenocarcinoma gástrico y los pacientes con diagnóstico de metaplasia intestinal tienen un riesgo especialmente alto de cáncer gástrico incluso después de la erradicación de *H. pylori* (109, 110). La infección por *H. pylori* induce cambios genéticos y epigenéticos sobre la mucosa epitelial gástrica en dependencia a la codificación de genes de factores de virulencia en el patógeno, por lo que su tipificación resultará de utilidad en las estrategias públicas de prevención de cáncer gástrico (111).

En la población de 158 pacientes con dispepsia que presentaron la infección por *H. pylori* la detección del genotipo *cagA(+)/vacAs1am1* entre los aislados fue un factor de riesgo a la presencia de lesiones del epitelio gástrico de tipo metaplasia intestinal, se observó que la prevalencia de infección por cepas de *H. pylori* con genotipo *cagA(+)/vacAs1am1* fue 81% mayor en aquellos casos que presentaron diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal respecto a los casos con lesión de tipo gastritis crónica no atrófica (RPa: 1.81; IC95%: 1.25 a 2.61; $p < 0.05$). El riesgo de un resultado clínico severo relacionado al desarrollo de adenocarcinoma gástrico aumenta debido a la infección por cepas *H. pylori* que presentan de forma simultánea múltiples genes de virulencia del patógeno (39, 112). Se ha reportado que las cepas de *H. Pylori* con genotipo *vacAs1am1* presentan 1.75 (IC95%: 1.04 a 2.96) veces mayor riesgo de desarrollo de lesiones severas sobre el epitelio gástrico (36), y que la detección simultánea del gen *cagA* para dicho genotipo tiene un riesgo de progresión a lesiones precancerosas de 4.8 (IC95%: 1.71 a 13.5) veces mayor en comparación las cepas que presentan variantes alélicas diferentes,

con riesgos más altos que si cada uno de estos genes son evaluados individualmente (89). En el estudio se observó que la detección simultánea del genotipo *vacAs1m1* y el gen *cagA* presenta un riesgo de 2.42 (IC95%: 1.14 a 5.13) veces mayor de desarrollo de lesiones severas de tipo metaplasia intestinal. Este hallazgo fue similar en el análisis de regresión múltiple ajustado por sexo y edad (RP: 2.10; IC95%: 0.99 a 4.40; $p < 0.05$) (Tabla 4).

De forma independiente, en el presente estudio la tipificación del gen *cagA* fue positivo para todos los aislados de *H. pylori*. Hallazgo que es comparable al reporte de Boehnke et al, 2017 donde se observó que el 100% de los aislados provenientes de pacientes peruanos de una entidad pública de salud de la ciudad Lima presentan el gen *cagA* (44). El hallazgo difiere con el reporte de Evangelista et al, 2016 para la ciudad de Trujillo en la región La Libertad (61%) (75), lo que sugiere una predominancia de cepas *H. pylori* con genotipo *cagA*(+) en poblaciones procedentes de la ciudad de Lima en Perú. Además, una mayor frecuencia de cepas *H. pylori cagA*(+) detectadas entre pacientes con dispepsia no solo sugiere un mayor riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico, sino también un mayor grado de inflamación crónica sobre la mucosa epitelial gástrica que aumenta el riesgo de atrofia y metaplasia intestinal comparadas con cepas *H. pylori cagA*(-) (113, 114).

Se conoce que todas las cepas de *H. pylori* producen la toxina *vacA*, sin embargo existe una importante variación en la capacidad en que la toxina induce vacuolización de las células del tejido epitelial gástrico, esta variación es atribuida a la diversidad genética del gen *vacA* y su capacidad de asumir diferentes reordenamientos polimórficos (34, 100). En el presente estudio, la tipificación del

gen de la citotoxina vacuolizante A, mostró que el riesgo de desarrollo de lesión precancerosa de tipo metaplasia intestinal para el genotipo *vacAsI* fue de 3.19 ($p>0.05$) y para el genotipo *vacAmI* fue 2.52, este último hallazgo fue estadísticamente significativo, hallazgos que sugieren un alto nivel de respuesta inflamatoria con mayor daño sobre el epitelio gástrico de los pacientes con dispepsia peruanos y que es similar a las observaciones de Mattos et al, 2013 que mediante un metaanálisis reportó que los genotipos *vacAsI* (OR: 5.32; IC95%: 2.76 a 10.26) y el genotipo *vacAmI* (OR:2.50; IC95%: 1.67 a 3.75) se asocian el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico (115). Se caracterizó la región intermedia del gen *vacA*, se observó que el polimorfismo *vacAiI* fue predominante entre los aislados (63.9%) y presenta un riesgo de desarrollo de metaplasia intestinal de 2.32 ($p<0.05$) respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica entre los pacientes con infección. Se conoce que la región intermedia del gen *vacA* es esencial para la actividad vacuolizante de la toxina y, Según El Khadir et al, 2020 se asocia significativamente al estadio clínico de metaplasia intestinal en pacientes con la infección por *H. pylori* (OR: 2.75; IC95%: 1.59 a 4.73) (116). Además, se ha reportado a partir de aislados provenientes de Colombia, una predominancia de polimorfismos *vacAiI* entre cepas de *H. pylori* positivas para el gen *cagA* (103). La tipificación de la delección de la región intermedia del gen de la citotoxina vacuolizante A no mostró una asociación significativa con el estadio de enfermedad avanzada entre pacientes con la infección por *H. pylori* (Rpa: 0.95; IC95%: 0.63 a 1.43; $p>0.05$). Según Ogiwari et al, 2009 la delección de 81bp en la región intermedia del gen *vacA* podría ser un predictor de lesiones severas del epitelio gástrico y reporta frecuencias de la variante *vacAdI* de 74.1% en Estados

Unidos y de 74% en Colombia, el reporte es comparable al presente estudio (70.9%). Además, reporta, riesgos significativos en los casos con cáncer gástrico (OR: 8.04; IC95%: 2.67 a 24.16; $p < 0.05$) pero ausencia de diferencias estadísticas con relación a los casos con lesiones tempranas como gastritis atrófica (OR: 1.87; IC95%: 0.91 a 3.87; $p > 0.05$) (105).

En adición se exploró, los polimorfismos asociados al gen inducido por contacto con el epitelio, donde se observó que la variante con alelo 1 y alelo 2 para el gen *iceA* presentó un 54% menor de riesgo con el desarrollo de metaplasia intestinal, este hallazgo fue estadísticamente significativo (RPa: 0.46; IC95%: 0.30 a 0.70; $p < 0.05$). También se exploró la presencia del gen de la adhesina fijadora de antígenos de grupo sanguíneo (gen *babA2*), se observó que la prevalencia de cepas con el alelo 2 para el gen *babA* fue 22% mayor entre los casos con diagnóstico de metaplasia intestinal respecto a los casos con enfermedad crónica no atrófica, el hallazgo no fue estadísticamente significativo (RPa: 1.22; IC95%: 0.84 a 1.78; $p > 0.05$). Se ha reportado en poblaciones de Brasil y México, frecuencias de 13.3% a 40.4% para genotipos *babaA2* en cepas *H. pylori*, en el presente estudio se observó una frecuencia de 52.5% (117, 118).

En el estudio la caracterización molecular de *H. pylori* presenta un significado clínico importante, pero su heterogeneidad sugiere que se pueda subestimar la relación con los estados clínicos preneoplásicos dada la coinfección con variantes genéticas de riesgo. Se observó que el genotipo múltiple EPIYA-ABC/ABCC presentó un riesgo de 1.56 veces de asociarse al diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica (IC95%: 1.02 a 2.41; $p < 0.05$), pero el hallazgo perdió significancia estadística al ajustarse

por las variables epidemiológicas sexo y edad (RPa: 1.31; IC95%: 0.84 a 2.03, $p>0.05$). En relación con la caracterización molecular de los subtipos *vacAs1* de la citotoxina vacuolizante A, se observó que el genotipo múltiple *vacAs1a/s1b* presenta un efecto protector en el desarrollo de metaplasia intestinal entre pacientes con dispepsia que presentan la infección por *H. pylori* (RPa: 0.35; IC95%: 0.17 a 0.77; $p<0.05$). Es de considerar que el estadio clínico de los pacientes infectados puede ser multifactorial dependiendo del genotipo de virulencia del patógeno, la susceptibilidad genética del huésped, la capacidad de respuesta del sistema inmunológico del huésped y factores ambientales (18, 119). Lo que sugiere, la necesidad de una evaluación más extensa del conjunto de factores involucrados en la infección por *H. pylori* y su relación con los estadios clínicos premalignos o malignos del tejido epitelial gástrico.

Es importante continuar investigando la relación patógeno – hospedero y su impacto sobre el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Los estudios de relación patógeno – hospedero se favorecen con la disposición de muestras clínicas provenientes de Biobancos, que contribuyen al establecer relaciones de interés clínico o asistencial con la investigación básica. Sin embargo, la criopreservación de muestras de alta calidad puede verse afectada a lo largo tiempo, cuando se desea sostener la viabilidad de microorganismos de difícil cultivo o con cualidades de transformación a células viables no cultivables (4, 120). En este estudio se observó que el 14.1% de las muestras clínicas entre los casos elegibles presentó una falta de reactivación. Se conoce que el cultivo de *H. pylori* bajo condiciones estandarizadas requiere de una concentración de inóculo de entre 1×10^7 a 1×10^8 UFC/ml y que tiempos prolongados de criopreservación pueden reducir

concentraciones de 1×10^9 UFC/ml a 1×10^5 UFC/ml, lo que afecta la reactivación de cepas aisladas hasta en 21.4% (121-123).

En la investigación, el diseño transversal y la presencia de genotipos de riesgo observada entre los casos con gastritis crónica no atrófica; además, de los riesgos multifactoriales relacionados con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico impiden la generalización de resultados. Se sugiere que en futuros estudios se aborde una descripción histopatológica armonizada de los casos, de preferencia mediada por el sistema operativo de evaluación de gastritis (OLGA) y el enlace operativo de evaluación de metaplasia intestinal gástrica (OLGIM) lo que facilitaría una adecuada agrupación de los casos según el nivel de afección histológica de atrofia o metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica (124, 125). Además, en similitud a este estudio, el método microbiológico de barrido para el aislamiento de *H. Pylori* a partir de biopsias gástricas es adecuado para disponer de una mayor densidad de aislamiento clínico, pero debe ser comparado frente al método de cultivo de selección de colonias individuales, lo que facilitaría una caracterización genotípica que minimice la presencia de genotipos múltiples (99, 126).

En conclusión, los hallazgos observados en el estudio manifiestan que las cepas de *H. pylori* circulantes en nuestro medio presentan una alta frecuencia de variantes genéticas documentadas como variantes de riesgo en el desarrollo de lesiones severas asociadas con malignidad gástrica. Destacando que en pacientes peruanos con dispepsia que presentan la infección por *H. pylori* la presencia de polimorfismos de riesgo para los genes *cagA* y *vacA* se relacionan con el estadio clínico de lesión preneoplásica de tipo metaplasia intestinal.

V. INVESTIGACIÓN 2

Detección de variantes genéticas de virulencia basados en secuenciación de última generación y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos

Jesus Guzman^{1,2,5}, Pablo Tsukayama³, Alejandro Bussalleu¹, Michel Sauvain^{1,2,4},

Andrés G. Lescano⁵

¹Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori*, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

²Laboratorio Mixto Internacional de Química de la Vida, Institut de Recherche Pour le Développement (IRD), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³Laboratorio de Microbiología Genómica, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

⁴UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, Toulouse, Francia.

⁵Facultad de Salud Pública y Administración, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Título corto: Filogenia, viruloma y resistoma en *H. pylori*.

Agradecimientos. Un agradecimiento especial al equipo de investigación del Laboratorio Centinela de *Helicobacter pylori*, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt por el procesamiento y recolección de la información primaria de la cohorte de casos con infección por *H. pylori* y al personal del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional Cayetano Heredia por su participación

en el reclutamiento de los casos y obtención de las muestras biológicas empleadas en el estudio.

Financiamiento. Luis Jesús Junior Guzmán Velásquez es estudiante del programa de Doctorado en Ciencias en Investigación Epidemiológicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT/PROCIENCIA, número de beca: EF033-235-2015). Este estudio recibió además financiamiento parcial por el Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América (números de becas D43TW001140 y D43TW007393).

5.1. Resumen

H. pylori es un patógeno bacteriano que afecta a ~50% de la población global y subyace a enfermedad ulcerativa gastroduodenal y cáncer gástrico. El objetivo del estudio fue explorar la presencia de la variante genética de riesgo EPIYA-ABCC/*vacAslamIldI* detectada mediante técnicas de secuenciación de última generación en cepas aisladas de *H. pylori* y su relación con la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada en pacientes peruanos con dispepsia, además de describir las características filogénicas, el viruloma y el resistoma de las cepas de *H. pylori*. Se observó que el genotipo EPIYA-ABCC/*vacAslamIldI* estuvo presente en el 12.2% de los genomas completos secuenciados y en el 83.3% de los casos con metaplasia intestinal. Se observó que la prevalencia de la variante genética de virulencia fue 77% mayor en pacientes con metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica, el hallazgo fue significativo

(RPa: 1.77; IC95%: 1.13 a 2.77; $p < 0.05$). Se observó que los genes de adhesinas *babB/hopT* (RPa: 1.19; IC95%: 0.70 a 2.04), *hopZ* (RPa: 1.49; IC95%: 0.87 a 2.56) y *sabB/hopO* (RPa: 1.41; IC95%: 0.91 a 2.17) fueron prevalentes entre los casos con metaplasia intestinal, pero la evidencia no fue estadísticamente significativa. También hubo evidencia significativa que la prevalencia de aislados de *H. pylori* resistentes a macrólidos fue 92% mayor en pacientes con metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica (RPa: 1.92; IC95%: 1.24 a 3.11; $p < 0.05$). La presencia de variantes genéticas de virulencia basados en el gen *cagA* y el *vacA* como el genotipo EPIYA-ABCC/*vacAslamliidl* es predominante entre casos con metaplasia intestinal y es un factor de riesgo de desarrollo de lesión severa sobre el epitelio gástrico.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, Resistoma, Viruloma, Genoma completo, neoplasias gástricas. (DeCS/BIREME)

5.2. Abstract

H. pylori is a bacterial pathogen that affects ~50% of the global population and underlies gastroduodenal ulcerative disease and gastric cancer. The aim of the study was to explore the presence of the EPIYA-ABCC/*vacAslamliidl* risk genetic variant in *H. pylori* isolates and its relationship with the precancerous lesion intestinal metaplasia observed in Peruvian patients with dyspepsia, as well as to describe the phylogenetic characteristics, virulome and resistome of *H. pylori* strains. It was observed that the EPIYA-ABCC/*vacAslamliidl* genotype was present in 12.2% of the complete genomes sequenced and in 83.3% of the cases with intestinal metaplasia. The prevalence of the virulence gene variant was 77% higher in patients

with intestinal metaplasia than in cases with chronic non-atrophic gastritis, the finding was significant (PRa: 1.77; 95%CI: 1.13 to 2.77; $p<0.05$). The adhesin genes *babB/hopT* (PRa: 1.19; 95% CI: 0.70 to 2.04), *hopZ* (PRa: 1.49; 95% CI: 0.87 to 2.56) and *sabB/hopO* (PRa:1.41; 95% CI: 0.91 to 2.17) were prevalent among cases with intestinal metaplasia, but the evidence was not statistically significant. There was also significant evidence that the prevalence of macrolide-resistant *H. pylori* isolates was 96% higher in patients with intestinal metaplasia compared to cases with chronic non-atrophic gastritis (PRa: 1.92; 95%CI: 1.24 to 3.11; $p<0.05$). The presence of genetic virulence variants based on the *cagA* and *vacA* gene such as the EPIYA-ABCC/*vacAslamIldI* genotype is predominant among cases with intestinal metaplasia and is a risk factor for the development of severe injury to the gastric epithelium.

Key words: *Helicobacter pylori*, Resistome, Virulome, Whole genome, Gastric cancer. (MeSH/NLM)

5.3. Introducción

H. pylori es un patógeno bacteriano microaerófilo gram negativo que coloniza y persiste en el epitelio gástrico humano. La infección por *H. pylori* afecta a ~50% de la población global y subyace a enfermedad ulcerativa gastroduodenal y cáncer gástrico (127, 128). El riesgo de adenocarcinoma atribuible a la infección por *H. pylori* es ~85.9% (10, 76) y en Perú, según Custodio et al, el 89.6% de los casos diagnosticados con cáncer de tejidos estomacales registrados en el INEN presentan la infección por *H. pylori* (77, 78). El desarrollo de lesiones severas sobre el epitelio gástrico entre los casos con infección por *H. pylori* se relaciona con la presencia de factores moleculares de virulencia en el patógeno y la magnitud de las lesiones preneoplásicas se asocia con las diferencias polimórficas de los factores de virulencia entre las cepas de *H. pylori* (12, 129).

Varios factores de virulencia de *H. pylori*, como *cagA*, *vacA*, *oipA*, *babA*, *hopQ* y *sabA* han demostrado ser predictores de atrofia gástrica, metaplasia intestinal y resultados clínicos graves como adenocarcinoma gástrico, pero es importante destacar que los factores de virulencia están relacionados entre sí y la presencia conjunta de polimorfismos de riesgo de cada gen de virulencia distingue variantes genéticas de virulencia específicas del patógeno *H. pylori* (130, 131). En la actualidad, las tecnologías de secuenciación de última generación (NGS) y el estudio de genomas completos de patógenos son una poderosa herramienta para caracterizar la patogenicidad de *H. pylori* (132, 133). Comparado a las estrategias convencionales de detección dirigida de variantes genéticas, las tecnologías basadas en NGS incrementan el poder de descubrimiento bajo un enfoque que no requiere el conocimiento previo de la información de la secuencia de interés lo que facilita

un mayor sensibilidad en la identificación de variantes genéticas del patógeno (134-137).

En Perú, los estudios basados en NGS de genomas de completos del patógeno *H. pylori* han facilitado distinguir los rasgos migratorios de nuestra población y la comparación de genomas de regiones cultural y geográficamente distintas, provenientes de las comunidades Asháninkas y Shimaá en la Amazonia, de los andes en Puno y mestizas en Lima, demuestran un predominio de poblaciones bacterianas con una mayor presencia de elementos relacionados a genes de virulencia y patogenicidad (22, 24, 25). Lo que sugiere que los aislados provenientes de la región costa en Lima, Perú presentarían variantes genéticas de *H. pylori* poblacional y microbiológicamente diferenciadas. El objetivo del estudio fue explorar la presencia de la variante genética de riesgo EPIYA-ABCC/*vacAslamIldI* detectada mediante técnicas de secuenciación de última generación en cepas aisladas de *H. pylori* y su relación con la lesión precancerosa metaplasia intestinal observada en pacientes peruanos con dispepsia, además de describir las características filogénicas, el viruloma y el resistoma de los genomas completos de las cepas aisladas de *H. pylori*.

5.4. Material y métodos

5.4.1. Diseño, población y criterios de inclusión

El diseño de estudio fue de tipo exploratorio y utilizó los registros de pacientes adultos con dispepsia referidos para endoscopia en el servicio de gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia en la ciudad de Lima, Perú que presentaron la

infección por *H. pylori*, y también se empleó las muestras de cepas aisladas criopreservadas del patógeno provenientes del biobanco del Laboratorio de *Helicobacter pylori* del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, colectados en un estudio de prevalencia durante el período 2016 y 2017. Las cepas fueron aisladas a partir de biopsias gástricas por los investigadores del estudio madre y se empleó el protocolo Maastricht (52), donde cada aislado correspondió a un paciente diferente. El estudio de prevalencia no evaluó las características filogénicas, moleculares de virulencia y de resistencia antimicrobiana, por lo cual, los resultados en la investigación 2 corresponden a una descripción basal de las características genómicas de aislados de *H. pylori*. En la investigación 1, se describe el flujo de selección de casos con dispepsia e infección por *H. pylori* elegibles (Figura 1). En la investigación 2, los aislados clínicos fueron seleccionados a partir de las cepas caracterizadas de forma molecular en la primera investigación. Se seleccionaron 58 cepas de *H. pylori* tipificadas de forma convencional para sus factores moleculares de virulencia y que se encontraban depositadas en el biobanco del Laboratorio de *Helicobacter pylori* del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. Se realizó un muestreo por conveniencia que consideró 1) los casos con infección por *H. pylori* que presentaron diagnóstico positivo por histopatología, confirmados mediante cultivo microbiológico y que dispongan de aislado criopreservado, 2) que presenten reporte de hallazgos histopatológicos para lesión gástrica tipo gastritis crónica no atrófica o lesión gástrica tipo metaplasia intestinal, y 3) que en el reporte de caracterización molecular desarrollada en la investigación 1 no hayan presentado un patrón genotípico de co-infección. Además, durante el proceso de obtención de

lecturas y ensamblajes de genomas completos del patógeno *H. pylori*, se excluyó a los casos con aislamientos que presentaron baja calidad de lecturas obtenidas por secuenciación o baja calidad de genomas completos ensamblados. En la Figura 2 se detalla el flujograma de casos con dispepsia e infección por *H. pylori* elegibles para el estudio.

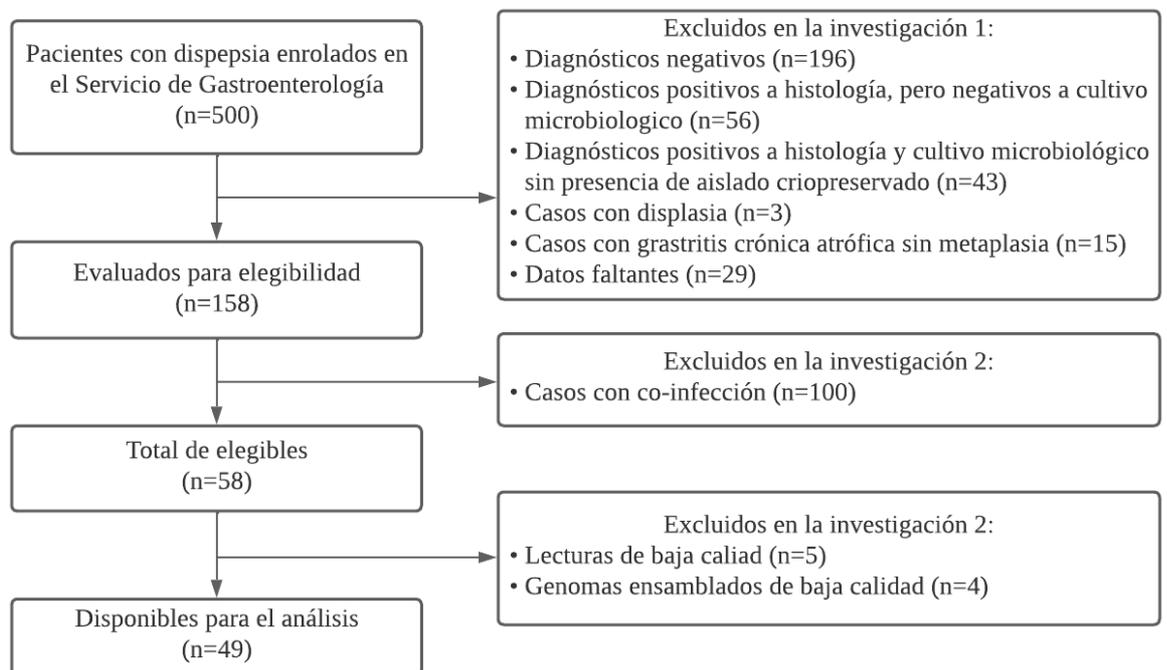


Figura 2. Flujograma de casos con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* elegibles en la investigación 2.

5.4.2. Consideraciones éticas

La investigación fue registrada en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) – Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) con código 201182, y fue evaluado

y aprobado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución con número de constancia 059-03-20. Durante la implementación del estudio se respetaron los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y por el CIE-UPCH.

5.4.3. Procedimientos de estudio

5.4.3.1. Reactivación de cepas aisladas de *Helicobacter pylori*

Identificados los aislados a partir de los casos elegibles para el estudio, de forma independiente, se tomó una alícuota de 200 μ l de cada aislado criopreservado y fue colocada en placas de cultivo que contenían agar BHI (BD, Alemania) suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero, y un sistema de cribado microbiológico basado en anfotericina B (Sigma-Aldrich, E.E.U.U.) y suplemento selectivo Skirrow (Oxoid, Reino Unido) y, suplemento nutricional Isovitalex (BD, Alemania) para facilitar el crecimiento de cepas *H. pylori*. Las placas de cultivo fueron incubadas bajo condiciones de microaerobiosis donde se empleó un sistema de mezcla de gases (10% de CO₂, 5% de O₂ y 85% de N₂) (Praxair, Perú) a 37°C durante 4 a 7 días. Empleando los estándares para la identificación del microorganismo *H. pylori*, se procedió a cosechar las colonias considerando sus características de cultivo, tinción Gram y características bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa positivo) (97, 138).

5.4.3.2.Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de las cepas aisladas de *H. pylori* se obtuvo mediante el kit de purificación GeneJET Genomic DNA (ThermoFisher, E.E.U.U) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN genómico purificado se realizó mediante un sistema de espectroscopia de fluorescencia Qubit empleando el kit para productos que contienen alta concentración de ADN The Broad Range (BR) (Invitrogen, E.E.U.U). Se prepararon alícuotas de ADN genómico a concentración de 0.2ng/μl que fueron procesadas empleando el kit para tagmentación Nextera XT Sample Prep (Illumina, E.E.U.U). Luego, en el ADN tagmentado se agregaron index primers seguido de amplificación mediante PCR a fin de elaborar genotecas de ADN. Previo a la secuenciación se realizó un control de calidad de las genotecas de ADN empleando el kit The High Sensitivity (HS) (Illumina, E.E.U.U), luego se realizó el secuenciamiento mediante la plataforma Illumina Miseq empleando kits de secuenciación MiSeq v2 para generar lecturas de extremos emparejados con un máximo de longitud de 2x150 pb y obtener una cobertura óptima del genoma (mínimo 50X y máximo de 60X) (139).

5.4.3.3.Ensamblaje y anotación de los genomas completos de *Helicobacter pylori*

La calidad de las lecturas sin procesar fue evaluada en el programa FastQC v0.11.7 (140). Las bases de baja calidad (la calidad de las bases <Q30) y los adaptadores fueron removidos mediante la herramienta Trimmomatic v0.30 (141). Las lecturas obtenidas del trimado se ensamblaron para obtener cóntigos por medio del algoritmo SPAdes v3.13.0 (142) y la calidad del ensamblaje del genoma se evaluó

mediante la herramienta QUAST v5.0.2 (143) en el servidor en línea del Centro de vigilancia genómica de patógenos de la Universidad de Oxford – Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/>) (144), y la herramienta CheckM v1.2.2 (145). Los genomas ensamblados fueron considerados de alta calidad para valores de N50 \geq 50,000 pb, número de cóntigos \leq 400, y condiciones de integridad \geq 90% y de contaminación $<$ 5% (Tabla 5). Todos los genomas secuenciados en este proyecto se depositarán en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Los ensamblados fueron anotados por medio la herramienta en línea PROKKA v1.14.0 y se empleó la cepa de referencia *H. pylori* 26695 (146).

Tabla 5. Características de calidad de los genomas completos de *H. pylori* secuenciados y analizados en este estudio.

ID del genoma	CDS	Tamaño (pb)	GC (%)	Cóntigos (n)	N50	Integridad (%)	Contaminación (%)
PER UPCH-1	1560	164571	38.9	33	192614	99.7	0.2
PER UPCH-2	1636	1700203	38.9	101	73047	98.3	3.2
PER UPCH-3	1554	1642367	38.8	36	103157	99.7	0.2
PER UPCH-4	1530	1626587	39.1	28	164354	99.7	0.0
PER UPCH-5	1551	1630706	39	40	104339	99.7	0.0
PER UPCH-6	1585	1669116	38.9	42	120739	99.7	0.0
PER UPCH-7	1540	1632317	39	30	99726	99.7	0.0
PER UPCH-8	1605	1668402	39.2	103	53759	99.9	4.5
PER UPCH-9	1610	1683343	38.8	63	90130	99.6	0.0
PER UPCH-10	1571	1653744	38.9	66	72754	96.5	0.5
PER UPCH-11	1661	1728388	38.7	90	113014	99.7	1.1
PER UPCH-12	1565	1660796	39	34	110974	99.8	0.0

PER UPCH-13	1519	1624953	38.9	32	100957	99.7	0.0
PER UPCH-14	1566	1649695	38.9	43	135340	99.7	0.0
PER UPCH-15	1519	1620716	39	45	96415	98.7	0.0
PER UPCH-16	1578	1672650	39	32	101136	99.7	0.0
PER UPCH-17	1610	1693775	39	63	83850	99.7	2.2
PER UPCH-18	1588	1683707	38.8	54	78662	97.1	0.0
PER UPCH-20	1564	1657635	38.8	31	162942	99.7	0.7
PER UPCH-21	1548	1626494	39	47	78649	99.7	0.0
PER UPCH-23	1580	1679300	38.8	43	101138	99.9	1.1
PER UPCH-26	1564	1654795	38.9	47	95314	100.0	0.0
PER UPCH-27	1591	1674356	38.7	47	66252	99.7	0.0
PER UPCH-28	1568	1632268	38.8	29	146618	99.7	0.0
PER UPCH-29	1554	1647980	38.9	55	61033	99.6	0.0
PER UPCH-30	1649	1707787	38.8	115	54618	99.7	4.8
PER UPCH-31	1568	1624023	39	44	81804	99.7	0.0
PER UPCH-32	1601	1676219	38.7	46	93257	99.7	0.0
PER UPCH-33	1564	1648044	38.9	55	87597	99.7	0.7
PER UPCH-34	1597	1685924	38.8	42	100917	99.7	0.2
PER UPCH-35	1597	1675121	38.7	40	96266	99.7	0.0
PER UPCH-36	1542	1638644	38.9	43	101020	99.9	0.0
PER UPCH-37	1569	1621739	39	66	54538	98.4	0.4
PER UPCH-38	1725	1772197	39.5	106	99438	99.7	1.6
PER UPCH-39	1565	1628434	39.2	55	73583	99.8	0.0
PER UPCH-40	1510	1612291	39	27	266348	99.7	0.0
PER UPCH-41	1594	1665151	38.7	37	121788	99.7	0.4
PER UPCH-42	1558	1665596	39	30	129298	99.9	0.0
PER UPCH-43	1585	1677075	39	56	63204	98.7	0.4
PER UPCH-44	1598	1693597	38.8	45	116609	99.6	0.0
PER UPCH-45	1529	1627722	38.9	34	121460	99.7	0.0
PER UPCH-46	1541	1626883	38.9	27	109810	99.9	0.0
PER UPCH-47	1528	1637954	38.9	28	102725	99.7	0.0
PER UPCH-48	1541	1638079	38.9	45	95111	99.8	0.2
PER UPCH-49	1567	1655684	38.9	40	82530	99.9	0.0
PER UPCH-50	1600	1674509	38.8	44	98684	99.7	0.0
PER UPCH-51	1566	1641444	39	51	86921	99.7	0.4

PER UPCH-52	1588	1676956	39	32	132574	99.7	0.0
PER UPCH-53	1498	1579439	39.1	33	116002	99.6	0.0

CDS: Regiones de codificación; GC %: porcentaje del contenido de guanina y citosina; N50: valor de N50.

5.4.3.4. Análisis filogenético de los genomas completos de *Helicobacter pylori*

Se construyó un árbol filogenético basado en una tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés), para ello se asignaron poblaciones según las secuencias de siete genes conservados “House Keeping” de *H. pylori* (*atpA*, *efp*, *trpC*, *ppa*, *mutY*, *yphC* y *ureI*). Para el análisis se emplearon 643 genomas de *H. pylori* previamente seleccionados según linaje poblacional y descargados de la base de datos publica PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/helicobacter-pylori>) (147), además de las secuencias de los 49 genomas disponibles en este estudio. Se preparó un script en Python a fin de extraer y concatenar las secuencias de los genes conservados y luego fueron alineadas empleando la herramienta MAFFT v.7.490 (148, 149). En adición, se generó un árbol filogenético basado en polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Para el análisis se emplearon 38 genomas peruanos de *H. pylori* descargados de PubMLST y, los 49 genomas disponibles en el estudio (25). Los árboles fueron construidos en el servidor en línea del Portal de ciberinfraestructura para la investigación filogenética (CIPRES, por sus siglas en inglés) (<https://www.phylo.org/index.php/portal/codes/>) (150), se empleó el método de máxima de verosimilitud y el modelo evolutivo General tiempo reversible (GTR, por sus siglas en inglés) con un número de repeticiones Bootstrap de 1000. En paralelo se estimó la composición del pangenoma para los 49 genomas disponibles en el estudio y se elaboró un árbol filogenético basado en

SNPs para genes ortólogos mediante la herramienta Roary (151). Finalmente, los árboles filogenéticos generados fueron editados mediante la herramienta en línea iTol v6 (152).

5.4.3.5. Determinación del viruloma y resistoma de los genomas completos de

Helicobacter pylori

Para la detección de mutaciones en los genomas completos evaluados en el estudio, se consideró los cambios genéticos a nivel de nucleótidos y a nivel de aminoácidos, de variantes genéticas de virulencia y de resistencia antibiótica. Se utilizó como plantilla la cepa de referencia *H. pylori* 26695 (GenBank: NC_000915.1) (153).

En la caracterización del viruloma, se determinó la presencia de motivos EPIYA en la región variable del gen *cagA* y se tipificó el gen *vacA* para los alelos *s1*, *s2*, *i1*, *i2*, *d1*, *d2*, *m1*, *m2* y subtipos *s1a* y *s1b*, además, de los genes de adherencia *iceA* (alelos 1 y 2) y *babA* (alelo 2) (35, 98-107). La extracción, alineamiento y análisis de las secuencias fue desarrollada en el software Geneious Prime v2023.0.3 (154). En adición, se exploró en la base de datos de factores de virulencia de bacterias patógenas (VFDB, por sus siglas en inglés) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) la frecuencia de genes que conforman la Isla de patogenicidad *cagPAI* (155-157), genes que participan en la adherencia del patógeno al epitelio (*babB/hopT*, *hpaA*, *hopZ*, *sabA/hopP*, *sabB/hopO*, *alpB/hopB* y *alpA/hopC*) (158-160) y genes asociados con modulación de la respuesta inmunológica (*napA* y *oipA/hopH*). Un gen fue presente para valores mínimos de 80% de identidad y 80% de cobertura en sus secuencias (161, 162).

En la caracterización del resistoma, se exploró para los genes de *ARNr* 23S (gen relacionado a la resistencia a macrolidos) (163), *ARNr* 16S (gen relacionado a la

resistencia a tetraciclinas) (164), *rdxA* y *frxA* (genes relacionados a la resistencia a nitroimidazoles) (165-167), cuyas secuencias fueron evaluadas mediante la herramienta MAFFT v7.490 (148, 149) y se alinearon a cada genoma mediante el algoritmo L-INS-i, para identificar los determinantes genéticos relacionados con la resistencia antibiótica. Además, se identificaron cambios en las secuencias de aminoácidos codificados por los genes *gyrA*, *gyrB* (genes relacionados a la resistencia a quinolonas) (168, 169), y los genes *pbp1A*, *pbp2*, *pbp3* y *pbp4* (genes relacionados a la resistencia a betalactámicos) (68, 69). En la relación de genotipo de resistencia antibiótica y fenotipo de lesión preneoplásica entre los casos con dispepsia e infección por *H. pylori*, se consideró las mutaciones que han demostrado de forma experimental transformaciones a fenotipos bacterianos resistentes o mutaciones relacionadas a valores altos de concentración mínima inhibitoria de antibiótico empleados de forma convencional en la terapia de infección por *H. pylori* (Tabla 6).

Tabla 6. Genes y mutaciones con evidencia experimental relacionados a resistencia antibiótica a fármacos de uso convencional en el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Antibiótico	Gen	Mutaciones ^a	Referencias
Clarithromicina	<i>ARNr 23S</i>	A2143G	(163)
		A2142G/C	
Levofloxacino	<i>gyrA</i>	N87K/I/Y	(168, 169)
		D91Y/G/N	
Metronidazol	<i>rdxA</i>	R16H/C	(165, 166, 170)
		M21A	
		Q50 codón terminal	
		E75 codón terminal	
		E133 codón terminal	
Amoxicilina	<i>pbp1A</i>	T211 codón terminal	(62, 69)
		S402N	
		S414S/N	
		T556S	
		N562Y	
		T593A/G	

^aEvento genético con evidencia experimental de transformación a fenotipos bacterianos resistentes o mutaciones relacionadas a valores altos de concentración mínima inhibitoria.

5.4.3.6. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Las variables de estudio fueron descritas mediante estadísticos de resumen. La asociación entre los tipos de lesión precancerosas de mucosa epitelial gástrica y el genotipo virulento EPIYA-ABCC/*vacAs1ml1dl1* en los aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia fue explorada de forma bivariada usando la prueba de ji-cuadrada. Además, se exploró la asociación

entre los tipos de lesión precancerosas frente a otros genotipos *de* virulencia, genes de adherencia y genes relacionados a resistencia antibiótica, en caso de incumplimiento de supuestos se empleó la prueba exacta de Fisher y se consideró un nivel de significancia $p < 0.05$. Para el análisis de genes de resistencia antibiótica se consideró aquellas mutaciones que de forma experimental han demostrado transformaciones a fenotipos resistentes. Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión bivariado y múltiple mediante una regresión de Poisson empleando un modelo lineal generalizado de familia binomial con enlace log a modo de lograr una aproximación a la distribución binomial, permitiendo el cálculo de la razón de prevalencias siendo este significativo para valores de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron desarrollados empleando el paquete estadístico Stata/SE versión 17.0.

5.5. Resultados

En la población de 49 pacientes con dispepsia que presentaron la infección por *H. pylori*, el 57.1% de los casos presentó diagnóstico histopatológico de metaplasia intestinal y se observó que la variante genética de virulencia EPIYA-ABCC/*vacAsIamIIdI* estuvo presente en el 12.2% de los genomas completos secuenciados y en el 83.3% de los casos con metaplasia intestinal. En el análisis de regresión ajustado por sexo y edad, se observó que la prevalencia de casos con diagnóstico de metaplasia intestinal que presentaron aislados de *H. pylori* con el genotipo EPIYA- ABCC/*vacAsIamIIdI* es 1.77 veces respecto a aquellos casos con hallazgo histopatológico de gastritis crónica no atrófica ($p > 0.05$). Este resultado fue similar en el análisis de regresión bivariado (RP: 1.55; IC95%: 0.99 a 2.45; $p > 0.05$) (Tabla 7) (Tabla 8) (Tabla 9).

Tabla 7. Características del viruloma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Características del viruloma	N (%)
Sexo	
Mujer	33 (67.4)
Hombre	16 (32.6)
Edad	
<35 años	4 (8.2)
35-50 años	11 (22.5)
>50 años	34 (69.3)
Población genética	
hspAmerind	4 (8.2)
hpEurope	38 (77.6)
hpAfrica1	7 (14.2)
Motivos EPIYA	
ABC	39 (79.6)
ABCC	7 (14.3)
Delecionado	3 (6.1)
Islote de patogenicidad cagPAI ^a	
Parcialmente delecionado	21 (40.8)
Semi intacto	8 (16.3)
Intacto	20 (42.9)
Región señal de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAs2</i>	2 (4.1)
<i>vacAs1</i>	47 (95.9)
Subtipos <i>s1</i> de la región señal de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAs1b</i>	2 (4.1)
<i>vacAs1a</i>	47 (95.9)
Región media de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAm2</i>	1 (2.1)
<i>vacAm1</i>	48 (97.9)
Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A	
<i>vacAi2</i>	10 (20.4)

<i>vacAi1</i>	39 (79.6)
<i>Delección de la región intermedia de la citotoxina vacuolizante A</i>	
<i>vacAd2</i>	2 (4.1)
<i>vacAd1</i>	47 (95.9)
<i>Genotipo vacAs1m1i1d1</i>	
Otros genotipos ^b	11 (22.5)
<i>vacAs1am1i1d1</i>	38 (77.5)
Gen inducido por contacto con el epitelio	
<i>iceA2</i>	1 (2.1)
<i>iceA1</i>	48 (97.9)
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo	
<i>babA2</i> negativo	27 (55.1)
<i>babA2</i> positivo	22 (44.9)
Gen <i>babB/hopT</i>	
Negativo	30 (61.2)
Positivo	19 (38.8)
Gen <i>hpaA</i>	
Negativo	0 (0.0)
Positivo	49 (100.0)
Gen <i>hopZ</i>	
Negativo	18 (36.7)
Positivo	31 (63.3)
Gen <i>sabA/hopP</i>	
Negativo	10 (20.4)
Positivo	39 (79.6)
Gen <i>sabB/hopO</i>	
Negativo	38 (77.6)
Positivo	11 (22.4)
Gen <i>alpB/hopB</i>	
Negativo	49 (100.0)
Positivo	0 (0.0)
Gen <i>alpA/hopC</i>	
Negativo	49 (100.0)
Positivo	0 (0.0)
Gen <i>napA</i>	

Negativo	0 (0.0)
Positivo	49 (100.0)
<i>Gen oipA/hopH</i>	
Negativo	1 (2.1)
Positivo	48 (97.9)
<i>Genotipo EPIYA-ABCC/vacAs1am1i1d1</i>	
Otros genotipos ^c	43 (87.8)
<i>EPIYA-ABCC/vacAs1am1i1d1</i>	6 (12.2)
<i>Hallazgo histopatológico</i>	
Gastritis crónica no Atrófica	21 (42.9)
Metaplasia	28 (57.1)

^aIslote de patogenicidad cagPAI: Intacto (26 genes disponibles para análisis VFDB); Semi Intacto (< 26 genes con presencia de 17 genes esenciales); Parcialmente deletado (< 26 genes con ausencia de al menos 1 gen esencial).

^bGenotipos diferentes al genotipo *vacAs1am1i1d1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *vacA*.

^cGenotipos *cagA(+)* con variantes alélicas diferentes al genotipo *EPIYA-ABCC/vacAs1am1i1d1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *cagA* o el gen *vacA*.

Tabla 8. Factores moleculares del viruloma de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Variables	Hallazgo histopatológico		<i>p</i> *
	Gastritis crónica no atrófica (N=21)	Metaplasia (N=28)	
	n (%)	n (%)	
Sexo			0.598
Mujer	15 (45.5)	18 (54.5)	
Hombre	6 (37.5)	10 (62.5)	
Edad			0.050
<35 años	2 (50)	2 (50)	
35-50 años	8 (72.7)	3 (27.3)	
>50 años	11 (32.4)	23 (67.6)	
Población genética			0.684
hspAmerind	2 (50.0)	2 (50.0)	
hpEurope	15 (39.5)	23 (60.5)	
hpAfrica1	4 (57.1)	3 (42.9)	
Motivos EPIYA			0.057**
ABC	16 (39.0)	23 (56.1)	
ABCC	2 (28.6)	5 (71.4)	
Delecionado	3 (100.0)	0 (0.0)	
Islote de patogenicidad cagPAI ^a			0.514**
Parcialmente delecionado	10 (50.0)	10 (50.0)	
Semi intacto	4 (50.0)	4 (50.0)	
Intacto	7 (33.3)	14 (66.7)	
Región señal de la citotoxina vacuolizante A			0.179**
<i>vacAs2</i>	2 (100.0)	0 (0.0)	
<i>vacAs1</i>	19 (40.4)	28 (59.6)	
Subtipos <i>s1</i> de la región señal de la citotoxina vacuolizante A			0.763**
<i>vacAs1a</i>	2 (50.0)	2 (50.0)	

<i>vacAs1b</i>	19 (42.2)	26 (57.8)	
Región media de la citotoxina vacuolizante A			0.429**
<i>vacAm2</i>	1 (100.0)	0 (0.0)	
<i>vacAm1</i>	20 (41.7)	28 (58.3)	
Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A			0.052**
<i>vacAi2</i>	7 (70.0)	3 (30.0)	
<i>vacAi1</i>	14 (35.9)	25 (64.1)	
Delección de la región intermedia de la citotoxina vacuolizante A			0.179**
<i>vacAd2</i>	2 (100.0)	0 (0.0)	
<i>vacAd1</i>	19 (40.4)	28 (59.6)	
Genotipo <i>vacAs1mli1d1</i>			0.114
Otros genotipos ^b	7 (63.6)	4 (36.4)	
<i>vacAs1mli1d1</i>	14 (36.8)	24 (63.2)	
Gen inducido por contacto con el epitelio			0.382**
<i>iceA2</i>	0 (0.0)	1 (100.0)	
<i>iceA1</i>	21 (43.8)	27 (56.2)	
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo			0.740
<i>babA2</i> negativo	11 (40.7)	16 (59.3)	
<i>babA2</i> positivo	10 (45.5)	12 (54.5)	
Gen <i>babB/hopT</i>			0.498
Negativo	14 (46.7)	16 (53.3)	
Positivo	7 (36.8)	12 (63.2)	
Gen <i>hopA</i>			N.D
Negativo	0 (0.0)	0 (0.0)	
Positivo	21 (42.9)	28 (57.1)	
Gen <i>hopZ</i>			0.171
Negativo	10 (55.6)	8 (44.4)	
Positivo	11 (35.5)	20 (64.5)	
Gen <i>sabA/hopP</i>			0.838
Negativo	4 (40.0)	6 (60.0)	
Positivo	17 (43.6)	22 (56.4)	
Gen <i>sabB/hopO</i>			0.236
Negativo	18 (47.4)	20 (52.6)	
Positivo	3 (27.3)	8 (72.7)	

Gen <i>alpB/hopB</i>			N.D
Negativo	21 (42.9)	28 (57.1)	
Positivo	0 (0.0)	0 (0.0)	
Gen <i>alpA/hopC</i>			N.D
Negativo	21 (42.9)	28 (57.1)	
Positivo	0 (0.0)	0 (0.0)	
Gen <i>napA</i>			N.D
Negativo	0 (0.0)	0 (0.0)	
Positivo	21 (42.9)	28 (57.1)	
Gen <i>oipA/hopH</i>			0.429**
Negativo	1 (100.0)	0 (0.0)	
Positivo	20 (41.7)	28 (58.3)	
Genotipo EPIYA-ABCC/ <i>vacAs1am1i1d1</i>			0.219**
Otros genotipos ^b	20 (46.5)	23 (53.5)	
EPIYA-ABCC/ <i>vacAs1am1i1d1</i>	1 (16.7)	5 (83.3)	

^aIslote de patogenicidad *cagPAI*: Intacto (26 genes disponibles para análisis VFDB); Semi Intacto (< 26 genes con presencia de 17 genes esenciales); Parcialmente delecionado (< 26 genes con ausencia de al menos 1 gen esencial).

^bGenotipos diferentes al genotipo *vacAs1am1i1d1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *vacA*.

^cGenotipos *cagA*(+) con variantes alélicas diferentes al genotipo EPIYA_ABCC/*vacAs1am1i1d1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *cagA* o el gen *vacA*.

*Prueba estadística de ji-cuadrada; ** Prueba exacta de Fisher.

Tabla 9. Factores moleculares del viruloma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Características	Análisis bivariado			Regresión múltiple		
	RP	IC 95%	<i>p</i>	RP _a	IC 95%	<i>p</i>
Población genética						
hspAmerind	Ref.			Ref.		
hpEurope	1.21	0.43 – 3.37	0.712	1.15	0.43 – 3.13	0.773
hpAfrica1	0.86	0.23 – 3.19	0.816	0.86	0.24 – 3.03	0.812
Motivos EPIYA						
ABC	Ref.			Ref.		
ABCC	1.21	0.70 – 2.08	0.489	1.35	0.82 – 2.21	0.232
Delecionado	-	-	-	-	-	-
Islote de patogenicidad cagPAI^a						
Parcialmente delecionado	Ref.			Ref.		
Semi intacto	1.00	0.44 – 2.29	1.000	1.15	0.49 – 2.70	0.738
Intacto	1.33	0.78 – 2.28	0.290	1.32	0.79 – 2.22	0.285
Subtipos <i>sI</i> de la región señal de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAs1b</i>	Ref.			Ref.		
<i>vacAs1a</i>	1.16	0.42 – 3.18	0.779	1.05	0.36 – 3.05	0.925
Región intermedia de la citotoxina vacuolizante A						
<i>vacAi2</i>	Ref.			Ref.	-	-
<i>vacAi1</i>	2.14	0.81 – 5.73	0.127	2.01	0.76 – 5.34	0.165
Genotipo <i>vacAs1mI1d1</i>						
Otros genotipos ^b	Ref.			Ref.		
<i>vacAs1mI1d1</i>	1.74	0.76 – 3.97	0.191	1.65	0.73 – 3.72	0.225
Gen inducido por contacto con el epitelio						
<i>iceA2</i>	Ref.			Ref.	-	-

<i>iceA1</i>	0.56	0.44 – 0.73	0.001	0.67	0.45 – 0.99	0.046
Adhesina fijadora de antígenos del grupo sanguíneo						
<i>babA2</i> negativo	Ref.			Ref.		
<i>babA2</i> positivo	0.92	0.56 – 1.51	0.744	0.95	0.57 – 1.60	0.856
Gen <i>babB/hopT</i>						
Negativo	Ref.			Ref.		
Positivo	1.18	0.73 – 1.92	0.494	1.19	0.70 – 2.04	0.507
Gen <i>hopZ</i>						
Negativo	Ref.			Ref.		
Positivo	1.45	0.81 – 2.60	0.212	1.49	0.87 – 2.56	0.148
Gen <i>sabA/hopP</i>						
Negativo	Ref.			-	-	-
Positivo	0.94	0.53 – 1.68	0.836	0.97	0.56 – 1.66	0.904
Gen <i>sabB/hopO</i>						
Negativo	Ref.			Ref.		
Positivo	1.38	0.86 – 2.23	0.183	1.41	0.91 – 2.17	0.122
Genotipo EPIYA-ABCC/ <i>vacAs1aml1idl1</i>						
Otros genotipos ^c	Ref.			Ref.		
EPIYA-ABCC/ <i>vacAs1aml1idl1</i>	1.55	0.99 – 2.45	0.055	1.77	1.13 – 2.77	0.012

RP: razón de prevalencia; RPa: razón de prevalencia ajustada por sexo y edad; IC95%: Intervalo de confianza al 95%.

^aIslote de patogenicidad *cagPAI*: Intacto (26 genes disponibles para análisis VFDB); Semi Intacto (< 26 genes con presencia de 17 genes esenciales); Parcialmente deletado (< 26 genes con ausencia de al menos 1 gen esencial).

^bGenotipos diferentes al genotipo *vacAs1aml1idl1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *vacA*.

^cGenotipos *cagA*(+) con variantes alélicas diferentes al genotipo EPIYA-ABCC/*vacAs1aml1idl1* o con múltiples variantes alélicas para el gen *cagA* o el gen *vacA*.

El análisis filogenético de los genomas completos de los aislados de *H. pylori*, mostró que el 8.2% de los aislados corresponde a la subpoblación genética

hspAmerind y que el 77.6% presenta linaje hpEurope. También se observaron aislados correspondientes a la población hpAfrica1 en un 14.2% (Tabla 7) (Figura 3). Se observó que en aislados provenientes de la amazonia peruana aún se distingue la subpoblación hspAmerind, que en relación con aislados de la costa de Perú, en Lima existe una predominancia de cepas hpEurope (Figura 4).



Figura 3. Árbol filogenético basado en MLST de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* provenientes de pacientes peruanos con dispepsia y 643 genomas de otras poblaciones filogenéticas.

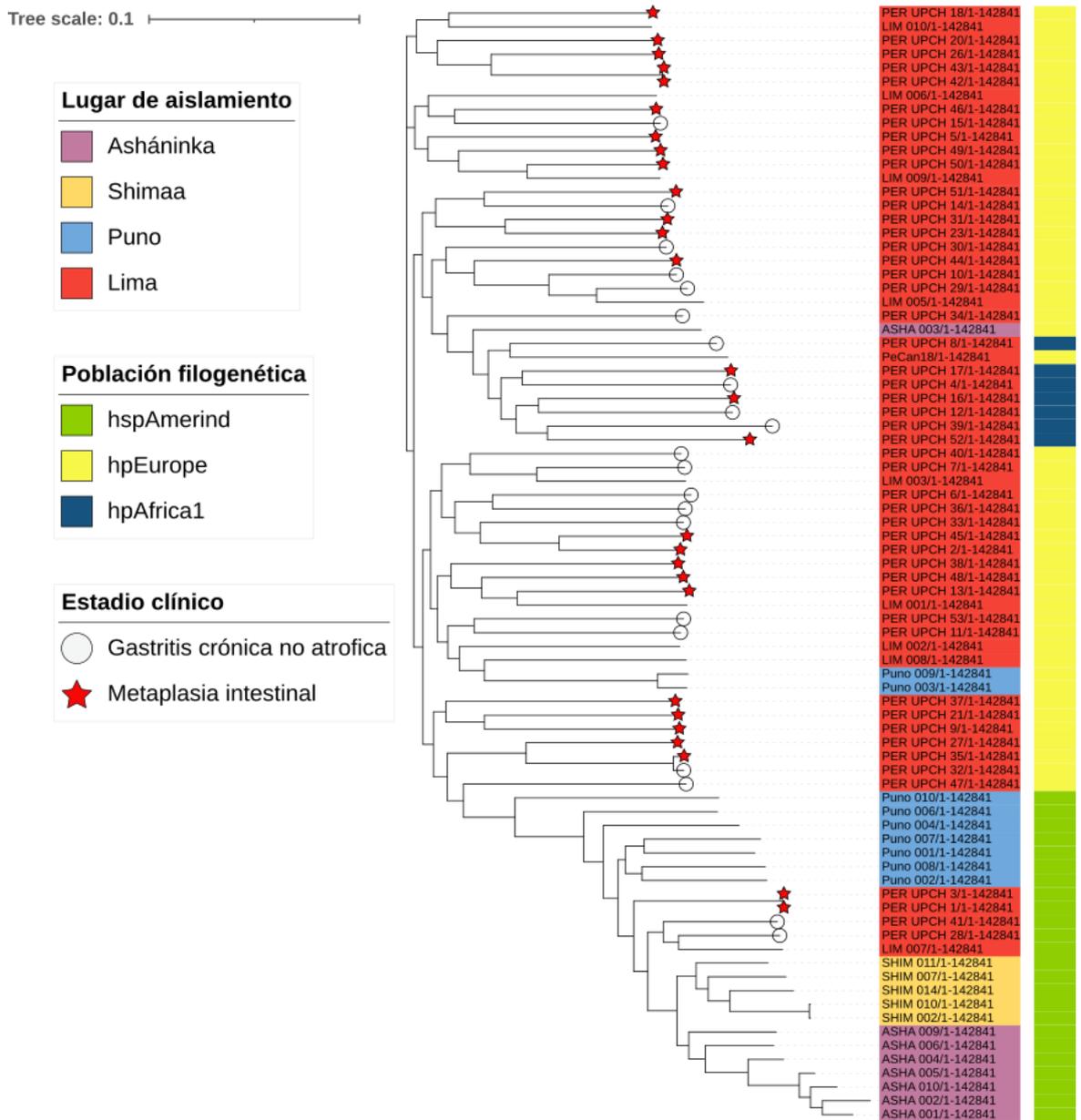


Figura 4. Árbol filogenético basado en SNP de los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos y 32 genomas peruanos.

Los hallazgos moleculares del viruloma de los genomas completos de *H. pylori* evidenciaron que la totalidad de cepas presentó el gen *cagA* y que el 14.3% de los genomas mostró duplicidad del motivo EPIYA-C para un genotipo ABCC. En la región variable del gen *cagA* el genotipo ABC fue el de mayor frecuencia (79.6%) y el 42.9% de los genomas presentó un islote de patogenicidad *cagPAI* intacto (Tabla 7) (Tabla 10). Con relación al gen de la citotoxina vacuolizante A, se observó que el alelo 1 de la región señal y el subtipo *vacAs1a* presentaron una mayor frecuencia (95.9%). Los hallazgos en la región media, intermedia y la delección de la región intermedia del gen *vacA* mostraron una alta frecuencia para los genotipos *vacAm1* (97.9%), *vacAi1* (79.6%) y *vacAd1* (95.9%). También se tipificó para genes relacionados con la adherencia y observó que el 97.9% presentó el alelo 1 para el gen *iceA* y que el 44.9% de los aislados fue positivo al alelo 2 del gen *babA*. Se observó una menor frecuencia para los genes *babB/hopT* (38.8%), *hopZ* (63.3%), *sabB/hopP* (79.6%) y *oipA/hopH* (97.9%) (Figura 5). Además, el pangenoma para los genomas peruanos analizados en el estudio estuvo conformado de 7000 genes, lo que se dividieron en 903 genes pertenecientes al genoma central, 119 genes al soft, 830 al shell y 5148 conformaron los genes accesorios (Figura 6).

Tabla 10. Características de los genes componentes y estructura del Islote de patogenicidad *cagPAI* en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Características de <i>cagPAI</i>	N (%)
Gen <i>cag1</i>	46 (93.9)
Gen <i>cag2</i>	32 (65.3)
Gen <i>cag3</i>	44 (89.8)
Gen <i>virB1/cag4</i>	46 (93.9)
Gen <i>virD4cag5</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB2/cagC</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagD</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB4/cagE</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagF</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagG</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagH</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagI</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB5/cagL</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagM</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagN</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagP</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagQ</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagS</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB7/cagT</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagU</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB8/cagV</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB6/cagW</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB9/cagX</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB10/cagY</i>	30 (61.2)
Gen <i>cagZ</i>	46 (93.9)
Gen <i>virB11</i>	46 (93.9)
Gen <i>cagA</i>	46 (93.9)

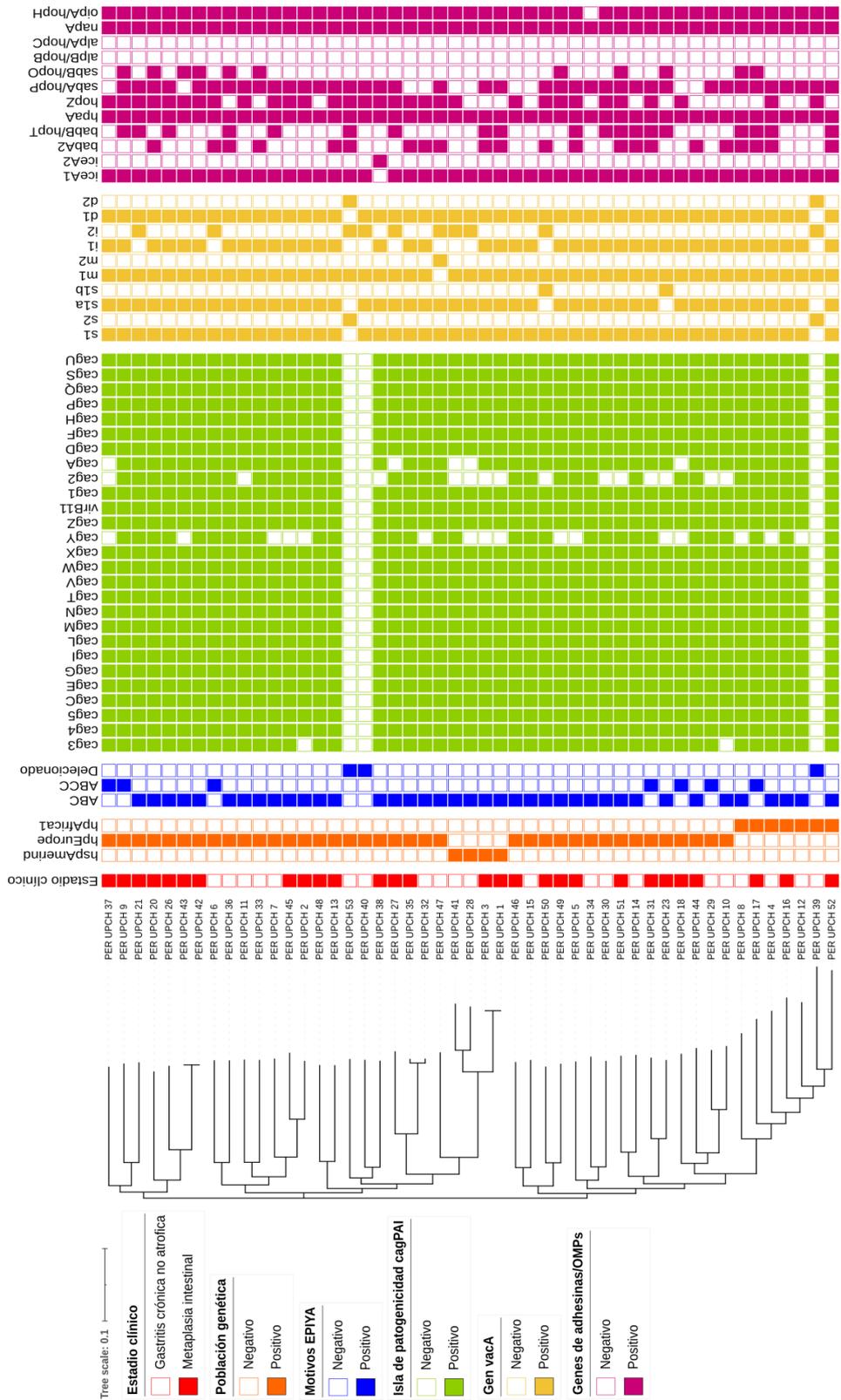


Figura 5. Características del viruloma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

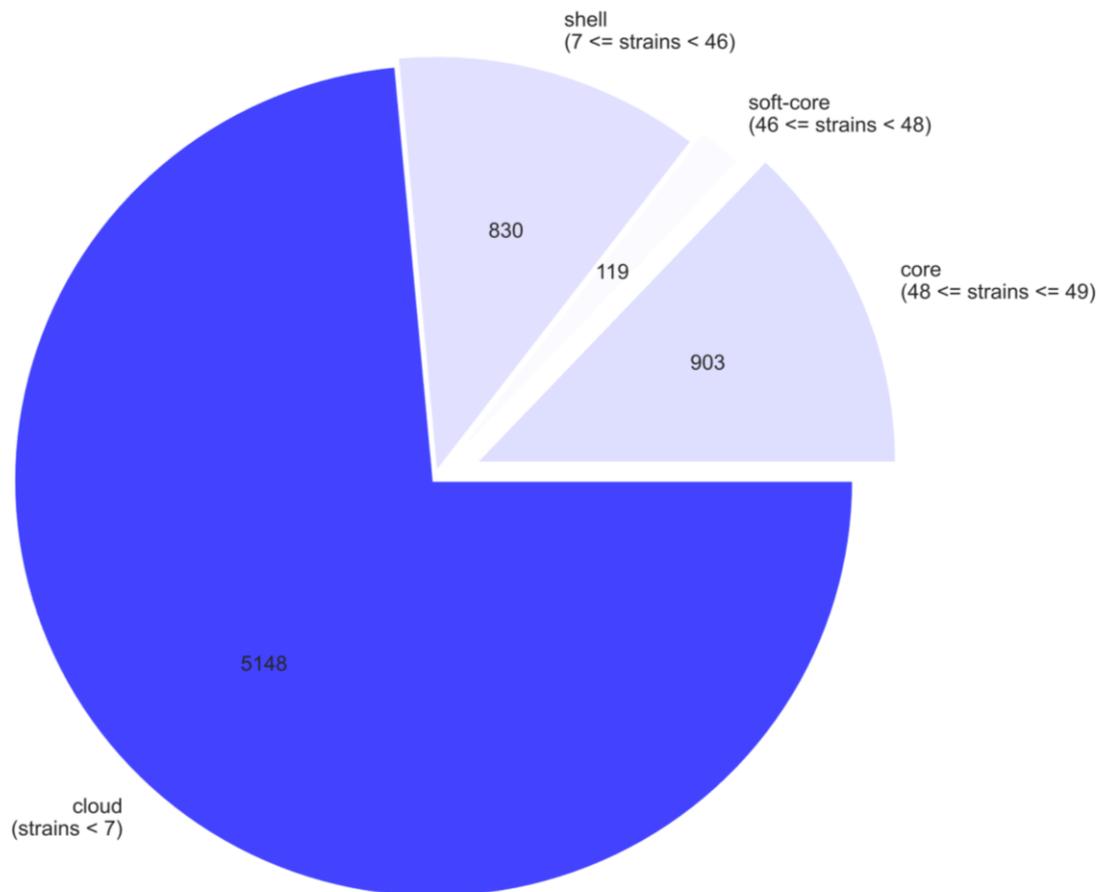


Figura 6. Características del pangenoma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* provenientes de pacientes peruanos con dispepsia.

En el análisis de resistoma se observó que las mutaciones relacionadas con la resistencia antibiótica a macrólidos correspondieron a transiciones A2142G (14.3%) y A2143G (16.3%) presentes en el gen de *ARNr 23S*. En relación con la resistencia antibiótica a quinolonas, se observó que las sustituciones N87I (22.5%) y D91G (18.4%) estuvieron presentes en el gen *gyrA*. También se analizaron las mutaciones relacionadas a nitroimidazoles presentes en el gen de *rdxA*, se observó una mayor frecuencia para las sustituciones R16H (8.2%) y R16C (6.1%). La transversión T593A (26.5%) fue el hallazgo de mayor frecuencia en el gen de proteína de unión a penicilina 1, mutación relacionada con la resistencia a betalactámicos. En la población de estudio se observó que la frecuencia de resistencia antibiótica a macrolidos, quinolonas, nitroimidazoles y betalactámicos fue 30.6%, 69.4%, 24.5% y 30.6% respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Características de las mutaciones con evidencia experimental relacionada a resistencia antibiótica en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Características del resistoma	N (%)
Mutaciones en el gen de <i>ARNr 23S</i>	
A2142G	
Tipo nativo	42 (85.7)
Mutado	7 (14.3)
A2143G	
Tipo nativo	41 (83.7)
Mutado	8 (16.3)
Mutaciones en el gen de <i>gyrA</i>	
N87K	

Tipo nativo	42 (85.7)
Mutado	7 (14.3)
N87I	
Tipo nativo	38 (77.5)
Mutado	11 (22.5)
D91G	
Tipo nativo	40 (81.6)
Mutado	9 (18.4)
D91N	
Tipo nativo	43 (87.8)
Mutado	6 (12.2)
D91Y	
Tipo nativo	46 (93.9)
Mutado	3 (6.1)
Mutaciones en el gen de <i>rdxA</i>	
R16H	
Tipo nativo	45 (91.8)
Mutado	4 (8.2)
R16C	
Tipo nativo	46 (93.9)
Mutado	5 (6.1)
Q50 codón terminal	
Tipo nativo	48 (97.9)
Mutado	1 (2.1)
E75 codón terminal	
Tipo nativo	47 (95.8)
Mutado	2 (4.2)
Mutaciones en el gen de <i>pbp1A</i>	
S414R	
Tipo nativo	48 (97.9)
Mutado	1 (2.1)
T556S	
Tipo nativo	46 (93.9)
Mutado	3 (6.1)
N562Y	

Tipo nativo	48 (97.9)
Mutado	1 (2.1)
T593A	
Tipo nativo	36 (73.5)
Mutado	13 (26.5)
T593G	
Tipo nativo	47 (95.9)
Mutado	2 (4.1)
Genotipo resistente a quinolona	
Sensible	15 (30.6)
Resistente	34 (69.4)
Genotipo resistente a nitroimidazol	
Sensible	37 (75.5)
Resistente	12 (24.5)
Genotipo resistente a betalactámico	
Sensible	34 (69.4)
Resistente	15 (30.6)
Genotipo resistente a macrólido	
Sensible	34 (69.4)
Resistente	15 (30.6)
Hallazgo histopatológico	
Gastritis crónica no Atrófica	21 (42.9)
Metaplasia	28 (57.1)

Entre los factores asociados al hallazgo histopatológico, se observó que la transición A2142G sobre el gen de *ARNr 23S* relacionado con la resistencia a claritromicina presente en los genomas completos de *H. pylori* fue significativo respecto al diagnóstico histopatológico de lesión severa de tipo metaplasia intestinal ($p < 0.05$). En el análisis de regresión múltiple, ajustado por sexo y edad, se observó que la prevalencia de casos con diagnóstico de metaplasia intestinal

que presentaron aislados de *H. pylori* con genotipo resistente a macrolidos es 1.92 veces respecto a aquellos casos con infección que presentan gastritis crónica no atrófica ($p<0.05$). Este resultado fue similar en el análisis de regresión bivariado (RP: 1.96; IC95%: 1.28 a 3.02; $p<0.05$) (Tabla 12) (Tabla 13).

Tabla 12. Factores moleculares del resistoma de las cepas aisladas asociados al hallazgo histopatológico de pacientes dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* en análisis bivariado.

Variables	Hallazgo histopatológico		P^a
	Gastritis crónica no atrófica (N=21)	Metaplasia (N=28)	
	n (%)	n (%)	
Mutaciones en el gen de <i>ARNr 23S</i>			
A2142G			0.015**
Tipo nativo	21 (50.0)	21 (50.0)	
Mutado	0 (0.0)	7 (100.0)	
A2143G			0.265
Tipo nativo	19 (46.3)	22 (53.7)	
Mutado	2 (25.0)	6 (75.0)	
Mutaciones en el gen de <i>gyrA</i>			
N87K			0.409**
Tipo nativo	17 (40.5)	25 (59.5)	
Mutado	4 (57.1)	3 (42.9)	
N87I			0.621**
Tipo nativo	17 (44.7)	21 (55.3)	
Mutado	4 (36.4)	7 (63.6)	
D91G			0.166**
Tipo nativo	19 (47.5)	21 (52.5)	
Mutado	2 (22.2)	7 (77.8)	
D91N			0.219**

Tipo nativo	20 (46.5)	23 (53.5)	
Mutado	1 (16.7)	5 (83.3)	
D91Y			0.569**
Tipo nativo	19 (41.3)	27 (58.7)	
Mutado	2 (66.7)	1 (33.3)	
Mutaciones en el gen de <i>rdxA</i>			
R16H			0.763**
Tipo nativo	19 (42.2)	26 (57.8)	
Mutado	2 (50.0)	2 (50.0)	
R16C			0.150**
Tipo nativo	17 (38.6)	27 (61.4)	
Mutado	4 (80.0)	1 (20.0)	
Q50 codón terminal			0.382**
Tipo nativo	21 (43.8)	27 (56.2)	
Mutado	0 (0.0)	1 (100.0)	
E75 codón terminal			0.835**
Tipo nativo	20 (42.6)	27 (57.4)	
Mutado	1 (50.0)	1 (50.0)	
Mutaciones en el gen de <i>pbp1A</i>			
S414R			0.382**
Tipo nativo	21 (43.8)	27 (56.2)	
Mutado	0 (0.0)	1 (100.0)	
T556S			0.731**
Tipo nativo	20 (43.5)	26 (56.5)	
Mutado	1 (33.3)	2 (66.7)	
N562Y			0.382**
Tipo nativo	21 (43.8)	27 (56.2)	
Mutado	0 (0.0)	1 (100.0)	
T593A			0.709
Tipo nativo	16 (44.4)	20 (55.6)	
Mutado	5 (38.5)	8 (61.5)	
Genotipo resistente a quinolona			0.363
Sensible	8 (53.3)	7 (46.7)	
Resistente	13 (38.2)	21 (61.8)	
Genotipo resistente a nitroimidazol			0.316

Sensible	14 (37.8)	23 (62.2)	
Resistente	7 (58.3)	5 (41.7)	
Genotipo resistente a betalactámico			0.788
Sensible	15 (44.1)	19 (55.9)	
Resistente	6 (40.0)	9 (60.0)	
Genotipo resistente a macrólido			0.011**
Sensible	19 (55.9)	15 (44.1)	
Resistente	2 (13.3)	13 (86.7)	

^a*Prueba estadística de ji-cuadrada; ^{**} Prueba exacta de Fisher.

Tabla 13. Factores moleculares del resistoma de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* independientemente asociados al hallazgo histopatológico en análisis de regresión múltiple.

Características	Análisis bivariado			Regresión múltiple		
	RP	IC 95%	<i>p</i>	RPa	IC 95%	<i>p</i>
Mutaciones en el gen de <i>ARNr</i>						
23S						
A2142G						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	2.00	1.47 – 2.71	0.001	1.85	1.35 – 2.55	0.001
A2143G						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.39	0.85 – 2.29	0.186	1.32	0.81 – 2.14	0.260
Mutaciones en el gen de <i>gyrA</i>						
N87K						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	0.72	0.29 – 1.77	0.474	0.79	0.35 – 1.81	0.580
N87I						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.15	0.67 – 1.97	0.606	0.99	0.57 – 1.73	0.986
D91G						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.48	0.93 – 2.35	0.095	1.28	0.81 – 2.04	0.289
D91N						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.55	0.96 – 2.46	0.058	1.34	0.83 – 2.16	0.227
D91Y						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	0.57	0.11 – 2.91	0.498	0.54	0.10 – 2.80	0.462
Mutaciones en el gen de <i>rdxA</i>						
R16H						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		

Mutado	0.87	0.31 – 2.41	0.782	0.89	0.37 – 2.13	0.793
R16C						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	0.33	0.05 – 1.95	0.219	0.32	0.06 – 1.83	0.201
Q50 codón terminal						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.78	1.38 – 2.29	0.001	1.63	1.16 – 2.29	0.005
E75 codón terminal						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	0.87	0.21 – 3.61	0.848	0.78	0.19 – 3.29	0.737
Mutaciones en el gen de <i>pbp1A</i>						
S414R						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.78	1.38 – 2.29	0.001	1.51	1.02 – 2.23	0.046
T556S						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.18	0.51 – 2.75	0.703	1.08	0.44 – 2.58	0.880
N562Y						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.78	1.38 – 2.29	0.001	1.50	1.01 – 2.23	0.046
T593A						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	1.11	0.65 – 1.87	0.703	1.04	0.64 – 1.67	0.880
T593G						
Tipo nativo	Ref.			Ref.		
Mutado	0.87	0.21 – 3.61	0.848	0.78	0.19 – 3.29	0.737
Genotipo resistente a quinolona						
Sensible	Ref.			Ref.		
Resistente	1.32	0.72 – 2.43	0.367	1.17	0.68 – 1.99	0.571
Genotipo resistente a nitroimidazol						
Sensible	Ref.			Ref.		
Resistente	0.67	0.33 – 1.38	0.278	0.65	0.37 – 1.16	0.148
Genotipo resistente a betalactámico						

Sensible			Ref.		Ref.			
Resistente			1.07	0.64 – 1.81	0.787	0.93	0.59 – 1.47	0.763
Genotipo	resistente	a						
macrólido								
Sensible			Ref.			Ref.		
Resistente			1.96	1.28 – 3.02	0.002	1.92	1.24 – 3.11	0.004

RP: razón de prevalencia; RPa: razón de prevalencia ajustada por sexo y edad; IC95%: Intervalo de confianza al 95%.

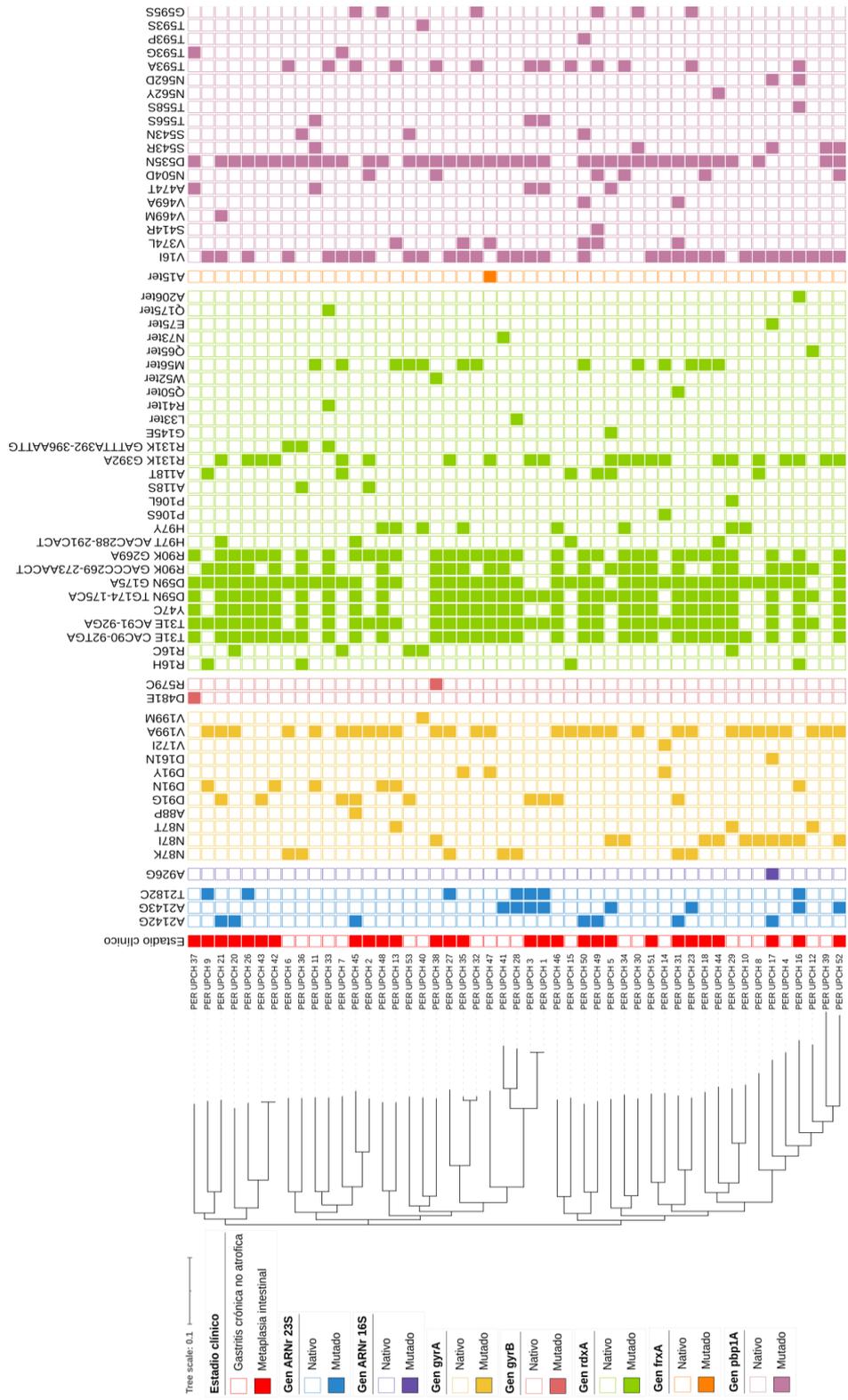


Figura 7. Características del resistoma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Tabla 14. Características del resistoma en los genomas completos de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos.

Características del resistoma	N (%)
Mutaciones en el gen de <i>ARNr 23S</i>	
A2142G	7 (14.3)
A2143G	8 (16.3)
T2182C	7 (14.3)
Mutaciones en el gen de <i>ARNr 16S</i>	
A926G	1 (2.1)
Mutaciones en el gen de <i>gyrA</i>	
N87K	7 (14.3)
N87I	11 (22.5)
N87T	3 (6.1)
A88P	1 (2.1)
D91G	9 (18.4)
D91N	6 (12.2)
D91Y	3 (6.1)
D161N	1 (2.1)
V172I	1 (2.1)
V199A	30 (61.2)
V199M	1 (2.1)
Mutaciones en el gen de <i>gyrB</i>	
D481E	1 (2.1)
R579C	2 (4.2)
Mutaciones en el gen de <i>rdxA</i>	
R16H	4(8.2)
R16C	5 (8.2)
T31E CAC90-92TGA	9 (18.4)
T31E AC91-92GA	18 (36.7)
Y47C	1 (2.1)
D59N TG174-175CA	8 (16.3)
D59N G175A	37 (75.5)
R90K GACCC269-273AACCT	6 (12.2)

R90K G269A	9 (18.4)
H97T ACAC288-291CACT	4 (8.3)
H97Y	8 (16.3)
P106S	1 (2.1)
P106L	1 (2.1)
A118S	2 (4.1)
A118T	8 (16.3)
R131K G392A	25 (50.1)
R131K GATTTA392-396AATTG	3 (6.1)
G145E	1 (2.1)
L33 codón terminal	1 (2.1)
R41 codón terminal	1 (2.1)
Q50 codón terminal	1 (2.1)
W52 codón terminal	1 (2.1)
M56 codón terminal	13 (26.5)
Q65 codón terminal	2 (4.1)
N73 codón terminal	1 (2.1)
E75 codón terminal	2 (4.2)
Q175 codón terminal	1 (2.1)
A206 codón terminal	1 (2.1)
Mutaciones en el gen de <i>frxA</i>	
A15 codón terminal	1 (2.1)
Mutaciones en el gen de <i>pbp1A</i>	
V16I	32 (65.3)
V374L	6 (12.2)
S414R	1 (2.1)
V469M	1 (2.1)
V469A	2 (4.1)
A474T	5 (10.2)
N504D	6 (12.2)
D535N	39 (79.6)
S543R	5 (10.2)
S543N	3 (6.1)
T556S	3 (6.1)
T558S	1 (2.1)

N562Y	1 (2.1)
N562D	2 (4.1)
T593A	13 (34.7)
T593G	2 (4.1)
T593P	1 (2.1)
T593S	1 (2.1)
G595S	6 (12.2)

5.6. Discusión

En la población de 49 pacientes con dispepsia que presentaron la infección por *H. pylori* las lesiones del epitelio gástrico de tipo metaplasia intestinal fue un factor de riesgo a la presencia de cepas aisladas con genotipo EPIYA-ABCC/*vacAs1aml1d1*, se observó que la prevalencia de infección por cepas de *H. pylori* con genotipo EPIYA-ABCC/*vacAs1aml1d1* fue 77% mayor en aquellos casos que presentaron diagnóstico de metaplasia intestinal respecto a los casos con lesión de tipo gastritis crónica no atrófica (RPa: 1.77; IC95%: 1.13 a 2.77; $p < 0.05$). Se conoce que la presencia del gen *cagA* se asocia a la detección de polimorfismos de riesgo del gen *vacA* (171, 172). En el estudio, la totalidad de aislados fue positiva a la presencia del gen *cagA* de modo que la magnitud de riesgo de desarrollo de lesión precancerosa entre los pacientes con dispepsia estuvo relacionada a la genotificación de la región variable del gen y al número de repeticiones EPIYA-C detectados, además, de la frecuencia de cada uno de los polimorfismos de riesgo del gen *vacA* (s1a, m1, i1 y d1), donde se observó que la variante genética EPIYA- ABCC/*vacAs1aml1d1* estuvo presente en el 83.3% de los pacientes con diagnóstico de metaplasia intestinal.

En adición, Sheh et al , 2013 describió que el origen geográfico de los aislados puede ser un indicador de riesgo en el desarrollo de lesiones severas sobre el epitelio gástrico (173). Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* de origen europeo muestran un mayor nivel de expresión de factores de virulencia asociados al gen *cagA* y al gen *vacA*, lo que incrementa el proceso inflamatorio de las células epiteliales, reduce el mecanismo apoptosis y promueve un mayor daño sobre las estructuras del ADN, incrementando el riesgo de desarrollo de metaplasia intestinal y cáncer gástrico (174). Lo que sugiere que los factores de virulencia del patógeno *H. pylori* pueden estar determinados por su origen filogeográfico. El análisis filogenético basado en MLST, ha permitido describir poblaciones y subpoblaciones genéticas muy bien definidas (hpEastAsia: hspEAsia, hspMaori y hspAmerind; hpEurope, hpNEAfrica, hpAfrica1, hpAfrica2, hpAsia2, hpSahul) (20, 175, 176). En el estudio se observó mediante MLST una mayor frecuencia de cepas hpEurope (77.6%) y, además, cuatro (8.2%) genomas peruanos fueron asignados a la subpoblación hspAmerind (Figura 3). Este hallazgo concuerda con la hipótesis del reemplazo de las cepas ancestrales provenientes de Asia y la llegada de nuevas cepas de *H. pylori* durante la colonización española (24, 174), y es comparable con el reporte de Gutiérrez-Escobar et al, 2020 donde sugiere un predominio de cepas virulentas de *H. pylori* hpEurope que desplazan a las cepas ancestrales hspAmerind provenientes de la población hpEastAsia (25). También se observó en una frecuencia de 14.2%, aislados relacionados a la población hpAfrica1. Los hallazgos de distribución de las poblaciones genéticas hpEurope y hpAfrica1, y la subpoblación hspAmerind observada en el análisis de MLST fue concordante con el análisis basado en SNPs (Figura 3) (Figura 4) (Figura 5).

En el estudio el viruloma de los aislados de *H. pylori* fue caracterizado para los principales factores de virulencia del patógeno, el análisis incluyó genes del sistema de translocación de efectores, el gen de exotoxina, genes de adherencia y genes de modulación de respuesta inmunológica (88, 177). Se conoce que la diversidad e integridad del Islote de patogenicidad cagPAI podría afectar el estado de enfermedad y el resultado clínico entre pacientes con la infección por *H. pylori*, relacionándose con estados clínicos de atrofia epitelial gástrica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (178), el estudio mostró que el 42.9% de los aislados presentó un cagPAI intacto y que de estos genomas el 66.7% fue aislado de casos con metaplasia intestinal. Se observó , además, que la prevalencia de cepas con cagPAI intacto fue 32% mayor en los casos con metaplasia intestinal respecto a los casos con gastritis crónica no atrófica, el hallazgo no fue estadísticamente significativo (RPa: 1.32; IC95%: 0.79 a 2.22; $p>0.05$) (Tabla 7) (Tabla 8) (Tabla 9). Esto puede deberse a que el desarrollo de la enfermedad ulcerativa es un proceso complejo que involucra otros factores además del *cag*- PAI, cuyo rol patogénico aún no se comprende completamente (179). Además, se observó que el gen esencial deletado con mayor frecuencia fue el gen *cagY* (Tabla 10), hallazgo comparable al reporte de Markovska et al. 2018 (157, 180, 181).

Se conoce que las modificaciones post traduccionales de tipo fosforilación en la proteína *cagA*, se debe a un incremento en las repeticiones del motivo EPIYA-C y guarda una correlación con una mayor virulencia de *H. pylori* (182). Se observó que el 71.4% de cepas con genotipo EPIYA-ABCC fueron aisladas de casos con metaplasia intestinal y estos genomas representaron el 14.3% de los aislados clínicos. El genotipo EPIYA-ABCC no presentó una relación estadísticamente

significativo con el estadio clínico de casos con dispepsia e infección por *H. pylori*. El hallazgo fue comparable a estudios realizados en poblaciones de Colombia y México donde se observa una prevalencia de ~10.2% para genotipos con duplicidad del motivo EPIYA-C en aislados provenientes de casos con gastritis ulcerativa y cáncer gástrico (99, 183, 184).

En el estudio se analizó el gen de la citotoxina vacuolizante *vacA*, la toxina ha demostrado irrumpir sobre la estabilidad de la membrana de las células epiteliales y sobre células del sistema inmune del hospedero, además, de presentar una diversidad alélica toxígena para las regiones señal, media e intermedia del gen (185, 186). Se observó que los alelos virulentos asociados a riesgo de lesiones severas presentaron una alta frecuencia entre los genomas completos de *H. pylori* analizados (*vacAs1a*: 95.9%, *vacAm1*: 97.9%, *vacAi1*: 79.6%, *vacAd1*: 95.9%) (Tabla 7). La tipificación del gen *vacA* mostró que el genotipo virulento *vacAs1m1i1d1* tuvo una frecuencia de 77.5% y presentó un 65% mayor de riesgo con el desarrollo de metaplasia intestinal, el hallazgo no fue estadísticamente significativo (RPa: 1.65; IC95%: 0.73 a 3.72; $p > 0.05$) (Tabla 9). Diversos reportes han demostrado que la combinación de alelos virulentos del gen *vacA* se relacionan a una mayor actividad vacuolizante y un mal pronóstico de desarrollo de adenocarcinoma gástrico (34, 187, 188).

Se conoce que el patógeno *H. pylori* inicia un proceso de colonización y supresión de respuesta inmune sobre el epitelio gástrico mediante la interacción con factores de adherencia presentes en el patógeno (189, 190). En el estudio se observó que la totalidad de los genomas presentaron el gen que codifica para la adhesina *hpaA* y al gen *napA* que codifica para una proteína de activación de neutrófilos (Tabla

7). También se observó una mayor frecuencia de lesión severa tipo metaplasia intestinal de 19%, 49% y 41% para los genes de adhesinas *babB/hopT*, *hopZ* y *sabB/hopO* respectivamente, en relación con los casos con enfermedad crónica no atrófica, pero el hallazgo no fue estadísticamente significativo (Tabla 9). En poblaciones asiáticas se ha reportado, que la presencia del gen que codifica para las adhesina *hopZ* (OR: 3.4; IC95%: 0.6 a 18.2; $p < 0.05$) es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (191). También se observó que los factores genéticos de adherencia *babA2* (54.5%), *babB/hopT* (63.2%), *hopA* (57.1%), *hopZ* (64.5%), *sabA/hopP* (56.4%) y *sabB/hopO* (72.7%) fueron detectados en mayor frecuencia en los casos con diagnóstico de metaplasia intestinal (Tabla 8).

Por otro lado, se caracterizó el resistoma de los genomas de *H. pylori* secuenciados en el estudio y se observó que en el ARN ribosómico peptidil transferasa en la región del dominio V del ARNr 23S la totalidad de aislados que presentan la transición A2142G fueron aislados de casos con diagnóstico de metaplasia intestinal (Tabla 11). También se observó que la prevalencia de casos con diagnóstico de metaplasia intestinal que presentaron aislados de *H. pylori* con genotipo A2142G relacionada a la resistencia antibiótica a macrólidos es 1.85 veces mayor respecto a aquellos casos que presentan diagnóstico de gastritis crónica no atrófica (RPa: 1.85; IC95%: 1.35 a 2.55; $p < 0.05$) (Tabla 12)(Tabla 13). Se conoce que la claritromicina es un componente clave en los protocolos de tratamiento frente a la infección por *H. pylori*, pero la resistencia antibiótica a este fármaco ha incrementado entre 11% a 35% en todo el mundo (192, 193), además, el impacto de la resistencia a claritromicina sobre la eficacia terapéutica podría reducir en un 35.4% (IC95%: 25.4% a 45.4%) para la terapia convencional (194).

En Perú, se ha reportado que la eficacia del régimen convencional basado en claritromicina es de 71,2% (54) y, que las tasas de resistencia reportadas en los últimos cinco años oscilan de 29% a 50% (44, 60, 61). Reportes de resistencia a claritromicina que son comparables a lo observado en el presente estudio (30.6%), y que sugiere que la población en estudio presenta una alta resistencia a claritromicina (>15%) (Tabla 11) (47). En adición a la mutación A2142G, en el estudio se observó transversiones en las posiciones A2143G (16.4%) y T2182C (14.3) (Tabla 14).

En relación con el antibiótico levofloxacino, se observó la presencia de mutaciones en el *gen gyrA* en las posiciones N87K/I y D91G/N/Y pero no presentaron una relación con el estadio de enfermedad de los casos con infección, la resistencia a quinolonas fue de 69.4% (Tabla 11). Levofloxacino es componente de los protocolos de rescate y segunda línea frente a la infección por *H. pylori* y, una población es considerada como resistente a levofloxacino cuando la resistencia supera el 20%, lo que sugiere riesgos de fracaso terapéutico en nuestra población de pacientes infectados. El hallazgo fue comparable a reportes para centros de salud públicos en la ciudad de lima (45.5% a 72.1%) (59, 66). También se observaron mutaciones en las posiciones D161N, V172I, V199A/M del *gen gyrA*, y en las posiciones D481E y R579C para el *gen gyrB* (14). El estudio también describió mutaciones relacionadas a la resistencia a betalactámicos como amoxicilina, estas mutaciones fueron observadas únicamente sobre el *gen pbp1A*. En el caso, de metronidazol las mutaciones fueron observadas tanto para el *gen rdxA* y el *gen frxA*. Las tasas de resistencia observadas fueron de 30.6% para amoxicilina y 24.5% para metronidazol. Se observó que solo un aislado clínico

presentó la mutación A926G relacionada con la resistencia al fármaco tetraciclina (Tabla 14).

En adición, el empleo de técnicas basadas en NGS fue adecuado para la caracterización de microorganismos que presentan una alta heterogeneidad genética, lo que facilitó una extensa caracterización de genes involucrados en la virulencia y la resistencia antibiótica de las cepas *H. pylori* provenientes de pacientes peruanos con dispepsia (Figura 5)(Figura 7). Se encontró que la diversidad de genes en el pangenoma de los aislamientos clínicos peruanos presentó un tamaño de 7000 genes con un genoma central de 903 genes (Figura 6). En muestras provenientes de Colombia se ha reportado un genoma central de 446 genes (195) y se ha observado que el patógeno *H. pylori* presenta un genoma abierto (196, 197). Sin embargo, el método basado en NGS puede verse afectado por la química de su secuenciación, que en este estudio se basó en la generación de lecturas cortas de secuenciación lo que produce genomas ensamblados de adecuada profundidad con una probabilidad menor de cobertura y una mayor fragmentación de contigs (198, 199).

Finalmente, los hallazgos observados en el estudio manifiestan que las cepas de *H. pylori* circulantes en nuestro medio presentan una alta frecuencia de variantes genéticas de riesgo en el desarrollo de lesiones severas asociadas con malignidad tanto en su viruloma como resistoma. Destacando que la presencia de variantes genéticas para los genes *cagA*, *vacA* y las mutaciones sobre el gen *ARNr 23S* se relacionan al estadio clínico de enfermedad severa de tipo metaplasia intestinal en pacientes peruanos con dispepsia que presentan la infección por *H. pylori*.

VI. LIMITACIONES

En la investigación 1, denominada Genotipos de virulencia en cepas de *Helicobacter pylori* y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos, la principal limitación fue el empleo de muestras criopreservadas provenientes de un biobanco; en especial, considerando que el patógeno *H. pylori* es catalogado como un microorganismo fastidioso dado las exigencias microbiológicas que demanda su difícil cultivo no fue posible reactivar los aislamientos clínicos de la totalidad de casos elegibles lo que redujo en un 14.1% el tamaño de muestra, pero basado en la estimación del poder estadístico el sesgo no sería significativo. Una segunda limitación fue la clasificación de estadios clínicos de los casos con infección provenientes del estudio madre. La clasificación empleada en la investigación 1 fue la clasificación propuesta en el estudio madre y se basó en el sistema Sydney. El sistema Sydney facilitó una adecuada clasificación morfológica de grado de lesión variable que permitió discriminar entre el estadio clínico de gastritis crónica no atrófica y el estadio de metaplasia intestinal. A pesar de que la clasificación fue adecuada y se observó diferencias significativas entre los estadios clínicos, en futuros estudios, se sugiere emplear sistemas de clasificación que permitan diferenciar en mayor detalle los estadios clínicos según niveles de ausencia, leve, moderado y severo para las condiciones de gastritis crónica atrófica o metaplasia intestinal, tal lo recomendado en el sistema operativo de evaluación de gastritis (OLGA) y el enlace operativo sobre la evaluación de metaplasia intestinal (OLGIM).

En la investigación 2, denominada Detección de variantes genéticas de virulencia basados en secuenciación de última generación y su relación con lesiones gástricas precancerosas en pacientes peruanos, la principal limitación fue el tamaño de la muestra. El hallazgo de co-infección observado en la investigación 1 fue concordante con las características de alta frecuencia de mutaciones y eventos recombinantes propios de la heterogeneidad genética del patógeno *H. pylori*, pero redujo la probabilidad de caracterización de una cepa única, por lo que al disponer de un menor número de aislados clínicos que cumplieran con el criterio de ausencia de co-infección por *H. pylori*, se redujo el poder estadístico y el análisis fue considerado exploratorio. El hallazgo en la investigación 2 permitió una adecuada detección de la variante de interés y su frecuencia mostró ser un factor de riesgo significativo para el estadio clínico de lesión severa entre los casos con infección por *H. pylori*, pero debe ser tomado con cautela y se sugiere incrementar el tamaño de muestra. Por otro lado, los genomas completos de *H. pylori* analizados fueron genomas ensamblados de alta calidad. La química de secuenciación basada en lecturas cortas facilitó una adecuada profundidad de cobertura a fin de diferenciar los polimorfismos de un solo nucleótido de los errores de secuenciación, pero la secuenciación de lecturas cortas incremento la probabilidad de no generar la superposición suficiente entre los fragmentos de un gen de interés, lo que limitó la detección de algunos genes dado su bajo porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura en sus secuencias. Se sugiere considerar los hallazgos como un punto de inicio que en futuros estudios permitan la integración de estrategias de secuenciación basadas en lecturas largas a fin de disponer ensamblajes híbridos, lo que mejoraría la calidad de los genomas completos.

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales evidencian que fue posible tipificar los factores moleculares de virulencia de las cepas aisladas de *H. pylori* procedentes de pacientes con síntomas de dispepsia y se encontró evidencia de como estos genotipos o variantes genéticas se relacionan con el estado clínico de lesión severa sobre el epitelio de la mucosa gástrica de pacientes peruanos. Mediante la genotipificación por PCR convencional de los factores de virulencia de aislados de *H. pylori* procedentes de pacientes dispépticos, se encontró evidencia que el genotipo *cagA(+)/vacAsIamI* presenta un efecto de riesgo en el desarrollo de metaplasia intestinal entre pacientes con dispepsia que presentan la infección por *H. pylori*. Las repeticiones del motivo EPIYA-C en la región variable del gen *cagA* se asocian a lesiones precancerosas en los pacientes peruanos con dispepsia, y los polimorfismo virulentos en el gen *vacA* muestran un efecto de riesgo en el desarrollo de lesiones graves sobre la mucosa epitelial gástrica, sin embargo estos polimorfismos no mostraron una asociación significativa a excepción de las variantes *mI* e *iI* del gen. Además, se logró secuenciar y obtener genomas completos de calidad de los aislados de *H. pylori* mediante técnicas de secuenciación de última generación, fue posible tipificar un mayor número de factores de virulencia que involucra a genes de citotoxinas, genes de adherencia, genes moduladores de respuesta inmune y los genes de resistencia antibiótica, también fue posible determinar variantes genéticas para la integridad del gen *cagA* y el gen *vacA*. Hubo evidencia que la variante genética EPIYA-ABCC/*vacAsIamIiIdI* se asocia a la lesión precancerosa, y que la frecuencia de

estos aislados fue predominante entre los diagnósticos histopatológicos de metaplasia intestinal, además se observó que la población genética mayoritaria entre los aislados de *H. pylori* correspondió a la población hpEurope. Además, con los genomas completos de las cepas aisladas de *H. pylori* se logró tipificar el resistoma de los aislados de *H. pylori* y permitió caracterizar a las cepas circulantes como microorganismos resistentes fármacos macrolidos y quinolonas. Finalmente, ambos estudios aportan evidencias importantes del riesgo de la presencia de factores moleculares de virulencia presentes en las cepas aisladas de *H. pylori* circulantes en nuestro medio y su relación con las lesiones severas de tipo metaplasia intestinal sobre la mucosa epitelial gástrica de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia, y se sugiere que ambos tópicos continúen estudiándose a fin de disponer información de utilidad terapéutica y reducir los casos de cáncer gástrico en nuestra población.

VIII. RECOMENDACIONES

H. pylori es un agente causal de lesiones preneoplásicas entre pacientes que presentan la infección. En el estudio, fue evidente la relación entre el genotipo de virulencia del patógeno y el fenotipo de lesión sobre el epitelio gástrico de los pacientes peruanos con síntomas de dispepsia. Sin embargo, al emplear el cultivo microbiológico se recomienda disponer de muestras frescas o aislamientos primarios dada la viabilidad de las cepas de *H. pylori* debido a que la bacteria es un microorganismo fastidioso de crecimiento lento que emplea un cultivo microbiológico nutricionalmente exigente, que en muestras provenientes de un biobanco compromete su capacidad de reactivación y/o obtención de densidad suficiente para estudios moleculares, no afectando a las técnicas moleculares convencionales de genotipificación de regiones cortas de genes pero si afectando la calidad de secuencias con mayor cobertura aplicados al estudio del genoma completo del microorganismo.

El estudio del viruloma y resistoma de *H. pylori* permite elucidar los mecanismos de patogenicidad y resistencia antibiótica de la bacteria y resulta importante para la implementación de estrategias de vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas. Sin embargo, algunos mecanismos moleculares pueden ser complejos y dependen del nivel de expresión genética o de mecanismos de adaptación del patógeno. Se recomienda que en estudios posteriores las estrategias convencionales de caracterización genotípica se combinen con estrategias multiómicas para describir de forma más clara los mecanismos subyacentes de

patogenicidad en relación con el desarrollo de lesiones neoplásicas sobre el epitelio gástrico.

Los hallazgos presentados en este estudio demuestran que genotipos o variantes genéticas específicas de virulencia presentan riesgo de desarrollo de lesiones preneoplásicas. Pero para fortalecer el conocimiento sobre este tema, se recomienda incluir un tamaño de muestra más amplio, que involucren casos provenientes de diversas regiones en Perú y que dispongan de información demográfica y clínica detallada para facilitar la elucidación de la relación genotipo – fenotipo en el desarrollo de lesiones malignas entre los pacientes peruanos que presentan la infección.

La estrategia de análisis en el presente estudio se limitó a la caracterización de cepas de *H. pylori* provenientes de un criobanco que fueron aisladas de pacientes peruanos con síntomas de dispepsia. Se recomienda que en futuros estudios, se disponga de información clínica e histopatológica de los casos, dado que en Perú los genomas completos de aislados *H. pylori* disponibles en bases de datos de acceso libre son escasos y se desconoce a detalle las características de los pacientes de procedencia.

Finalmente, se sugiere que ambos tópicos continúen estudiándose a fin de disponer información de utilidad terapéutica y contribuir con la reducción de los casos con cáncer gástrico en nuestra población.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993;22(1):5-19.
2. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9(1):1-13.
3. Owen RJ. *Helicobacter*--species classification and identification. *Br Med Bull*. 1998;54(1):17-30.
4. Ierardi E, Losurdo G, Mileti A, Paolillo R, Giorgio F, Principi M, et al. The Puzzle of Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*: Beyond Basic Science. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(6).
5. Dubois A. Spiral bacteria in the human stomach: the gastric helicobacters. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(3):79-85.
6. Hua JS, Zheng PY, Bow H. Species differentiation and identification in the genus of *Helicobacter*. *World J Gastroenterol*. 1999;5(1):7-9.
7. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(2).
8. IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1994.
9. Crowe SE. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1158-65.
10. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. The cancer burden attributable to biologic agents. *Ann Epidemiol*. 2015;25(3):183-7.

11. Mladenova I, Durazzo M. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2018;64(3):251-4.
12. Burucoa C, Axon A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2017;22 Suppl 1.
13. Dong QJ, Wang Q, Xin YN, Li N, Xuan SY. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2009;15(32):3984-91.
14. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):449-90.
15. Cao DM, Lu QF, Li SB, Wang JP, Chen YL, Huang YQ, et al. Comparative Genomics of *H. pylori* and Non-Pylori *Helicobacter* Species to Identify New Regions Associated with Its Pathogenicity and Adaptability. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6106029.
16. Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(5):299-305.
17. Waskito LA, Yamaoka Y. The Story of *Helicobacter pylori*: Depicting Human Migrations from the Phylogeography. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1149:1-16.
18. Hanafiah A, Lopes BS. Genetic diversity and virulence characteristics of *Helicobacter pylori* isolates in different human ethnic groups. *Infect Genet Evol*. 2020;78:104135.
19. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Wu JY, et al. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science*. 2009;323(5913):527-30.
20. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003;299(5612):1582-5.

21. Devi SM, Ahmed I, Francalacci P, Hussain MA, Akhter Y, Alvi A, et al. Ancestral European roots of *Helicobacter pylori* in India. *BMC Genomics*. 2007;8:184.
22. Dominguez-Bello MG, Perez ME, Bortolini MC, Salzano FM, Pericchi LR, Zambrano-Guzman O, et al. Amerindian *Helicobacter pylori* strains go extinct, as european strains expand their host range. *PLoS One*. 2008;3(10):e3307.
23. Maldonado-Contreras A, Mane SP, Zhang XS, Pericchi L, Alarcon T, Contreras M, et al. Phylogeographic evidence of cognate recognition site patterns and transformation efficiency differences in *H. pylori*: theory of strain dominance. *BMC Microbiol*. 2013;13:211.
24. Kersulyte D, Kalia A, Gilman RH, Mendez M, Herrera P, Cabrera L, et al. *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One*. 2010;5(11):e15076.
25. Gutierrez-Escobar AJ, Velapatino B, Borda V, Rabkin CS, Tarazona-Santos E, Cabrera L, et al. Identification of New *Helicobacter pylori* Subpopulations in Native Americans and Mestizos From Peru. *Front Microbiol*. 2020;11:601839.
26. Thorell K, Yahara K, Berthenet E, Lawson DJ, Mikhail J, Kato I, et al. Rapid evolution of distinct *Helicobacter pylori* subpopulations in the Americas. *PLoS Genet*. 2017;13(2):e1006546.
27. Bryc K, Durand EY, Macpherson JM, Reich D, Mountain JL. The genetic ancestry of African Americans, Latinos, and European Americans across the United States. *Am J Hum Genet*. 2015;96(1):37-53.
28. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):283-97.
29. Seo JH, Bortolin K, Jones NL. Review: *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter*. 2020;25 Suppl 1:e12742.

30. Ruge M, Capelle LG, Cappelleso R, Nitti D, Kuipers EJ. Precancerous lesions in the stomach: from biology to clinical patient management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27(2):205-23.
31. Pennelli G, Grillo F, Galuppini F, Ingravallo G, Pillozzi E, Ruge M, et al. Gastritis: update on etiological features and histological practical approach. *Pathologica.* 2020;112(3):153-65.
32. de Bernard M, Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2014;19 Suppl 1:11-8.
33. Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2017;22 Suppl 1.
34. McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel).* 2017;9(10).
35. Latifi-Navid S, Mohammadi S, Maleki P, Zahri S, Yazdanbod A, Siavoshi F, et al. *Helicobacter pylori vacA d1/-i1* genotypes and geographic differentiation between high and low incidence areas of gastric cancer in Iran. *Arch Iran Med.* 2013;16(6):330-7.
36. Pormohammad A, Ghotaslou R, Leylabadlo HE, Nasiri MJ, Dabiri H, Hashemi A. Risk of gastric cancer in association with *Helicobacter pylori* different virulence factors: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2018;118:214-9.
37. Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(17):e6620.
38. Ferreira RM, Machado JC, Leite M, Carneiro F, Figueiredo C. The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma. *Histopathology.* 2012;60(6):992-8.

39. Gonzalez CA, Figueiredo C, Lic CB, Ferreira RM, Pardo ML, Ruiz Liso JM, et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(5):867-74.
40. Escalante S, Navarrete C, Nuñez D, Reyes J, Zabala A, Pazmiño G. vacA genotypes and EPIYA motifs of *Helicobacter pylori* in patients with atrophic and non-atrophic gastritis. *Research Square*. 2019;1(1):1-17.
41. Huang X, Deng Z, Zhang Q, Li W, Wang B, Li M. Relationship between the iceA gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:1085-92.
42. Shiota S, Watada M, Matsunari O, Iwatani S, Suzuki R, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(1):e30354.
43. Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* BabA in adaptation for gastric colonization. *World J Gastroenterol*. 2017;23(23):4158-69.
44. Boehnke KF, Valdivieso M, Bussalleu A, Sexton R, Thompson KC, Osorio S, et al. Antibiotic resistance among *Helicobacter pylori* clinical isolates in Lima, Peru. *Infect Drug Resist*. 2017;10:85-90.
45. Flores Trujillo G, Evangelista Montoya F, Wilkinson K. Asociación entre los patrones EPIYA de cepas de *Helicobacter pylori* y alteraciones patológicas de la mucosa gástrica de pacientes dispépticos atendidos en Hospitales de 4 ciudades del norte del Perú [Tesis para obtener el grado de Maestro de Ciencias en Investigación Clínica]: Universidad Privada Antenor Orrego; 2017.
46. IARC. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. IARC Working Group Report. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.

47. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017;66(1):6-30.
48. Rokkas T, Gisbert JP, Malfertheiner P, Niv Y, Gasbarrini A, Leja M, et al. Comparative Effectiveness of Multiple Different First-Line Treatment Regimens for *Helicobacter pylori* Infection: A Network Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2021;161(2):495-507 e4.
49. Suzuki S, Kusano C, Horii T, Ichijima R, Ikehara H. The Ideal *Helicobacter pylori* Treatment for the Present and the Future. *Digestion*. 2022;103(1):62-8.
50. Shah SC, Iyer PG, Moss SF. AGA Clinical Practice Update on the Management of Refractory *Helicobacter pylori* Infection: Expert Review. *Gastroenterology*. 2021;160(5):1831-41.
51. Lee YC, Dore MP, Graham DY. Diagnosis and Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Annu Rev Med*. 2022;73:183-95.
52. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022.
53. Rokkas T, Ekmektzoglou K, Graham DY. Current role of tailored therapy in treating *Helicobacter pylori* infections. A systematic review, meta-analysis and critical analysis. *Helicobacter*. 2023;28(1):e12936.
54. Costa B, Briceño B, Larco P. Efectividad de un nuevo régimen simplificado en la erradicación de *Helicobacter pylori*. Estudio prospectivo realizado en una clínica privada de Lima Metropolitana / New simplified regimen for *Helicobacter pylori* eradication achieves high effectiveness. Prospective study in a private clinic in Lima, Peru. *Rev gastroenterol Perú*. 2017;37(3):225-30.
55. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61(5):646-64.

56. Camargo MC, Garcia A, Riquelme A, Otero W, Camargo CA, Hernandez-Garcia T, et al. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(4):485-95.
57. Villavicencio S, Sánchez P, Chávez C, Loza M, Espinoza R. Resistencia antibiótica de *Helicobacter pylori* en la población peruana: una revisión sistemática y metanálisis sobre su prevalencia en la población general. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2023;43(3):155-62.
58. Osato MS. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: sensitivity test results and their clinical relevance. *Curr Pharm Des*. 2000;6(15):1545-55.
59. Guzman J, Castillo D, Ojeda M, Sauvain M. [Antimicrobial susceptibility and mutations in the 23S rRNA gen of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2019;36(2):270-4.
60. Olano M, Chu M, Guzman J, Castillo D, Sauvain M. Diagnostic performance of the culture and susceptibility of *Helicobacter pylori* in peruvian patients: results from a sentinel laboratory. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(3):406-11.
61. Bilgiler C, Thannesberger J, Ojeda Cisneros M, Boehnke K, Wu J, Xi C, et al. Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy Samples from Lima/Peru. *Microb Drug Resist*. 2021;27(7):951-5.
62. Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(9):613-29.
63. Smiley R, Bailey J, Sethuraman M, Posecion N, Showkat Ali M. Comparative proteomics analysis of sarcosine insoluble outer membrane proteins from clarithromycin resistant and sensitive strains of *Helicobacter pylori*. *J Microbiol*. 2013;51(5):612-8.

64. Kittisenachai S, Rojpibulstit P, Vilaichone RK, Gamnarai P, Phaonakrop N, Suealek N. FBPAII and rpoBC, the Two Novel Secreted Proteins Identified by the Proteomic Approach from a Comparative Study between Antibiotic-Sensitive and Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis Strains. *Infect Immun*. 2021;89(6).
65. Beheshtirouy S, Eyvazi S, Tarhiz V. Evaluation of Mutations in 23S rRNA, rdxA and frxA Genes of *Helicobacter pylori* in Paraffin-Embedded Gastric Biopsy Specimens from Iranian Gastric Cancer and Gastritis Patients. *J Gastrointest Cancer*. 2021;52(1):207-11.
66. Chu M. Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del hospital y la clínica médica Cayetano Heredia [Tesis para optar en grado de maestro en Bioquímica y Biología molecular]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021.
67. Losurdo G, Pricci M, De Bellis M, Celiberto F, Russo F, Riezzo G, et al. Effect of metronidazole resistance on *Helicobacter pylori* eradication regimens. *J Dig Dis*. 2022;23(10):561-7.
68. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(5):995-8.
69. Kwon YH, Kim JY, Kim N, Park JH, Nam RH, Lee SM, et al. Specific mutations of penicillin-binding protein 1A in 77 clinically acquired amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* strains in comparison with 77 amoxicillin-susceptible strains. *Helicobacter*. 2017;22(6).
70. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
71. INEN. Datos epidemiológicos. Cuadros estadísticos 2000 - 2016. Oficina de Informática: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; 2017 [Available

from: <https://portal.inen.sld.pe/indicadores-anuales-de-gestion-produccion-hospitalaria/>.

72. MINSA. Analisis de la situación del cancer en el Perú, 2013 Direccion General de Epidemiologia: Ministerio de Salud; 2013 [Available from: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis_cancer.pdf].

73. Tirado-Hurtado I, Carlos C, Lancho L, Alfaro A, Ponce R, Schwarz LJ, et al. Helicobacter pylori: History and facts in Peru. Crit Rev Oncol Hematol. 2019;134:22-30.

74. Ramírez Ramos A, Sánchez Sánchez R. Helicobacter pylori 25 años después (1983 -2008): epidemiología, microbiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento. Revista de Gastroenterología del Perú. 2009;29:158-70.

75. Evangelista Montoya F. Helicobacter pylori en el norte del Perú. UCV-SCIENTIA. 2017;9:170-8.

76. Gredner T, Behrens G, Stock C, Brenner H, Mons U. Cancers Due to Infection and Selected Environmental Factors. Dtsch Arztebl Int. 2018;115(35-36):586-93.

77. Sjomina O, Pavlova J, Niv Y, Leja M. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2018;23 Suppl 1:e12514.

78. Custodio Zegarra D. Prevalencia de la infección de la bacteria Helicobacter pylori en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) - Lima, Perú [Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología]. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2017.

79. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. J Dig Dis. 2012;13(1):2-9.

80. Morson BC, Sobin LH, Grundmann E, Johansen A, Nagayo T, Serck-Hanssen A. Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol.* 1980;33(8):711-21.
81. Shiota S, Thrift AP, Green L, Shah R, Verstovsek G, Rugge M, et al. Clinical Manifestations of Helicobacter pylori-Negative Gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(7):1037-46 e3.
82. Stewart B, Khanduri P, McCord C, Ohene-Yeboah M, Uranues S, Vega Rivera F, et al. Global disease burden of conditions requiring emergency surgery. *Br J Surg.* 2014;101(1):e9-22.
83. Fischbach W, Malfertheiner P. Helicobacter Pylori Infection. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(25):429-36.
84. Lee YC, Lin JT, Wu HM, Liu TY, Yen MF, Chiu HM, et al. Cost-effectiveness analysis between primary and secondary preventive strategies for gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(5):875-85.
85. Iragorri N, Spackman E. Assessing the value of screening tools: reviewing the challenges and opportunities of cost-effectiveness analysis. *Public Health Rev.* 2018;39:17.
86. FitzGerald R, Smith SM. An Overview of Helicobacter pylori Infection. *Methods Mol Biol.* 2021;2283:1-14.
87. Oztekin M, Yilmaz B, Agagunduz D, Capasso R. Overview of Helicobacter pylori Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects. *Diseases.* 2021;9(4).
88. Ansari S, Yamaoka Y. Helicobacter pylori Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. *Toxins (Basel).* 2019;11(11).
89. Sterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. Helicobacter pylori virulence genes. *World J Gastroenterol.* 2019;25(33):4870-84.

90. Herrero R, Park JY, Forman D. The fight against gastric cancer - the IARC Working Group report. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(6):1107-14.
91. Berthenet E, Yahara K, Thorell K, Pascoe B, Meric G, Mikhail JM, et al. A GWAS on *Helicobacter pylori* strains points to genetic variants associated with gastric cancer risk. *BMC Biol.* 2018;16(1):84.
92. IARC. GLOBOCAN 2022: Cancer attributable to infections 2018: IARC; 2022 [Available from: <https://gco.iarc.fr/causes/infections>].
93. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008;135(1):91-9.
94. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1271-6.
95. Kabamba ET, Tuan VP, Yamaoka Y. Genetic populations and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol.* 2018;60:109-16.
96. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:31-4.
97. NHS. UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Helicobacter* species. London: Public Health England; 2015. p. 17.
98. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, Boer W, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1998;115(1):58-66.
99. Rodriguez Gomez ER, Otero Regino W, Monterrey PA, Trespalacios Rangel AA. *cagA* gene EPIYA motif genetic characterization from Colombian *Helicobacter pylori* isolates: Standardization of a molecular test for rapid clinical laboratory detection. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227275.

100. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17771-7.
101. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006;11(6):574-80.
102. Atherton JC, Cover TL, Twells RJ, Morales MR, Hawkey CJ, Blaser MJ. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):2979-82.
103. Melo-Narváez MC, Rojas-Rengifo DF, Jiménez-Soto LF, Delgado MdP, Mendoza de Molano B, Vera-Chamorro JF, et al. Genotipificación de *cagA* y de la región intermedia de *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes adultos colombianos y su asociación con enfermedades gástricas. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2018;33:103-10.
104. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(3):926-36.
105. Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, et al. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori vacA* gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3493-500.
106. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis*. 2008;12(1):30-6.

107. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2463-5.
108. Marshall BJ, Goodwin CS. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37:68.
109. Kinoshita H, Hayakawa Y, Koike K. Metaplasia in the Stomach-Precursor of Gastric Cancer? *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
110. Toyoshima O, Nishizawa T, Koike K. Endoscopic Kyoto classification of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk diagnosis. *World J Gastroenterol*. 2020;26(5):466-77.
111. Sue S, Shibata W, Maeda S. *Helicobacter pylori*-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:737621.
112. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2274-9.
113. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol*. 2001;158(2):647-54.
114. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(23):1777-80.
115. Matos JI, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013;25(12):1431-41.

116. El Khadir M, Boukhris Alaoui S, Benajah DA, Ibrahimi SA, Chbani L, El Abkari M, et al. VacA genotypes and cagA-EPIYA-C motifs of *Helicobacter pylori* and gastric histopathological lesions. *Int J Cancer*. 2020;147(11):3206-14.
117. Gatti LL, Modena JL, Payao SL, Smith Mde A, Fukuhara Y, Modena JL, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop*. 2006;100(3):232-40.
118. Paniagua GL, Monroy E, Rodriguez R, Arroniz S, Rodriguez C, Cortes JL, et al. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:14.
119. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Staczek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23(9):1521-40.
120. Gladyshev N, Taame M, Kravtsov V. Clinical and laboratory importance of detecting *Helicobacter pylori* coccoid forms for the selection of treatment. *Prz Gastroenterol*. 2020;15(4):294-300.
121. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria - M45A2. 2010;30(18).
122. Ohkusa T, Miwa H, Endo S, Okayasu I, Sato N. *Helicobacter pylori* is a fragile bacteria when stored at low and ultra-low temperatures. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(2):200-4.
123. Seo JH, Youn HS, Goo MJ, Jun JS, Lim JY, Park CH, et al. Recovery of *Helicobacter pylori* from gastric tissue cryopreserved for more than 10 years. *Helicobacter*. 2013;18(2):167-8.
124. Crafa P, Russo M, Miraglia C, Barchi A, Moccia F, Nouvenne A, et al. From Sidney to OLGA: an overview of atrophic gastritis. *Acta Biomed*. 2018;89(8-S):93-9.

125. Kalkan IH, Sapmaz F, Guliter S, Atasoy P. Severe gastritis decreases success rate of *Helicobacter pylori* eradication. *Wien Klin Wochenschr.* 2016;128(9-10):329-34.
126. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):488-95.
127. Graham DY. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(18):5191-204.
128. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017;153(2):420-9.
129. Sonnenberg A. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 2022;55 Suppl 1:S1-S13.
130. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(11):629-41.
131. Wang MY, Liu XF, Gao XZ. *Helicobacter pylori* virulence factors in development of gastric carcinoma. *Future Microbiol.* 2015;10(9):1505-16.
132. Jiang X, Xu Z, Zhang T, Li Y, Li W, Tan H. Whole-Genome-Based *Helicobacter pylori* Geographic Surveillance: A Visualized and Expandable Webtool. *Front Microbiol.* 2021;12:687259.
133. Pohl D, Keller PM, Bordier V, Wagner K. Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. *World J Gastroenterol.* 2019;25(32):4629-60.
134. Hashinaga M, Suzuki R, Akada J, Matsumoto T, Kido Y, Okimoto T, et al. Differences in amino acid frequency in CagA and VacA sequences of *Helicobacter*

pylori distinguish gastric cancer from gastric MALT lymphoma. *Gut Pathog.* 2016;8:54.

135. Ogawa H, Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yamamoto K, Nishiumi S, et al. Genetic variants of *Helicobacter pylori* type IV secretion system components CagL and CagI and their association with clinical outcomes. *Gut Pathog.* 2017;9:21.

136. Aftab H, Miftahussurur M, Subsomwong P, Ahmed F, Khan AKA, Matsumoto T, et al. Two populations of less-virulent *Helicobacter pylori* genotypes in Bangladesh. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182947.

137. Wong EH, Ng CG, Chua EG, Tay AC, Peters F, Marshall BJ, et al. Comparative Genomics Revealed Multiple *Helicobacter pylori* Genes Associated with Biofilm Formation In Vitro. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166835.

138. Yamaoka Y, El-Zimaity H, Gutierrez O, Figura N, Kim J, Kodama T, et al. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology.* 1999;117(2):342-9.

139. Tuan VP, Narith D, Tshibangu-Kabamba E, Dung HDQ, Viet PT, Sokomoth S, et al. A Next-Generation Sequencing-Based Approach to Identify Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Cambodian *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *J Clin Med.* 2019;8(6).

140. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 2018;7:1338.

141. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.

142. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.

143. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013;29(8):1072-5.

144. Pathogenwatch. Centre for Genomic Pathogen Surveillance. A Global Platform for Genomic Surveillance [Available from: <https://pathogen.watch/>].
145. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015;25(7):1043-55.
146. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068-9.
147. Sheppard SK, Jolley KA, Maiden MC. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. *Genes (Basel).* 2012;3(2):261-77.
148. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772-80.
149. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(14):3059-66.
150. Miller MA PW, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 gateway computing environments workshop (GCE). 2010:1-8.
151. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691-3.
152. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W6.

153. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997;388(6642):539-47.
154. Ediriweera TK, Manjula P, Cho E, Kim M, Lee JH. Application of next-generation sequencing for the high-resolution typing of MHC-B in Korean native chicken. *Front Genet*. 2022;13:886376.
155. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*. 2003;5(6):395-404.
156. Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(2):137-49.
157. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*. 2001;42(5):1337-48.
158. Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic Variation within *Helicobacter pylori* babA and babB. *Infect Immun*. 2001;69(2):1160-71.
159. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, et al. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol*. 2002;168(6):3033-41.
160. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 2002;297(5581):573-8.
161. Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Del Giudice G, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol*. 2003;33(4):840-9.

162. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7533-8.
163. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004;53(9):1374-84.
164. Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3166-70.
165. Chu A, Wang D, Guo Q, Lv Z, Yuan Y, Gong Y. Molecular detection of *H. pylori* antibiotic-resistant genes and molecular docking analysis. *FASEB J*. 2020;34(1):610-8.
166. Zhang S, Wang X, Wise MJ, He Y, Chen H, Liu A, et al. Mutations of *Helicobacter pylori* RdxA are mainly related to the phylogenetic origin of the strain and not to metronidazole resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(11):3152-5.
167. Domanovich-Asor T, Motro Y, Khalfin B, Craddock HA, Peretz A, Moran-Gilad J. Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance Genotype-to-Phenotype Agreement in *Helicobacter pylori*. *Microorganisms*. 2020;9(1).
168. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, et al. Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*. 2006;11(4):243-9.
169. Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R, Graham DY. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in *GyrA*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81(4):251-5.
170. Jorgensen MA, Trend MA, Hazell SL, Mendz GL. Potential involvement of several nitroreductases in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Arch Biochem Biophys*. 2001;392(2):180-91.

171. Atherton JC, Peek RM, Jr., Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1997;112(1):92-9.
172. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*. 1998;3(4):241-53.
173. Sheh A, Chaturvedi R, Merrell DS, Correa P, Wilson KT, Fox JG. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* determines host-adaptive responses upon coculture with gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2013;81(7):2468-77.
174. de Sablet T, Piazzuelo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011;60(9):1189-95.
175. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007;445(7130):915-8.
176. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(9):829-34.
177. Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, et al. *Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*. 2020;10(1).
178. Ahmadzadeh A, Ghalehnoei H, Farzi N, Yadegar A, Alebouyeh M, Aghdaei HA, et al. Association of *CagPAI* integrity with severeness of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastritis. *Pathol Biol (Paris)*. 2015;63(6):252-7.
179. Kauser F, Khan AA, Hussain MA, Carroll IM, Ahmad N, Tiwari S, et al. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5302-8.

180. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Stankova P, Gergova G, Mitov I. Status of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island (cagPAI) integrity and significance of its individual genes. *Infect Genet Evol.* 2018;59:167-71.
181. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2013;19(45):8192-202.
182. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, 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(22):14428-33.
183. Atrisco-Morales J, Martinez-Santos VI, Roman-Roman A, Alarcon-Millan J, De Sampedro-Reyes J, Cruz-Del Carmen I, 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):314-24.
184. Vianna JS, Ramis IB, Halicki PC, Gastal OL, Silva RA, Junior JS, et al. Detection of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA in gastric biopsy specimens and its relation to gastric diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83(2):89-92.
185. Chauhan N, Tay ACY, Marshall BJ, Jain U. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. *Helicobacter.* 2019;24(1):e12544.
186. Boquet P, Ricci V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiol.* 2012;20(4):165-74.
187. Keikha M, Ali-Hassanzadeh M, Karbalaei M. Association of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):266.
188. Roman-Roman A, Martinez-Carrillo DN, Atrisco-Morales J, Azucar-Heziquio JC, Cuevas-Caballero AS, Castanon-Sanchez CA, et al. *Helicobacter*

pylori vacA s1m1 genotype but not *cagA* or *babA2* increase the risk of ulcer and gastric cancer in patients from Southern Mexico. *Gut Pathog.* 2017;9:18.

189. Cover TL. *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *mBio.* 2016;7(1):e01869-15.

190. Evans DJ, Jr., Evans DG. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter.* 2000;5(4):183-95.

191. Lee DH, Ha JH, Shin JI, Kim KM, Choi JG, Park S, et al. Increased Risk of Severe Gastric Symptoms by Virulence Factors *vacAs1c*, *alpA*, *babA2*, and *hopZ* in *Helicobacter pylori* Infection. *J Microbiol Biotechnol.* 2021;31(3):368-79.

192. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(4):514-33.

193. Domanovich-Asor T, Craddock HA, Motro Y, Khalfin B, Peretz A, Moran-Gilad J. Unraveling antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: Global resistome meets global phylogeny. *Helicobacter.* 2021;26(2):e12782.

194. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(3):343-57.

195. Munoz AB, Trespalacios-Rangel AA, Vale FF. An American lineage of *Helicobacter pylori* prophages found in Colombia. *Helicobacter.* 2021;26(2):e12779.

196. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, et al. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(18):6089-101.

197. Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol.* 2011;11:104.
198. Sato MP, Ogura Y, Nakamura K, Nishida R, Gotoh Y, Hayashi M, et al. Comparison of the sequencing bias of currently available library preparation kits for Illumina sequencing of bacterial genomes and metagenomes. *DNA Res.* 2019;26(5):391-8.
199. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One.* 2014;9(8):e104984.

X. ANEXOS

Anexo 1: Aprobación ética previa



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (DUICT)**

CONSTANCIA 059-03-20

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Epidemiología molecular de los genotipos de virulencia en cepas de *Helicobacter Pylori* aisladas de pacientes dispépticos peruanos".

Código de inscripción : 201182

Investigador principal : Guzmán Velásquez Luis Jesús Junior

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión 1.0 recibido en fecha 22 de enero del 2020

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **21 de enero del 2025**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 22 de enero del 2020.


Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



/s/

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102 
Apartado postal 4314
(511) 319-0000 anexo 201352 
duict@oficinas-upch.pe 
www.cayetano.edu.pe 