

## Artículo original

### Genotipos *vacA* de *Helicobacter pylori* en una población venezolana

Marianella Perrone,<sup>a,\*</sup> Gerardo González-Valencia<sup>b</sup>, Margarita Camorlinga<sup>b</sup>,  
María Correnti<sup>c</sup>, María Eugenia Cavazza<sup>d</sup>, Javier Torres<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

<sup>b</sup>Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, IMSS, Ciudad de México, México

<sup>c</sup>Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela .

<sup>d</sup>Instituto de Biomedicina, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela

Recibido 12 de marzo de 2009; aceptado 30 de junio de 2009

**Resumen:** La infección por *Helicobacter pylori* está asociada con gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma tipo Maltoma, y es considerado un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. El objetivo de este estudio fue caracterizar los genotipos *vacA* de cepas de *H. pylori* provenientes de biopsias gástricas de una población venezolana. Se evaluaron 128 pacientes con indicación de endoscopia, por enfermedad de las vías digestivas superiores. Se obtuvieron biopsias gástricas de cada uno de ellos para la amplificación de *glm* y tipificación de las formas alélicas de *vacA*, empleando la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados demostraron que 82 (64%) de las muestras fueron positivas para la amplificación de *glm*. De estos, 51 (62%) de las cepas tenían el genotipo *vacA*, forma alélica S1 (17 s1a, 29 s1b, 5 s1a+s1b, 10 fueron no tipificables) y 21 (26%) tenían el subtipo S2. El análisis de la región media de *vacA* reveló que 42 (51%) fueron *vacA* m1, 26 (32%) m2 y 14 (17%) no tipificaron para m1 o m2. Los resultados de la presente investigación demostraron una alta frecuencia de infección por *H. pylori* genotipo *vacA* variante alélica s1/m1.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, *vacA*, patogenicidad, virulencia, genotipos, infección mixta

### *Helicobacter pylori vacA* genotypes in a Venezuelan population

**Abstract:** *Helicobacter pylori* infection is associated with gastritis, gastroduodenal ulcer, and Maltoma type lymphoma, and is also considered an important risk factor for the development of gastric cancer. The purpose of this study was to characterize *vacA* genotypes of *H. pylori* strains from gastric biopsies from a Venezuelan population. One hundred and twenty eight patients who required endoscopy due to disease of the upper digestive system were evaluated. A gastric biopsy was taken from each of them for *glm* amplification and typing of the allelic *vacA* forms, using the polymerase chain reaction assay. Results showed that 82 (64%) of the samples were positive for *glm* amplification. Of these, 51 (62%) of the strains had the *vacA* genotype, S1 allelic form (17 s1a, 29 s1b, 5 s1a+s1b, 10 were not typable) and 21 (26%) had the S2 subtype. The analysis of the *vacA* mid region revealed that 42 (51%) were *vacA* m1, 26 (32%) m2, and 14 did not type for m1 or m2. The results of this investigation showed a high frequency of *H. pylori vacA* genotype infections, s1/m1 allelic variants.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, *vacA*, pathogenicity, virulence, genotypes, mixed infection

\* Correspondencia:  
E-mail: mperrone@cantv.net

#### Introducción

*Helicobacter pylori* coloniza persistentemente la mucosa del estómago humano causando gastritis crónica, y es considerado un importante factor de riesgo para la enfermedad gastroduodenal, incluyendo úlcera péptica y carcinoma gástrico. [1-5]. Se han descrito genes bacterianos específicos, que están asociados con la virulencia de este microorganismo [6-8].

La interacción entre la bacteria y el hospedero, es un factor clave que determina las consecuencias clínicas de la infección por *H. pylori*. A este respecto, el sistema inmune juega un papel importante en prevenir o promover la enfermedad [9].

Ha sido propuesto que ciertas cepas de *H. pylori* pueden ser más virulentas que otras, habiéndose identificado algunas características asociadas con la severidad de la enfermedad [1,2].

Entre los factores de virulencia bacterianos responsables de las manifestaciones clínicas, están las adhesinas (BabA, SabA), la citotoxina vacuolizante VacA, y los productos de la isla de patogenicidad Cag. Los patrones de producción de citoquinas en respuesta a la infección por *H. pylori*, constituyen uno de los principales factores del hospedero, que pueden limitar el desarrollo de la infección a una gastritis, o favorecer el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.[10,11].

Aproximadamente entre un 60% a 70% de las cepas de *H. pylori* contiene un gen denominado *cagA* (gen asociado a la citotoxina), que codifica para una proteína de 128 kDa denominada CagA [12]. La presencia de *cagA* está relacionada con ulceración duodenal, atrofia de la mucosa gástrica y cáncer gástrico. Este gen representa una parte de una gran entidad genómica denominada isla de patogenicidad [10], la cual contiene múltiples genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de las cepas de *H. pylori* [13].

Otro factor de virulencia producido por aproximadamente un 50% de las cepas de *H. pylori*, es una citotoxina que induce la formación *in vitro*, de vacuolas en las células mamíferas, que determinan la muerte celular [14]. Esta toxina es codificada por el gen *vacA*, presente en prácticamente todas las cepas de *H. pylori*.

El gen *vacA* tiene una estructura de mosaico y en los Estados Unidos, cada alelo tiene 1 de 3 posibles tipos de regiones señales de secuencia, s1a, s1b, y s2 y uno de dos posibles tipos de región media m1 o m2. Esta estructura de mosaico de este gen ocurre por las diferencias en la producción de citotoxinas entre las cepas. La tipo s1/m1 produce altos niveles de toxina, las cepas tipo s1/m2 producen de bajo a moderado niveles de toxinas activas, mientras que las tipo s2/m2 no producen ninguna toxina activa. Las cepas s2/m1 han sido muy poco reportadas [15].

Las regiones *vacA* s y m parecen tener diferente relevancia clínica. Al respecto, las cepas *vacA* s1a están más asociadas con la presencia de un infiltrado de linfocitos y neutrófilos en la mucosa del antrum, que los tipos s1b o s2. Las cepas *vacA* m1 están más asociadas con daños al epitelio gástrico que las cepas m2, mientras que las úlceras duodenales son más prevalentes en pacientes infectados con cepas tipo s1a, que con pacientes colonizados por cepas tipo s1b o s2 [16].

El objetivo de este estudio fue caracterizar los genotipos *vacA* de cepas de *H. pylori*, provenientes de biopsias gástricas de una población venezolana.

## Materiales y Métodos

**Pacientes:** Se evaluaron 128 pacientes provenientes de tres hospitales, Hospital Universitario y Hospital Vargas, ambos de la ciudad de Caracas, y Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal Dr. "Luis E. Anderson" de la ciudad de San Cristóbal, Edo. Táchira, referidos por presentar enfermedad de las vías digestivas superiores. Se le presentó el consentimiento informado a cada uno de ellos y el protocolo de experimentación fue previamente aprobado por el comité de ética del FONACIT (Consejo Nacional de

Ciencia y Tecnología). A cada sujeto se le realizó una detallada historia clínica. Los criterios de exclusión del presente trabajo fueron, tratamiento con antibióticos y compuestos que contuviesen bismuto u omeprazol, durante dos semanas previas al examen.

**Recolección de las muestras:** De cada uno de los pacientes fueron obtenidas biopsias gástricas de la mucosa del antro mediante endoscopia digestiva superior, para los análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

**Identificación de ADN de *H. pylori* y tipificación de *vacA* usando el ensayo de la RCP:** Las muestras fueron agitadas. La suspensión fue lavada con agua estéril y centrifugada a 12000X g por 3 min. El pellet resultante fue resuspendido en 500µl de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25mM EDTA, 0,5% dodecilsulfato de sodio), y 10 µl de proteinasa K (10mg/ml) fue añadido. La incubación se realizó a 50°C por 20 h; esto fue seguido por la extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol. El pellet resultante fue disuelto en 100 ul de buffer TE (10 mM), Tris-HCl [pH 7.4], 0.1 mM EDTA [pH 8.0] por 20 h a 37° C. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su posterior procesamiento. Los primers o iniciadores usados en este trabajo son presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos iniciadores usados para la tipificación de *vacA*.

Gen y región tipif. Genotipo identif. Designación inic.	Secuencia del primer o iniciador	Tamaño prod. RCP. Pares bases
<i>vacA</i> región media		
m1		
VA3- F	5'-GGTCAAATGCGTCATGG-3'	290
VA3- R	5'-CCATTGGTACCTGTAGAAA-3'	-
m2		
VA4- F	5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3'	352
VA4- R	5'-CATAACTAGCGCCTTGAC-3'	-
<i>vacA</i> región señal		
s1a		
SS1- F <sup>a</sup>	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'	190
S1b		
SS3- F <sup>a</sup>	5'-AGGCCATACCGCAAGAG-3'	187
s2		
SS2- F <sup>a</sup>	5'-GCTAACACGCCAAATGATCC-3'	199
VA1- R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'	
<i>Ure C</i>		
GLMM-F	5'-GGATAAGCTTTTAGGGGTGTAGGG 3'	
GLMM-R	5'-GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC 3'	

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>a</sup> Usados con VA1- R.

El método para la tipificación de la secuencia señal *vacA* y la región media fue ligeramente modificado del descrito

por Atherton y col. [16]. Todas las mezclas para la RCP consistieron en 1 µl del ADN, Buffer RCP 1X (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada deoxinucleótido (Gibco BRL), 0.5 µM de cada primer específico, y 1.25 U de Taq polimerasa (Gibco BRL) en un volumen final de 25 µL.

Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador o sistema de amplificación (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Las condiciones para la RCP fueron de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 6 min.

Como control positivo fueron usadas las siguientes cepas específicas, 8822 (*vacA* s2m2) y 8823 (*vacA* s1m1) (ATCC 49503), *vac A* s1a/m1; *vac A* s2/m2; y 84-183 (ATCC 53726), *vac A* s1/m1 y como control negativo muestra sin ADN y ADN de genotipos diferentes.

Los productos amplificados de la RCP fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, 5 µl de cada producto amplificado, fueron añadidos a 1 µl de buffer de muestra (20 ml de glicerol 50%, 25 mg de azul de bromofenol, 3 gotas de 1 N NaOH) realizándose la electroforesis con geles de agarosa preparados al 2%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y examinados con luz ultravioleta para la detección del ADN amplificado.

## Resultados

El ADN de *H. pylori* fue detectado en 82/128 (64%) de los pacientes. La frecuencia de los diferentes tipos alélicos de *vacA*, los resultados demostraron de los 82 pacientes positivos para *H. pylori* por amplificación de *glm*, 51 (62%) de las cepas tenían el genotipo *vacA*, forma alélica s1, el cual fue mucho más frecuente que el s2, que estuvo presente en 21/82(26%) de los sujetos evaluados. Con respecto a las formas alélicas, los alelos tipo s1b fueron los más frecuentemente encontrados 29/51, seguidos de s1a (17/51), los no tipificables (10/21) y más de una forma alélica fue identificada en 5 pacientes, que presentaron conjuntamente s1a+s1b. El análisis de la región media de *vacA* reveló que 42(51%) fueron *vacA* m1, 26 (32%) m2 y 14 (17%) no tipificaron para m1 o m2.

En referencia a la frecuencia de combinación de los diferentes tipos alélicos de *vacA* y regiones medias en las biopsias gástricas evaluadas, se pudo observar que la combinación más frecuente fue s1bm1 en 23/82 pacientes (28%), seguido de 19/82 (23%) que no fueron tipificables, 15/82 (18%) s2/m2, 10/82 (12%) s1am1, 6/82 (7%) S1b/m2, 4/82(5%) s1a/m2 y ninguno fué s2/m1. Se observó la infección con más de una cepa de *H. pylori*, en 4/82 (5%) se detectó s1a+ s1b/m1 y en otro paciente s1a+s1b/m2. (Tabla 2).

## Discusión

La infección por *H. pylori* causa una variedad de enfermedades gastroduodenales. El papel que juegan los genotipos *vacA* y *cagA* en la patogénesis de la enfermedad gastroduodenal, es un punto ampliamente debatido y muy controversial hasta el presente.

Tabla 2. Frecuencia de combinaciones de tipos alélicos de *vacA* y regiones medias de *H. pylori* en biopsias gástricas de una población venezolana determinados por RCP.

Genotipo	N= 82
s1a/m1	10 (12 %)
s1a/m2	4 (5 %)
s1b/m1	23 (28 %)
s1b/m2	6 (7 %)
s1a + s1b/m1	4 (5 %)
s1a + s1b/m2	1 (1 %)
s2/m1	0
s2/m2	15 (18 %)
No tip.	19 (23 %)

Atherton y col [15], realizan el primer reporte de la existencia de tres familias diferentes de secuencias señales de *vacA*, (s1a, s1b, s2) y de dos diferentes familias de los alelos de la region media (m1 y m2). Los autores refieren que los genotipos *vacA* son mosaicos de las secuencias señal y regiones medias y todas las combinaciones posibles de estas regiones, han sido identificadas.

A partir de ese momento, muchas investigaciones han sido realizadas sobre los genotipos de *vacA* de *H. pylori*, demostrándose que s1 y m1 están estrechamente asociados con el nivel de actividad de *VacA in vitro*, así como de sus consecuencias clínicas [16,17,18,19].

Sin embargo, existen resultados contradictorios al respecto, algunas investigaciones señalan que el genotipo *vacA* no permite predecir la virulencia de la cepa de *H. pylori* o sus consecuencias clínicas, sugiriendo que la correlación reportada, puede ser debida a la prevalencia de ciertas especies en determinada area geográfica [20], mientras que otros señalan que si existe una asociación [6,11].

Aunque *vacA* está virtualmente presente en todas las cepas de *H. pylori*, sólo cerca del 50% produce *VacA*, que al ser purificada, es capaz de inducir necrosis epitelial gástrica y ulceración, cuando se administra por vía oral a ratones. Estudios *in vitro* han demostrado que *VacA* causa vacuolización masiva y muerte de un número de líneas celulares humanas. [21].

Nuestros resultados demostraron que las biopsias evaluadas presentaron infección con cepas de múltiples tipos de *vacA*. Estos datos son similares a los referidos por otros autores en México [22,23] y en países desarrollados [24-29].

La coexistencia de cepas con diferentes genotipos de *vacA* puede ser explicado de diferentes formas. Una de ellas radicaría en que los genotipos diferentes de *vacA*, podrían ofrecer ventajas no competitivas a las cepas. La segunda de ellas sería que diferentes genotipos, podrían conferir diferentes ventajas que permitirían que las cepas sobrevivieran en nichos ecológicos diferentes dentro de la mucosa gástrica y la posibilidad de recidivas de la infección, después del tratamiento [22].

El riesgo de coinfección o superinfección con múltiples cepas es más alto en países con alta prevalencia de infección por *H. pylori* [22], lo que justificaría nuestros hallaz-

gos, ya que en nuestro país existe una alta prevalencia de infección demostrada, por estudios previos [30,31].

En nuestra investigación observamos una alta prevalencia de *vacA* alelo s1b, seguido de s1a. Estos datos son similares a otros estudios [22,23,32,33]. Sin embargo, en otros reportes se ha señalado predominio de la forma alélica s1a. Es importante resaltar que estos estudios se han realizado en Europa, Sur África y México.

La distribución geográfica de los distintos genotipos de *H. pylori* permanece aún sin dilucidar. La prevalencia de genotipos más patogénicos en ciertas áreas, tiene importantes consecuencias epidemiológicas que pueden estar asociadas con la severidad de la infección [33].

Con respecto a la frecuencia de combinación de los diferentes tipos alélicos de *vacA* y regiones medias en las biopsias gástricas, observamos que s1b/m1 representó la forma más frecuente (28%), seguido de las formas no tipificables (23%), s2/m2 (18%) s1a/m1 (12%), datos estos similares a otros reportes [22, 23].

Estudios previos han sugerido que la actividad citotóxica es más alta en cepas s1a/m1 que en s1a/m2 y prácticamente ausente en s2/m2 [15,16].

Referente a las muestras no tipificables encontradas en esta investigación, podría sugerir la existencia de subfamilias adicionales de las formas alélicas s y m, que no son reconocidas por los iniciadores disponibles en la actualidad.

Los resultados de la presente investigación demostraron una alta frecuencia de infección por *H. pylori* genotipo *vacA* forma alélica s1/ m1.

## Agradecimiento

Instituto Mexicano del Seguro Social.

## Referencias

- Graham DY, Go M. *Helicobacter pylori*: current status. *Gastroenterol.* 1993; 105: 279-82.
- Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DAF, West AP, Mapstone NP *et al.* *Helicobacter pylori* and dental care. *Gut.* 1995; 37: 44-6.
- Hopkins R, Girardi LS, Turney EA. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and Gastric ulcer recurrence: A Review. *Gastroenterol.* 1996; 110: 1244-52.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 720-41.
- Parsonett J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Prittkin J, Chang Y. *Helicobacter pylori* infection in intestinal-and diffuse- type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1991; 83: 640-3.
- Atherton, JC. The clinical relevance of strains types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997; 40: 701-3.
- Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question to mucosal damage? *Ann Med.* 1995; 27:559-63.
- Mobley, H.L. Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. *Am J Med.* 1996; 100: 2S-11S.
- Huang-Jian L, Jing X, Yang B, De Eang J, Zhang Y, Yuan D: Pathogenicity and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene in knockout homogenic mutants. *World J Gastroenterol.* 2004; 10:3289-91.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuori R, Covacci A..*Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 93:14648-53.
- Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Inter Med.* 2008; 47:1077-83.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 14559-64.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, A, Broeck M, Sousa JC, Carneiro F and Quint WG: Typing of *Helicobacter pylori vacA* and Detection of *cagA* Gene by PCR Reverse Hibridization. *J Clin Microbiol.* 1998; 365: 1271-6.
- Leunk RD, Johnson BT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 1988; 26:93-99.
- Atherton JC, Cap P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* : association of specific *vacA* type with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995; 270: 17771-7.
- Atherton JC, Cio P, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance on heterogeneity in *vacA* , the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1997; 112: 92-9.
- Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* 2002; 517:180-4.
- Wada A, Yamasaki E, Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, Vac A, is responsible for gastric ulceration. *J Biochem.* 2004; 136: 741-6.
- Xiang Z, Censini S, Bayeli P, Telford J, Nigura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun.*1995; 63: 94-8.
- Zhang Y, Houyu L, Kang Z. Lack of correlation of *vacA* genotype, *cagA* gene of *Helicobacter pylori* and their expression products with various gastroduodenal disease. *Chin Med J.* 2001; 114:703-6.
- Lupetti P, Heuser J, Maniti R. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.* 1996; 133: 801-7.
- Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton J, López-Vidal Y. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3001-4.
- González-Valencia G, Atherton J, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo-de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes in Mexican Adults and Children. *J Infect Dis.* 2000; 182:1450-4.
- Go M, Kapur D, Graham Y, Mussser J. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme elec-

- trophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol.* 1996; 178: 3934-8.
25. Hirschl A, Ritcher M, Makristathis A. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J Infect Dis.* 1994; 170:473-5.
  26. Taylor N, Fox J, Akopyants N. Long-term colonization with single and multiple strain of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:918-23.
  27. Jorgensen M, Daskalopoulos G, Warburton V. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. *J Infect Dis.* 1996; 174: 631- 5.
  28. Marshall D, Chua A, Keeling N, Sullivan D, Coleman D, Smyth C. Molecular analysis of *Helicobacter pylori* populations in antral biopsies from individual patients using randomly amplified polymorphic DNA (RADP) fingerprinting. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995; 10: 317-24.
  29. Taylor N, Fox J, Akopyants N. Long term colonization with single and multiple strain of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 918-23.
  30. De Sousa L, Vasquez L, Velasco J, Parlapiano D. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. *Invest Clin.* 2006; 47: 109-16.
  31. Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazzi C, Goncalvez R, Lecuna V. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J Med Microbiol.* 2002; 51:764-70.
  32. Kidd M, Lastovica A, Atherton J, Louw J. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut.* 1999; 45: 499-502.
  33. Genta R, Gurer I, Graham Y. Geographical pathology of *Helicobacter pylori* infections: is there more than one gastritis? *Ann Med.* 1995; 27: 595-9.