

PRESENCIA DE UN POSIBLE NUEVO PATÓGENO GÁSTRICO, CANDIDATUS WOHNE AFRICANUS, EN UN PACIENTE VENEZOLANO

Maria García Amado*, Mónica Contreras*, Samantha Cedeño W*. Abu Al Soud**, T. Wadstrom**, Pulchérie Gueneau*.

*Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Miranda, Venezuela.

**University, Lund, Sweden.

RESUMEN

Reportamos el caso de un paciente que sufre de síntomas recurrentes de dispepsia desde el año 1997, pero no está infectado por *Helicobacter pylori*, el agente etiológico de la gastritis en humanos. El diagnóstico de *H. Pylori* fue realizado por tres métodos: histología, test de ureasa rápido en biopsia gástrica y test de HpSA (Meridian Diagnostics, Italy) en heces.

La detección de *Candidatus W. africanus* fue realizada a partir de ADN de jugo gastroesofágico colectado con un Enterotest (HDC, USA), utilizando un ensayo de PCR con cebadores específicos para el género *Helicobacter*. El producto amplificado fue analizado mediante un gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) y posteriormente fue secuenciado. Encontramos que este paciente está infectado con *Candidatus Wolinella africanus*, un posible nuevo patógeno del tracto digestivo humano, el cual ha sido reportado por primera y única vez en Diciembre 2003 en pacientes Surafricanos con cáncer de esófago.

SUMMARY

We reported the case of a patient who suffers of recurrent symptoms of dyspepsia since 1997, but is not infected by *Helicobacter pylori*, the etiological agent of gastritis in humans. Diagnose of *H. Pylori* was made by three methods: histology, fast ureasa test in gastric biopsy and HpSA test (Meridian Diagnostics, Italy) in feces. The detection of *Candidatus W. africanus* was made from DNA of gastroesophageal juice collected with a Enterotest (HDC, USA), using a PCR test with specific boots for *Helicobacter* gender. The amplified product was analyzed by means of an electrophoresis gel in denatured gradient (DGGE) and later sequenced. We found that this patient is infected with *Candidatus Wolinella africanus*, a possible new pathogen of the human digestive tract, which has been reported for the first and only time in December 2003 in south African patients with esophageal cancer.

INTRODUCCIÓN

El género *Wolinella* esta representado actualmente por una sola especie encontrada en el rumen de bovinos denominada *Wolinella succinogenes* (Wolin et al. 1961). El género *Wolinella* pertenece a la subclase épsilon de las proteobacterias y junto con el género *Helicobacter* forman la Familia *Helicobacteraceae*.

Originalmente *Wolinella succinogenes* fue descrita como un simbiote del rumen de bovinos. La secuencia del genoma de *Wolinella succinogenes* mostró que ésta especie posee un gran número de genes de virulencia homólogos con *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*, lo cual cuestiona su carácter de organismo no patógeno (Baar et al. 2003). Recientemente en Sudáfrica, se describió una posible nueva especie de *Wolinella* asociada a cáncer de esófago, mediante la secuencia parcial del gen del ARNr 16S (Bohr et al. 2003). Los autores no pudieron cultivar esta especie y la denominaron *Candidatus Wolinella africanus*. El objetivo de este estudio es reportar la presencia de *Candidatus Wolinella africanus* en el jugo gastro-esofágico de un paciente venezolano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Paciente: El paciente es una mujer venezolana de 27 años de edad que muestra síntomas de dispepsia desde 1997. La paciente fue informada de los objetivos de nuestro estudio, donó muestras de heces y jugo gástrico, y autorizó la publicación de los resultados.

Métodos de detección de la infección por *H. pylori*: Los métodos utilizados para detectar una posible infección por *H. pylori* en el paciente fueron: histología y test de ureasa rápido en biopsia gástrica (Pacheco 2001), test de detección de antígenos en heces HpSA (Meridian Diagnostics, Italia), y detección por PCR en ADN de jugo gastro-esofágico con cebadores específicos del gen *ureA* (Dominguez-Bello et al. 2001), y detección en ADN de jugo gastro-esofágico por PCR-DGGE con cebadores específicos del género *Helicobacter* (Dominguez-Bello et al. 2001, Al-Soud et al., 2003).

Método de detección de la infección por *Candidatus Wolinella africanus*: La detección de *Candidatus Wolinella africanus* fue realizada utilizando ADN de jugo gastro-esofágico colectado con un Enterotest (FIDC, USA) (Dominguez-Bello et al. 2001). Las condiciones de PCR, DGGE y secuenciación fueron descritas por Al-Soud y colaboradores (Al-Soud et al. 2003). El fragmento obtenido por PCR-DGGE fue secuenciado y la secuencia fue comparada con las secuencias de la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Brevemente, se amplifica una región del gen del ARNr 16S con cebadores específicos del género *Helicobacter*, y el producto amplificado es analizado en un gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), el cual separa los amplicones por su contenido en CC, y permite detectar infecciones múltiples por diferentes especies de un mismo género. El patrón de movilidad en el gel esta compuesto por amplicones obtenidos con los mismos cebadores a partir ADN de diversas especies conocidas de *Helicobacter*, incluyendo *H. pylori*. Las bandas separadas se extraen del gel y se secuencian directamente.

RESULTADOS

El caso reportado en este estudio es de una mujer venezolana de 27 años de edad con síntomas de dispepsia desde el año 1997. Todos los métodos de diagnóstico específico para *H. pylori* y para *Helicobacter* sp. fueron negativos, y la paciente nunca recibió ningún tratamiento antibiótico contra *H. pylori*. Los síntomas de dispepsia reaparecen periódicamente al menos una vez al año y son tratados con ranitidina.

La Figura 1 muestra los resultados de la detección de la infección por *Helicobacter* sp. por PCR en un gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE) (Al-Soud et al. 2003). En la muestra del paciente que nos interesa, aparece una banda (señalada con una flecha roja) con un contenido de CC diferente al patrón de referencia (M) compuesto por amplicones obtenidos de diversas especies de *Helicobacter*, incluyendo *H. pylori*. La secuencia de la banda es idéntica (99% identidad) con la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de *Candidatus W. africanus*.

Figura 1. Resultados de la detección por *Helicobacter* spp. Por PCR en un gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE). El asterisco rojo indica el pozo donde fue colocada la muestra de la paciente y la flecha roja indica la banda que fue secuenciada y es 99% idéntica a la secuencia de *Candidatus Wolinella africanus*. El patrón de referencia (M) está compuesto por amplicones obtenidos de diversas especies de *Helicobacter* que se señalan a la derecha del gel. Los demás pozos contienen muestras de otros pacientes, infectados con diferentes especies de *Helicobacter*.

CONCLUSIÓN

Candidatus W. africanus ha sido detectado por PCR en pacientes de Sudáfrica con cáncer de esófago y puede ser un nuevo patógeno gástrico emergente (Bohr et al. 2003). Nuestros resultados indican que *Candidatus W. africanus* esta presente en una paciente venezolana con síntomas de dispepsia, la cual no está infectada con *H. pylori*. Sería recomendable determinar la prevalencia de este microorganismo en Venezuela y tratar de cultivar esta bacteria para poder caracterizarla microbiológicamente y bioquímicamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Al-Soud WA, Bennedsen M, On SL, Ouis LS, Vandamme P, Nilsson HO, Ljungh A, Wadstrom T. 2003. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J Med Microbiol.* 52(Pt 9):765-71.
- 2.- Baar C, Eppinger M, Raddatz G, Simon J, Lanz C, Klimmek O, Nandakumar R, Gross R, Rosinus A, Kelier H, Jagtap P, Linke B, Meyer F, Lederer H, Schuster SC. 2003. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20):11690-5
- 3.- Bohr UR, Segal I, Primus A, Wex T, Hassan H, Ally R, Malfertheiner P. 2003. Detection of a putative novel *Wolinella* species in patients with squamous cell Carcinoma of the esophagus. *Helicobacter.* 8(6):608-12.
- 4.- Pacheco, Ni 2001. Detección molecular de infección por *Helicobacter pylori* y del gen bacteriano asociado a virulencia *cagA*, en pacientes Venezolanos. Tesis de maestría, Caracas, Venezuela! -68.
- 5.- Dominguez-Bello, MG., C. Cienfuentes, R. Romero, P. García, I. Gómez, V. Mago, N. Reyes y Gueneau 2001. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. *FEMS Microbiol. Lett.* 198 :15-16.
- 6.- Wolin MJ, Wolin EA, Jacobs NJ. 1961. Cytochrome-producing anaerobic *Vibrio succinogenes*, sp. n. *J Bacteriol.* 81 :911-7.

Para cualquier información o separata contactar a la:

Dra. Pulchérie Gueneau. Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Miranda, Venezuela.

E-mail: pgueneau@ivic.ve

Fecha de Recepción Sep. 2005- Fecha de Revisión Abr. 2006- Fecha de Aprobación. Jun. 2006