



Biomédica
ISSN: 0120-4157
Instituto Nacional de Salud

Caguazango, Juan Camilo; Pazos, Álvaro Jairo
La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con
bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia
Biomédica, vol. 39, núm. 2, 2019, pp. 157-171
Instituto Nacional de Salud

DOI: 10.7705/biomedica.v39i4.4520

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84360542016>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

re^{da}laly^c.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Artículo original

La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia

Juan Camilo Caguazango¹, Álvaro Jairo Pazos^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Salud Pública, Centro de Estudios en Salud, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

² Departamento de Biología, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

Introducción. La inflamación del antro gástrico por *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de úlcera duodenal, y la del cuerpo gástrico puede producir gastritis atrófica e incrementar la probabilidad de cáncer gástrico. Estas reacciones inflamatorias diferenciadas según su localización, podrían explicarse por la composición de la microbiota gástrica asociada con *H. pylori*.

Objetivo. Identificar y comparar la microbiota del antro y del cuerpo del estómago en individuos de dos poblaciones: una con alto riesgo y otra con bajo riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia.

Materiales y métodos. Se incluyeron biopsias del cuerpo y el antro gástrico de pacientes con gastritis no atrófica o con gastritis atrófica y metaplasia. La microbiota se definió por secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S del ARNr de *H. pylori* (illumina-MiSeq™). Las unidades taxonómicas operativas se clasificaron utilizando las bases de datos BLASTn y RDPII. Las diferencias entre las poblaciones microbianas del antro y del cuerpo gástrico se evaluaron mediante el análisis de varianza multivariado con base en permutaciones (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) y análisis multivariados.

Resultados. La clase Epsilonproteobacteria representada por *H. pylori* fue más abundante en las biopsias del antro y del cuerpo de los individuos con gastritis no atrófica (>50 %), en tanto que, en los individuos con gastritis no atrófica, esta clase correspondió al 20 % con una mayor diversidad metagenómica. La infección por *H. pylori* disminuyó significativamente la diversidad metagenómica del antro ($p=0,005$), en comparación con la del cuerpo gástrico.

Conclusiones. Los grupos bacterianos involucrados en la disbacteriosis pueden colonizar ambas regiones topográficas del estómago, independientemente de las reacciones sectorizadas de inflamación. La infección por *H. pylori* asociada con la microbiota gástrica está relacionada con su localización en el estómago, el tipo de lesión y el mayor o menor riesgo de cáncer gástrico, lo que sugiere su importancia en la disbacteriosis y la de esta en la enfermedad gástrica.

Palabras clave: microbioma gastrointestinal; *Helicobacter pylori*; gen 16S del ARNr; metagenómica; neoplasias gástricas.

Microbiota according to gastric topography in patients with low or high risk of gastric cancer in Nariño, Colombia

Introduction: Inflammation in the gastric antrum caused by *Helicobacter pylori* increases the risk of duodenal ulcer while inflammation in the body generates atrophic gastritis and increased risk of gastric cancer. These inflammatory responses according to gastric topography could be explained by the composition of the gastric microbiota associated with *H. pylori*.

Objective: To identify and compare the microbiota of the gastric antrum and body of individuals from two populations, one with high risk and one with low risk of gastric cancer from Nariño, Colombia.

Materials and methods: Biopsies of the gastric antrum and body of patients with non-atrophic gastritis or metaplastic atrophic gastritis were included. The microbiota was defined by sequencing the 16S rRNA gene, V3-V4 region, (illumina-MiSeq™). The operational taxonomic units were classified using the BLASTn and RDPII databases. The differences among microbial populations were evaluated with the PERMANOVA and multivariate analyses.

Results: The Epsilonproteobacteria class represented by *H. pylori* was more abundant in the antrum and body biopsies of individuals with metaplastic atrophic gastritis (>50%) while in individuals with non-atrophic gastritis it was 20 % and had greater metagenomic diversity. *Helicobacter pylori* infection significantly decreases the metagenomic diversity of the gastric antrum ($p=0,005$) compared to that of the body.

Conclusions: The bacterial groups involved in the dysbiosis can colonize both topographic regions of the stomach, regardless of the sectorized inflammation responses. *Helicobacter pylori* infection associated with the gastric microbiota is related to its localization in the stomach, the type of lesion, and the population at risk of gastric cancer, which suggests its importance in microbial dysbiosis and gastric disease.

Keywords: Gastrointestinal microbiome; *Helicobacter pylori*; 16S rRNA gene; metagenomics; stomach neoplasms.

Recibido: 21/05/18

Aceptado: 21/02/19

Publicado: 22/02/19

Citación:

Caguazango JC, Pazos AJ. La microbiota según la topografía gástrica en pacientes con bajo y con alto riesgo de cáncer gástrico en Nariño, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.2):157-71.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4520>

Correspondencia:

Juan Camilo Caguazango, Grupo de Investigación en Salud Pública, Centro de Estudios en Salud, Universidad de Nariño, Calle 18 N° 50-02, Edificio Tecnológico 502, piso 5, 5200001 Pasto, Colombia
Teléfono: (572) 731 2253 y (572) (315) 803 3803
jc2mbiologist@udenar.edu.co

Contribución de los autores:

Ambos autores participaron en las pruebas microbiológicas y moleculares, en la recolección de datos, la interpretación de los resultados y la escritura del manuscrito.

Financiación:

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, Programa Nacional de Ciencias Básicas, Contrato N° FP44842-205-2015

Conflictos de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

En los estudios previos sobre las alteraciones celulares y tisulares que ocurren en el estómago durante la inflamación crónica de la mucosa gástrica a causa de la infección por *Helicobacter pylori*, se han podido detectar reacciones fisiológicas diferentes según su localización en el estómago y el riesgo de desarrollar cáncer (1-4). Cuando la gastritis predomina en la región del antro, la producción de ácido gástrico (hiperclorhidria) y el riesgo de presentar úlcera duodenal se incrementan, efecto que protege contra el desarrollo de cáncer. Por el contrario, cuando la gastritis predomina en el cuerpo del estómago, la producción de ácido gástrico disminuye (hipoclorhidria) y puede generar una gastritis atrófica, lo cual aumenta el riesgo de cáncer gástrico (3,4).

Asimismo, este desequilibrio gástrico facilita la colonización sectorizada de bacterias que no crecen en un estómago normal (5). La influencia de las bacterias nitrificantes y de otras especies en la disbacteriosis (alteración de la microbiota bacteriana habitual) contribuye a la producción de especies reactivas del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) y especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), las que, conjuntamente con la infección por *H. pylori*, podrían ser determinantes en la patogénesis (6-8).

El surgimiento de los métodos moleculares de secuenciación ha abierto el camino para entender la dinámica de la población bacteriana, así como cada evento secuencial en la aparición y en el desarrollo del cáncer gástrico de tipo intestinal descritos en el modelo general de Correa (7-10).

La hipótesis del presente estudio propone que, independientemente del lugar de origen y del riesgo poblacional de cáncer gástrico, los individuos con enfermedad gástrica presentan un patrón diferencial de la microbiota asociada con el sitio anatómico y que determina diferentes reacciones inflamatorias.

En este estudio, se comparó la microbiota del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica con la de aquellos con gastritis atrófica y metaplasia, todos provenientes de dos poblaciones (Túquerres y Tumaco) del departamento de Nariño (Colombia), en la cuales la prevalencia de la infección por *H. pylori* es similar pero el riesgo poblacional de cáncer gástrico es diferente.

Túquerres es un municipio ubicado a 3.070 msnm en la cordillera de los Andes, donde el riesgo poblacional de cáncer gástrico es alto, con una tasa de incidencia de 150 por 100.000 habitantes. Tumaco es un municipio ubicado en la Costa Pacífica de Nariño, donde el riesgo poblacional de cáncer gástrico es bajo, con una tasa de incidencia de 6 por 100.000 habitantes (11). Las diferencias geográficas, ecológicas, económicas y culturales entre estas dos zonas, permiten determinar las tendencias generales de la variación de la microbiota gástrica en relación con las lesiones precursoras del cáncer gástrico.

Materiales y métodos

Pacientes y recolección de muestras

Se incluyeron 16 pacientes mayores de 40 años, 8 de Túquerres y 8 de Tumaco, todos con síntomas de dispepsia, a los cuales se les practicó una endoscopia digestiva para detectar lesiones premalignas o malignas de la mucosa gástrica (cuadro 1).

Cuadro 1. Información demográfica de los individuos según procedencia, tipo de lesión gástrica, sitio anatómico del estómago e infección por *Helicobacter pylori*

Población	Biopsia	Lesión	Sitio gástrico	Edad (años)	Sexo	Infección por <i>Helicobacter pylori</i>
Tumaco	MB046	GNA	Antro/Cuerpo	59	F	(+)
Tumaco	MB090	GNA	Antro/Cuerpo	48	M	(+)
Tumaco	MB005	GNA	Antro/Cuerpo	50	M	(-)
Tumaco	MB080	GNA	Antro/Cuerpo	43	M	(-)
Tumaco	MB184	GAM	Antro/Cuerpo	44	F	(+)
Tumaco	MB196	GAM	Antro/Cuerpo	72	F	(+)
Tumaco	MB123	GAM	Antro/Cuerpo	61	M	(-)
Tumaco	MB191	GAM	Antro/Cuerpo	59	M	(-)
Túquerres	MB326	GNA	Antro/Cuerpo	51	F	(+)
Túquerres	MB442	GNA	Antro/Cuerpo	62	M	(+)
Túquerres	MB463	GNA	Antro/Cuerpo	58	F	(-)
Túquerres	MB428	GNA	Antro/Cuerpo	53	M	(-)
Túquerres	MB307	GAM	Antro/Cuerpo	59	M	(+)
Túquerres	MB376	GAM	Antro/Cuerpo	60	M	(+)
Túquerres	MB371	GAM	Antro/Cuerpo	61	M	(-)
Túquerres	MB448	GAM	Antro/Cuerpo	58	F	(-)

GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia; F: femenino; M: masculino

Las biopsias utilizadas en este estudio se obtuvieron de un estudio previo del Registro Poblacional de Cáncer de Cali, dirigido por Luis E. Bravo, del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, financiado por Colciencias (contrato RC No1106-408-20549). Se tomaron ocho biopsias de mucosa gástrica. Cuatro (dos del antro y dos del cuerpo) se usaron para el diagnóstico histopatológico de gastritis y su clasificación según el sistema de Sydney (12) y para la detección histológica de *H. pylori* mediante la tinción modificada de Giemsa; las otras cuatro (dos del antro y dos del cuerpo) se usaron para el aislamiento de *H. pylori* (13) y la extracción de ADN total para la determinación de la microbiota gástrica. Estas últimas, para el estudio de la microbiota, se codificaron como (Bx1) cuando procedían de la curvatura menor del antro y como (Bx10) cuando procedían de la pared anterior media del cuerpo gástrico.

Extracción de ADN

Las biopsias gástricas preservadas a -70 °C se sometieron a un proceso de descongelación según los protocolos de la cadena de frío. Después de la maceración, se siguió el protocolo de extracción de ADN genómico del estuche QIAamp DNA Minikit™ (Qiagen). La calidad y la pureza del ADN se verificaron por espectrofotometría (NanoDrop ND 2000-Thermo Scientific™).

Secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico y procesamiento de datos

La región V3-V4 del gen 16S del ARN ribosómico (ARNr) se amplificó por PCR usando los iniciadores 349 F (5'-CCTAGCGGNBGCASCAG-3') y 805 R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') (14). Los productos purificados se secuenciaron usando el estuche de reactivos MiSeq™ (2 x 300 pb) para lecturas emparejadas, según las pautas del fabricante, procedimiento que se hizo en el Laboratorio de Investigación Molecular MR DNA usando un pipeline estándar disponible en www.mrdnalab.com (Shallowater, TX, USA).

En las lecturas de las secuencias se removieron los códigos de barras y los cebadores, luego se eliminaron las secuencias cortas (<200 pb), así

como las secuencias con bases ambiguas y las secuencias con ejecuciones de homopolímeros superiores a 6 pb. Las lecturas tamizadas se agruparon en unidades taxonómicas operativas con una divergencia del 3 % (97 % de similitud), seguidas por la eliminación de las secuencias de única instancia (*singleton*) y las quimeras (15,16).

Las unidades taxonómicas operativas finales se clasificaron taxonómicamente utilizando la herramienta BLASTn y se compararon con una base de datos curada derivada de la de RDPII (17) y el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los datos se compilaron en los niveles taxonómicos de abundancia bacteriana absoluta (recuentos) y abundancia relativa (porcentajes).

Análisis de la diversidad metagenómica

La riqueza y la abundancia de las poblaciones microbianas se evaluaron estimando la diversidad alfa de las especies observadas, los índices de Shannon y Simpson y el modelo no paramétrico Chao 1, con el programa Qiime™, versión 1.8.0 (15,16,18).

La composición de la microbiota gástrica se representó en histogramas con los datos de abundancia relativa a nivel taxonómico de clase. Se determinó la composición general de la microbiota, calculando la abundancia promedio en cada sitio anatómico (cuerpo y antro gástrico) según el diagnóstico histopatológico de la lesión (gastritis no atrófica o gastritis atrófica con metaplasia) y la ausencia o presencia de *H. pylori* (*Hp-* o *Hp+*).

Las diferencias entre las poblaciones microbianas se evaluaron mediante el análisis de varianza multivariado con base en permutaciones (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) con 10.000 permutaciones (19). Las unidades taxonómicas operativas compartidas según sitio anatómico, tipo de lesión gástrica y estatus de infección por *Helicobacter* sp., se visualizaron mediante diagramas de Venn a nivel de género.

Se generaron diagramas de cajas y bigotes (*box plot*) para representar la biodiversidad específica evaluada mediante el índice de Shannon, según el tipo de gastritis, la presencia o ausencia de *H. pylori* y el sitio anatómico de la biopsia, y se usó la prueba U de Mann-Whitney.

La tendencia general de agrupamiento según la composición de la microbiota, se evaluó con el método de pares de grupos no ponderados con la media aritmética (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, UPGMA) y un análisis de los componentes principales (20). Para todos los análisis se consideró significativo un valor de *p* menor de 0,05. Los análisis estadísticos se hicieron en el programa Past3™ (21).

Accesibilidad de datos

El set de datos de secuenciación del estudio se encuentra disponible en la plataforma BaseSpace de illumina™ con el nombre de SAM1-51 (<https://basespace.illumina.com/s/NiYmU5ZGwDEB>).

Consideraciones éticas

Esta investigación contó con la aprobación del Comité de Ética Humana de la Universidad de Nariño. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Resultados

Análisis de secuencias de la microbiota gástrica

Se reportaron 32 microbiotas del antro y del cuerpo gástrico de 16 individuos mayores de 40 años provenientes de Túquerres (alto riesgo de cáncer gástrico) y de Tumaco (bajo riesgo de cáncer gástrico), con el set de iniciadores 341F/805R para el análisis de secuencias del dominio V3-V4 del gen 16S del ARN usando el estuche de illumina MiSeq™.

Se analizaron 1.890.135 lecturas y, después del estudio de calidad, se identificaron 1.655.195 secuencias dentro del dominio bacteria. Para el cálculo de los estimadores de diversidad del índice de Shannon, el índice de Simpson y el algoritmo de Chao 1, las muestras se estandarizaron por rarefacción en 15.658 secuencias y se iniciaron en 13.702 secuencias, tomando como punto de corte la muestra más baja (cuadro 2).

Cuadro 2. Datos de secuenciación y estimadores de diversidad

Código	Número de lecturas	Número de OTU observadas	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice de Chao 1
MB005.Bx1	15.161	532	3,03	0,63	1.223
MB005.Bx10	25.718	1.074	5,31	0,91	2.704
MB031.Bx1	36.944	505	4,20	0,80	1.110
MB031.Bx10	60.754	1.077	4,44	0,74	2.952
MB046.Bx1	14.954	447	4,71	0,84	625
MB046.Bx10	13.216	469	5,62	0,88	655
MB123.Bx1	21.644	877	4,85	0,89	2.377
MB123.Bx10	36.235	975	4,40	0,82	2.561
MB134.Bx1	45.976	222	1,33	0,27	516
MB134.Bx10	77.676	190	1,00	0,22	390
MB184.Bx1	55.920	223	1,68	0,35	534
MB184.Bx10	75.414	269	1,83	0,39	648
MB191.Bx1	19.839	439	4,45	0,87	914
MB191.Bx10	113.780	341	3,67	0,79	834
MB196.Bx1	45.731	210	1,57	0,28	353
MB196.Bx10	38.343	182	0,86	0,24	416
MB307.Bx1	131.429	190	1,11	0,26	553
MB307.Bx10	13.277	324	3,05	0,77	591
MB326.Bx1	39.999	211	1,71	0,45	776
MB326.Bx10	144.562	166	1,06	0,26	499
MB371.Bx1	17.893	413	3,92	0,81	802
MB371.Bx10	18.844	592	4,54	0,85	1.343
MB376.Bx1	154.389	270	3,79	0,84	633
MB376.Bx10	34.124	297	2,33	0,54	821
MB428.Bx1	24.360	694	4,87	0,86	1.706
MB428.Bx10	123.816	410	4,41	0,87	988
MB442.Bx1	145.479	195	1,29	0,30	487
MB442.Bx10	15.030	1.866	9,26	0,94	3.084
MB448.Bx1	20.805	822	5,17	0,92	2.190
MB448.Bx10	16.668	484	5,44	0,88	590
MB463.Bx1	31.333	721	5,44	0,95	1.484
MB463.Bx10	25.882	579	3,41	0,73	1.827

OTU: unidades taxonómicas operacionales

Las unidades taxonómicas operacionales se definieron con una divergencia del 3 % (97 % de similitud). Para calcular los estimadores de diversidad, las muestras se sometieron a rarefacción a 15.658 secuencias y se iniciaron en 13.702 secuencias.

Bx1: biopsia de curvatura menor del antro; Bx10: biopsia de pared anterior media del cuerpo

Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica según la población en riesgo de cáncer gástrico

El análisis taxonómico de la microbiota del antro y del cuerpo gástrico de los individuos de Túquerres evidenció una representación de 14 filos, 25 clases, 34 órdenes, 56 familias y 160 géneros, en tanto que el análisis en los individuos de Tumaco arrojó 12 filos, 23 clases, 34 órdenes, 57 familias y 171 géneros. Se reportó un total de 14 filos, 26 clases, 35 órdenes, 59 familias y 182 géneros, de los cuales 36 tuvieron una abundancia mayor de 0,1 %.

En la composición de la microbiota de los individuos positivos para *H. pylori*, dominó la clase Epsilonproteobacteria en el antro y en el cuerpo gástrico, y en los individuos de Túquerres negativos para *H. pylori* y con diagnóstico de gastritis no atrófica dominó la clase Gammaproteobacteria. En los individuos de Tumano con diagnóstico de gastritis no atrófica y negativos para *H. pylori*, la clase Bacilli dominó en los perfiles microbianos del cuerpo gástrico (>60 %), en tanto que en el antro gástrico predominó la clase Betaproteobacteria (>70 %) (figura 1). Se encontraron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago ($p<0,0001$).

Diversidad metagenómica según el diagnóstico histopatológico y el sitio anatómico

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales de las clases halladas en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio variaron. En el cuerpo gástrico de los individuos de Tumaco

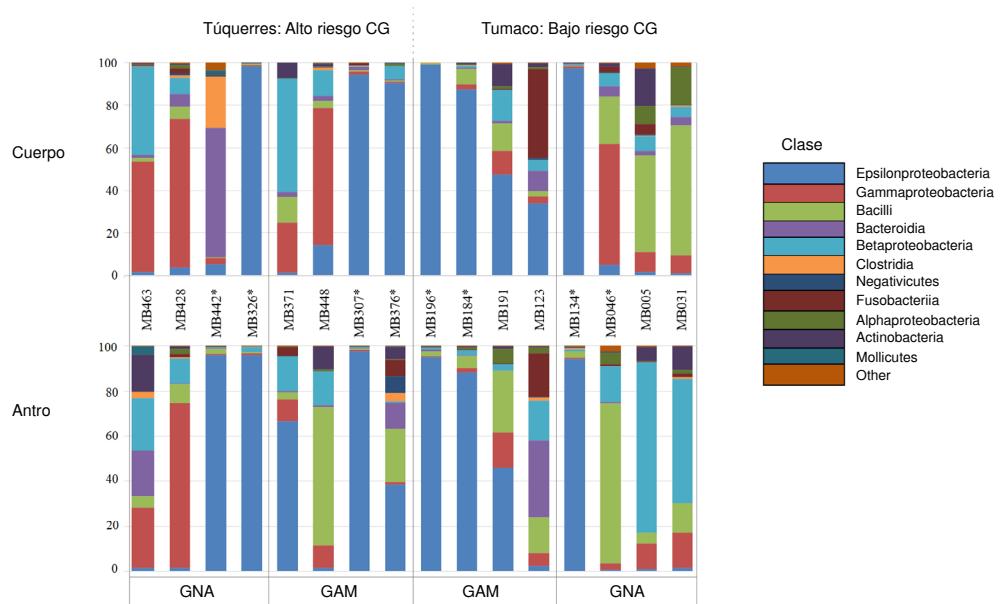


Figura 1. Abundancia relativa de unidades taxonómicas operativas a nivel de clase de la microbiota gástrica según sitio anatómico (cuerpo o antro gástrico) de pacientes con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico. Túquerres: alto riesgo de cáncer gástrico. Tumaco: bajo riesgo de cáncer gástrico. Se observó una mayor composición de clases en el cuerpo y el antro gástrico de los individuos libres de la infección por *Helicobacter pylori*. Por el contrario, la clase Epsilonproteobacteria predominó en las dos regiones gástricas de los individuos infectados (*), dependiendo del tipo de lesión.

CG: cáncer gástrico; GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia

predominó la clase Bacilli, mientras que en el antro gástrico hubo una mayor proporción de la clase Betaproteobacteria, aunque sin diferencias significativas de composición entre las dos regiones anatómicas ($p=0,56$). En el cuerpo gástrico de los individuos de Túquerres predominó la clase Gammaproteobacteria, en tanto que en el antro predominó Epsilonproteobacteria; la comparación de los perfiles de la microbiota gástrica no evidenció diferencias significativas ($p=0,91$). En general, los perfiles microbianos del cuerpo y del antro gástrico en los individuos con gastritis no atrófica no fueron significativamente diferentes ($p=0,62$), sin embargo, la clase Epsilonproteobacteria, en la cual se clasifica *H. pylori*, solo estuvo presente en todos los perfiles en una proporción del 20 % (figura 1).

Los patrones de composición de los perfiles microbianos generales en el antro y en el cuerpo gástrico de los individuos con diagnóstico de gastritis no atrófica de las dos poblaciones de estudio fueron similares. La clase Epsilonproteobacteria, que incluye a *H. pylori*, se observó en ambos sitios anatómicos en una proporción de menos del 50 % en todos los perfiles, y los análisis comparativos de Tumaco, Túquerres y a nivel general no evidenciaron diferencias significativas (PERMANOVA: A $p=0,91$; B $p=0,68$; C $p=0,66$) (figura 1). Con respecto a los resultados globales, según el tipo de gastritis, se encontraron diferencias en la composición de la microbiota acompañante de *H. pylori* entre los individuos con gastritis no atrófica y aquellos con metaplasia intestinal ($p\leq 0,05$).

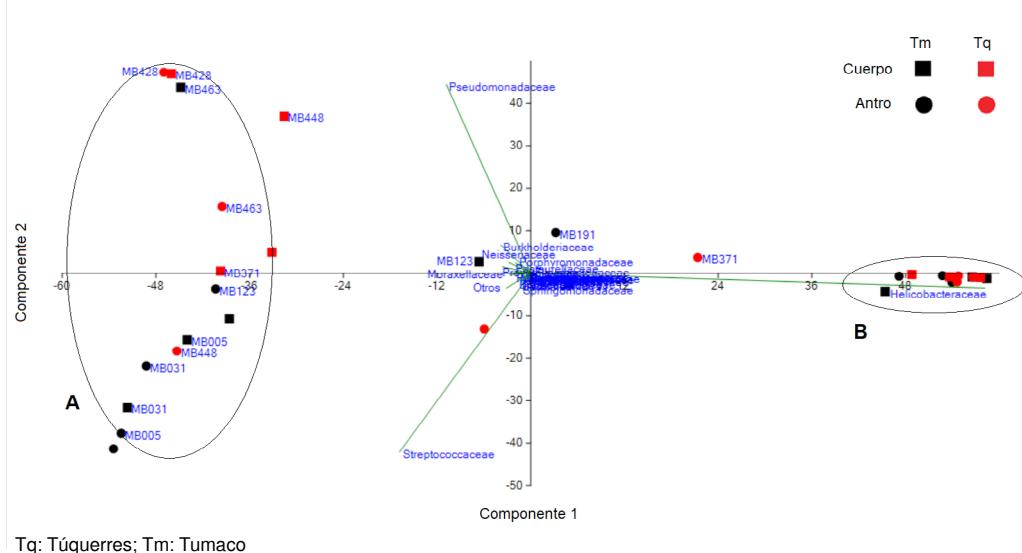
Diversidad metagenómica de la microbiota según la infección por *Helicobacter pylori* y el sitio anatómico

Los perfiles del cuerpo y del antro de los individuos sin la infección por *H. pylori* (*H. pylori*-) evidenciaron un patrón de composición variable representado por las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Bacilli; en los análisis no se encontraron diferencias significativas entre los sitios anatómicos en cada población ni a nivel general (PERMANOVA: A $p=0,4$; B $p=0,34$; C $p=0,84$) (figura 1).

Los perfiles microbianos de clase representativos para el antro y el cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* de las dos poblaciones, presentaron patrones más homogéneos, con una alta proporción de Epsilonproteobacteria (>70 %). La comparación del cuerpo y del antro gástrico no evidenció diferencias significativas entre la composición microbiana del sitio anatómico y la general (PERMANOVA: A $p=0,58$; B $p=0,48$; C $p=0,75$) (figura 1).

Análisis comparativo de biopsias de la mucosa gástrica según la composición microbiana

El análisis de los componentes principales se hizo con los datos de abundancia relativa a nivel de familia. El 80 % de la varianza de los datos se explicó con base en los dos primeros componentes, lo que generó dos grupos principales. La tendencia del agrupamiento A se definió por la presencia de las familias Streptococcaceae y Pseudomonadaceae, con una carga del 70 % (PC2, componente principal 2), en tanto que el grupo B se definió por la presencia de la familia Helicobacteraceae con la infección por *H. pylori* en un 94 % (PC1, componente principal 1), independientemente del lugar de procedencia, del sitio anatómico y del tipo de lesión gástrica (figura 2).



Tq: Túquerres; Tm: Tumaco

Figura 2. Análisis de componentes principales en función de la abundancia relativa de familias según sitio anatómico y población en riesgo de cáncer gástrico. Túquerres, alto riesgo de cáncer gástrico, en color rojo. Tumaco, bajo riesgo de cáncer gástrico, en color negro. Solamente los individuos negativos para *Helicobacter pylori*, según la tinción de Giemsa, se etiquetaron con el código de la muestra. En el cuerpo gástrico: microbiota marcada con cuadros; en el antró: microbiota marcada con círculos. En el análisis de componentes principales se diferenciaron dos grupos, independientemente del tipo de lesión gástrica. La variable que influyó para separar el primer grupo correspondió a la familia Helicobacteraceae, con una carga del 94 %, en tanto que la separación del grupo dos se hizo por la presencia de las familias Streptococcaceae y Pseudomonadaceae, presentes, sobre todo, en individuos sin la infección.

Discusión

En este estudio se determinó la diversidad metagenómica de la microbiota gástrica de individuos de dos poblaciones de Colombia ya conocidas por su riesgo opuesto para cáncer gástrico (5): Túquerres, con alto riesgo, y Tumaco, con bajo riesgo. La hipótesis de trabajo propuso que las respuestas fisiológicas frente a la gastritis diferenciada según el sitio anatómico del estómago, se deben a una disbacteriosis particularmente diferente. Se comparó la microbiota gástrica del antró (Bx1) y del cuerpo (Bx10) del estómago para determinar los patrones de composición asociados con el estado de la mucosa gástrica según el diagnóstico histológico y el estatus de infección por *H. pylori*.

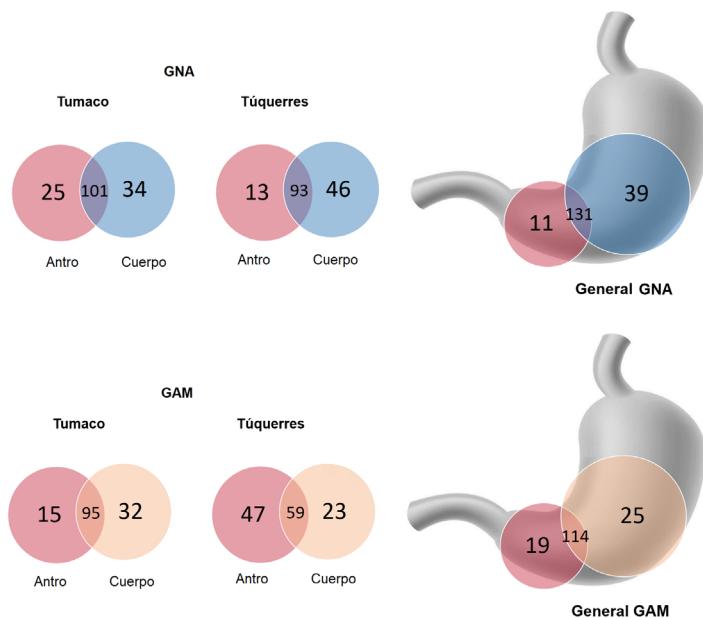
La gastritis no atrófica es una reacción inflamatoria de la mucosa gástrica que se presenta con acumulación de linfocitos y células plasmáticas, y cuyo predominio según la región topográfica del estómago conduce a resultados clínicos y patológicos diferentes (22). Cuando la gastritis se presenta en el antró, la producción de ácido y la predisposición al desarrollo de úlcera duodenal aumenta, reduciéndose, así, el riesgo de cáncer gástrico, en tanto que la gastritis en el cuerpo del estómago disminuye la secreción de ácido y predispone al desarrollo del cáncer gástrico (23-26).

Atendiendo a dicho planteamiento, se compararon estos sitios anatómicos en individuos de Túquerres y de Tumaco. Se observaron patrones de composición microbiana variables y sin diferencias significativas. Se considera que *H. pylori* es la principal causa de la gastritis no atrófica (22), y en el análisis general la proporción de la clase Epsilonproteobacteria fue similar a la de otras unidades taxonómicas operativas. En Tumaco, *Lactococcus lactis* fue más representativa en el antró y *Burkholderia manan*,

en el cuerpo gástrico, en tanto que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo correspondieron a *Pseudomonas putida* (figura 1). Más del 60 % de los géneros identificados se encontró tanto en el antro como en el cuerpo gástrico (figura 3).

Si bien no se encontraron diferencias en la composición de la microbiota gástrica entre el cuerpo y el antro gástrico de los individuos de las dos poblaciones estudiadas, sí se observaron diferencias significativas en el perfil de la microbiota acompañante de *H. pylori* según la población en riesgo de cáncer gástrico, independientemente del sitio topográfico del estómago ($p<0,0001$), resultados que concuerdan con lo encontrado por Yang, *et al.*, en poblaciones similares (9). El efecto de la infección en la composición de la microbiota gástrica según la población en riesgo de cáncer gástrico sugiere que las unidades taxonómicas operativas que conforman los perfiles de la microbiota acompañante se asocian con el riesgo de la enfermedad.

Lactococcus lactis es una bacteria de uso en la industria láctea cuya presencia en individuos con cáncer gástrico incrementa (27) y que se asocia con otros tipos de malignidad en pacientes inmunocomprometidos (28). El papel del lactato potencia la inflamación y su producción aumenta en el metabolismo de las células cancerígenas (29,30). Si bien las bacterias ácido lácticas son beneficiosas para el intestino (31), debe estudiarse más la relación del metabolismo fermentativo y el ácido láctico bacteriano exógeno con el proceso de digestión en los casos de gastritis o lesiones precursoras de cáncer gástrico. No hay reportes de asociación de *B. mana* y *P. putida* con las enfermedades gástricas.



GNA: gastritis no atrófica; GAM: gastritis atrófica con metaplasia

Figura 3. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y tipo de lesión gástrica en las dos poblaciones opuestas en cuanto al riesgo de cáncer gástrico. Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama en la población de Túquerres y en la de Tumaco, y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis no atrófica. Parte inferior: diagrama de las poblaciones de Túquerres y de Tumaco y general de las unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos con gastritis atrófica con metaplasia. Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron 97 % de similitud.

La microbiota de los individuos con gastritis atrófica y metaplasia de las dos poblaciones no evidenció diferencias entre el cuerpo y el antro del estómago. En este tipo de lesión precancerosa el reemplazo de las glándulas gástricas por criptas tubulares rectas y células absorbentes y caliciformes (22) es un cambio que homogeniza las condiciones fisiológicas del ambiente gástrico en ambas regiones debido a la atrofia de las glándulas secretoras de ácido, incrementando progresivamente el espectro de bacterias externas que pueden formar colonias (32,33). La alta proporción de Epsilonproteobacteria (>50 %) evidencia su influencia en la malignidad (figura 1). Más del 40 % de los géneros identificados estaban presentes en el cuerpo y en el antro (figura 3).

En Tumaco las unidades taxonómicas operativas representativas halladas en el antro y en el cuerpo gástrico fueron *Fusobacterium periodicum*, *Haemophilus parainfluenzae* y *L. lactis*, en tanto que en Túquerres, en el antro lo fueron *Streptococcus salivaris* y *Prevotella spp.*, y en el cuerpo gástrico, *Neisseria sicca* y *H. parainfluenzae*. Estas bacterias se han descrito como parte normal de la microbiota oral y de las vías respiratorias con potencial patogénico en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, y su presencia estaría asociada con el aumento del pH como consecuencia de la hipoclorhidria (10,24,32-34).

A pesar de que los métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori* empleados (tinción de Giemsa y cultivo) no detectaron la bacteria en individuos negativos para *H. pylori*, mediante secuenciación metagenómica se registraron lecturas en un rango que abarcó desde muy poca abundancia de *H. pylori* hasta una considerable, especialmente en las muestras MB123 y MB191, lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (10,35,36).

Debido a este fenómeno, se hicieron los análisis de la microbiota en individuos negativos para *H. pylori*, pues factores como la baja carga bacteriana, la distribución heterogénea de *H. pylori* en el estómago y otros asociados con el huésped (gastritis activa, consumo de alcohol, uso de antagonistas de los receptores H₂, inhibidores de la bomba de protones, antibióticos, etc.), serían elementos comunes que influyeron en los resultados (37,38). En este caso, se observaron patrones microbianos heterogéneos de composición similar tanto en el antro como en el cuerpo gástrico, lo cual se evidenció por la diversidad metagenómica en ambos sitios anatómicos.

En los perfiles microbianos, la proporción de la clase Epsilonproteobacteria fue de <20 %, pero en Tumaco las unidades taxonómicas operativas representativas del antro y del cuerpo fueron *L. lactis* y *F. periodicum*, mientras que en Túquerres fueron *P. putida* y *B. mana*.

El presente análisis sugiere que, aunque la proporción de la infección por *H. pylori* fue baja, la actividad de la ureasa, que neutraliza el ácido del estómago, puede generar un ambiente más favorable para la colonización progresiva de bacterias externas (5,32,35). El papel de otras bacterias diferentes a *H. pylori* en el proceso inflamatorio y la enfermedad gástrica es un tema de debate; sin embargo, los subproductos de distintos tipos de metabolismo bacteriano podrían incrementar la producción de compuestos dañinos para el ADN, como los N-nitroso, que influyen en la metilación de las células epiteliales (8,39), y constituir un factor complementario en la malignidad. Más del 50 % de los géneros identificados estaban presentes tanto en el cuerpo como en el antro (figura 4).

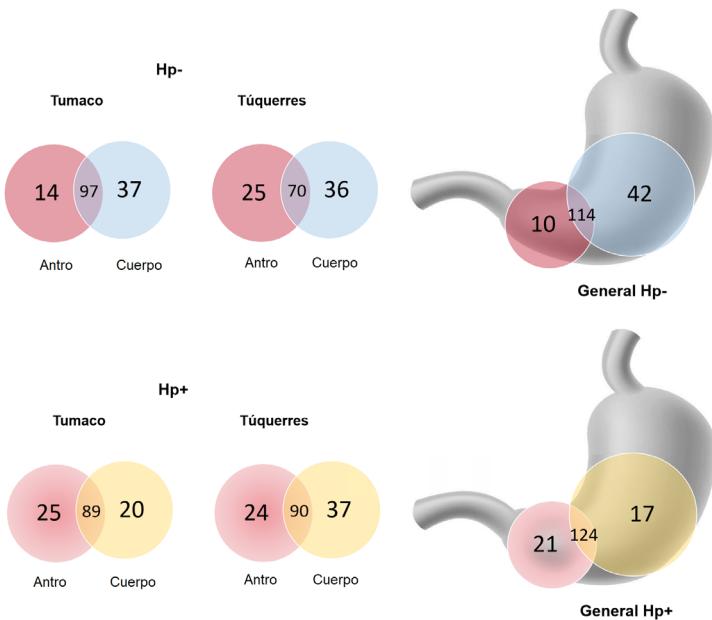


Figura 4. Diagramas de Venn. Unidades taxonómicas operativas a nivel de género y según sitio anatómico y estatus de infección por *Helicobacter pylori* en las dos poblaciones con riesgo opuesto de cáncer gástrico. Las unidades taxonómicas operativas compartidas se pueden ver en las intersecciones de los círculos. Parte superior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos libres de la infección por *H. pylori* (Hp-). Parte inferior: diagrama poblacional de Túquerres y de Tumaco y general de unidades taxonómicas operativas del antro y del cuerpo gástrico de individuos infectados con *H. pylori* (Hp+). Los diagramas de Venn se construyeron con las unidades taxonómicas operativas que presentaron un 97 % de similitud.

Los perfiles de microbiota del antro y del cuerpo gástrico de individuos positivos para *H. pylori* evidenciaron patrones de composición homogénea con un predominio de la clase Epsilonproteobacteria de más del 70 %. Rolig, *et al.* (25), estudiaron en modelos en ratón la capacidad proliferativa de *H. pylori* y describieron el receptor quimiotáctico TlpD como responsable de que la bacteria prolifere en el antro, así como su capacidad quimiotáctica para guiar la bacteria hacia el cuerpo gástrico. Conjuntamente con la motilidad flagelar, la actividad de la ureasa y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) (26), estos elementos se consideran esenciales para la persistencia inflamatoria en distintas regiones de la mucosa del estómago (39,40).

A pesar de que *H. pylori* fue la especie más abundante (figura 1), en Tumaco *L. lactis* se encontró en el antro y en el cuerpo gástrico, en tanto que en Túquerres las unidades taxonómicas operativas representativas en el antro fueron *S. salivaris* y *Prevotella* spp., y en el cuerpo gástrico, *L. lactis*. Además, más del 60 % de los géneros identificados estaban presentes tanto en el cuerpo como en el antro (figura 4).

Con la intención de establecer las tendencias de la microbiota según la presencia de las condiciones estudiadas, se comparó la transición de la gastritis no atrófica a la atrófica metaplásica y el estatus de *H. pylori*, y se observó que la lesión no influyó en la diversidad de la microbiota en el antro y en el cuerpo, donde unas especies microbianas serían reemplazadas por otras manteniendo la diversidad ($p>0,05$; no se presentan los datos), en tanto que la infección por *H. pylori* reduce la diversidad metagenómica en el antro ($p=0,005$) y tiende a limitarla en el cuerpo, aunque no de forma significativa (figura 5).

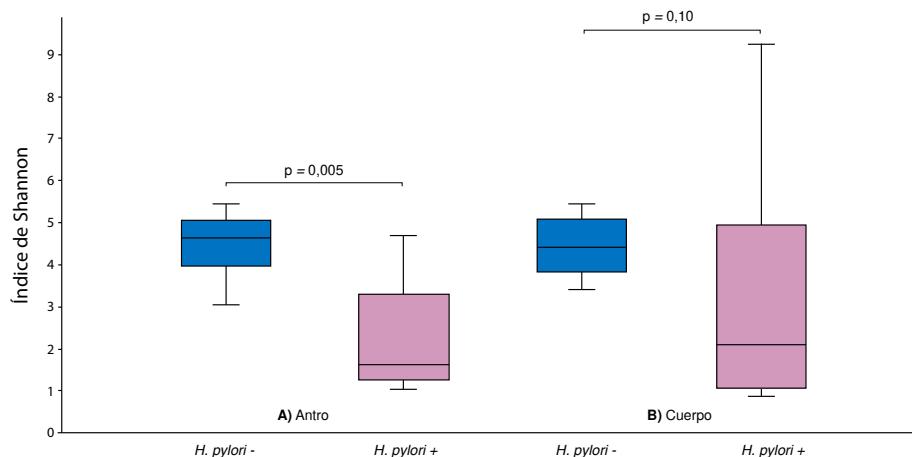


Figura 5. Diversidad metagenómica de la microbiota gástrica: índices de Shannon según infección por *Helicobacter pylori* y sitio anatómico del estómago. **A)** Antro gástrico. **B)** Cuerpo gástrico. En el antro gástrico de individuos positivos para *H. pylori* (*H. pylori* +) la diversidad metagenómica disminuyó significativamente con respecto al grupo de individuos libres de la infección (*H. pylori* -) ($p=0,005$). Aunque se observó una tendencia a la diferenciación de la microbiota en el cuerpo gástrico, los análisis no revelaron diferencias estadísticas en la transición del estatus de *H. pylori* ($p=0,10$; prueba U de Mann-Whitney).

La progresión de la gastritis a lesión precancerosa está asociada con el incremento de la abundancia de *H. pylori*, y dada la aparición de nuevos grupos bacterianos en la carcinogénesis (27,41-43), el mantenimiento del agente patógeno se vería limitado por la posible competencia interespecífica debida a la escasez de recursos (43), por lo cual también depende del estado focal del tejido tumoral o del no maligno (36).

Este estudio permitió identificar microorganismos taxonómicamente comunes o no, participantes en el desarrollo de la enfermedad gástrica según la región anatómica. Aunque el contar con una muestra de mayor tamaño e incluir pacientes con diagnóstico de cáncer complementarían los análisis, se pudo establecer que *H. pylori* es un factor común en la malignidad y en el proceso de disbacteriosis gástrica en individuos con alto y bajo riesgo de cáncer gástrico.

Se resalta la importancia de implementar los métodos de alta sensibilidad para la detección de *H. pylori*, pues independientemente de la carga bacteriana u otros elementos inhibitorios, es necesario tener un diagnóstico certero, con el fin de evitar problemas de responsabilidad médica debido a los falsos negativos (37). Cada vez hay más información que sustenta que la erradicación de *H. pylori* podría restaurar el equilibrio gástrico (36,41-43), por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado son elementos muy valiosos en la prevención del cáncer gástrico (44,45).

En conclusión, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la microbiota asociada con el sitio anatómico, lo que significa que, independientemente de las respuestas fisiológicas sectorizadas en la inflamación, los grupos bacterianos involucrados en la disbacteriosis pueden colonizar tanto el antro como el cuerpo gástrico.

La microbiota acompañante de *H. pylori* se asocia con el riesgo poblacional de cáncer gástrico (bajo en Tumaco y alto en Túquerres), independientemente del sitio del estómago afectado. El incremento de la abundancia de *H. pylori* podría ser un elemento usualmente presente en

la progresión de la gastritis no atrófica a la de tipo atrófico con metaplasia intestinal, por lo tanto, es posible establecer que la disbacteriosis de la microbiota gástrica precedida por el agente patógeno favorece dicha progresión. En el presente estudio se evidenció que la infección por *H. pylori* asociada con la microbiota gástrica se relacionaba con las regiones topográficas del estómago y con el tipo de lesión gástrica, lo que sugiere su importancia en la disbacteriosis microbiana y en la enfermedad gástrica.

Si bien la disminución de la eficacia del tratamiento contra *H. pylori* es un tema de actual preocupación (13,32,41), la modulación de la microbiota gástrica plantea métodos alternativos de investigación para prevenir la carcinogénesis gástrica en individuos infectados con *H. pylori*.

Agradecimientos

Al Registro Poblacional de Cáncer de Cali de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, dirigido por Luis E. Bravo, del Departamento de Patología, y a la Universidad de Nariño, por el apoyo logístico y administrativo en el desarrollo de la investigación.

Referencias

1. Sipponen P, Kekki M, Seppala K, Siurala M. The relationships between chronic gastritis and gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10:103-18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1996.22164011.x>
2. Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:5903-11. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5903>
3. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* 2001;345:784-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa001999>
4. Camargo MC, Anderson WF, King JB, Correa P, Thomas C, Rosenberg P, et al. Divergent trends for gastric cancer incidence by anatomical subsite in US adults. *Gut.* 2011;60:1644-9. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.236737>
5. Sheh A, Fox J. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes.* 2013;4:505-31. <https://doi.org/10.4161/gmic.26205>
6. Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process--first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 1992;52:6735-40.
7. Brawner KM, Morrow CD, Smith PD. Gastric microbiome and gastric cancer. *Cancer J.* 2014;20:211-6. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000043>
8. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J.* 2015;3:255-60. <https://doi.org/10.1177/2050640614566846>
9. Yang I, Woltemate S, Piazuelo MB, Bravo LE, Yépez MC, Romero-Gallo J, et al. Different gastric microbiota compositions in two human populations with high and low gastric cancer risk in Colombia. *Sci Rep.* 2016;6:18594. <https://doi.org/10.1038/srep18594>
10. Avilés F, Vázquez F, Medrano R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep.* 2014;4:4202. <https://doi.org/10.1038/srep04202>
11. Correa P, Cuello C, Duque E, Burbano LC, García FT, Bolaños O, et al. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1027-35.
12. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis. *Am J Surg Pathol.* 1996;20:1116-81.
13. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo L. Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica.* 2012;32:32-42. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000100005>

14. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014;9:e105592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
15. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Hagevoort RG, et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 2008;8:125. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125>
16. Rodríguez TM, Fornaciari G, Luciani S, Dowd SE, Toranzos GA, Marota I, et al. Gut microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean mummy. *PLoS One.* 2015;10:e0138135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138135>
17. Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, et al. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 2001;29:73-4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
18. Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F, Costello E, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7:335-6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
19. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001;26:32-46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
20. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;62:142-60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
21. Hammer Ø, Harper D, Ryan PD. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4: 9-18.
22. Correa P, Piazuelo MB. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *US Gastroenterol Hepatol Rev.* 2011;7:59-64.
23. Koskenpalo J, Färkkilä M, Sipponen P. *Helicobacter pylori* and different topographic types of gastritis: Treatment response after successful eradication therapy in functional dyspepsia. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:778-84. <https://doi.org/10.1080/gas.37.7.778.784>
24. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007;117:60-9. <https://doi.org/10.1172/JCI30111>
Rölig AS, Shanks J, Carter JE, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. *Infect Immun.* 2012;80:3713-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00407-12>
25. Rieder G, Merchant JL, Haas R. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 2005;128:1229-42. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.064>
26. Castaño N, Goh, KL, Fock KM, Mitchell HM, Kaakoush NO. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. *Sci Rep.* 2017;7:15957. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16289-2>
27. Fragkiadakis K, Ioannou P, Barbounakis E, Samonis G. Intra-abdominal abscesses by *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* in an immunocompetent adult with severe periodontitis and pernicious anemia. *IDCases.* 2017;7:27-9. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.12.001>
28. Haas R, Smith J, Rocher V, Nadkarni S, Montero T, D'Acquisto, F, et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* 2015;13:e1002202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002202>
29. Romero S, Moreno M, Prado H, Sánchez F. Lactate contribution to the tumor microenvironment: Mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Front Immunol.* 2016;7:52. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00052.ghig>
30. Vitetta L, Coulson S, Thomsen M, Nguyen T, Hall S. Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut Microbes.* 2017;8:311-322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279379.ghig>
31. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27:39-45. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.016>
32. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One.* 2009;4:e7985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007985>
33. Maughan H, Redfield RJ. Tracing the evolution of competence in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One.* 2009;4:e5854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005854>

34. Alarcón T, Llorca L, Pérez G. Impact of the microbiota and gastric disease development by *Helicobacter pylori*. Curr Top Microbiol Immunol. 2017;400:253-75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6_11
35. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano R, Herrera R, Humphrys MS, et al. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:302. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00302>
36. Kocsmár É, Szirtes I, Kramer Z, Szijártó A, Bene L, Buzás GM, et al. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. Helicobacter. 2017;22:e12387. <https://doi.org/10.1111/hel.12387>
37. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World J Gastroenterol. 2015;21:11221-35. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>
38. Wang LL, Yu XJ, Zhan SH, Jia SJ, Tian ZB, Dong QJ. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2014;20:4948-52. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i17.4948>
39. Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. J Bacteriol. 2006;188:2656-65. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2656-2665.2006>
40. Li TH, Qin Y, Sham PC, Lau KS, Chu K-M, Leung WK. Alterations in gastric microbiota after *H. pylori* eradication and in different histological stages of gastric carcinogenesis. Sci Rep. 2017;7:44935. <https://doi.org/10.1038/srep44935>
41. Wang L, Zhou J, Xin Y, Geng C, Tian Z, Yu X, et al. Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2016;28:261-6. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000542>
42. Das A, Pereira V, Saxena S, Ghosh TS, Anbumani D, Bag S, et al. Gastric microbiome of Indian patients with *Helicobacter pylori* infection, and their interaction networks. Sci Rep. 2017;7:15438. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15510-6>
43. Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. World J Gastroenterol. 2014;20:5903-11. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5903>
44. Dore MP, Cipolli A, Ruggiu MW, Manca A, Bassotti G, Pes GM. *Helicobacter pylori* eradication may influence timing of endoscopic surveillance for gastric cancer in patients with gastric precancerous lesions: A retrospective study. Medicine (Baltimore). 2018;97:e9734. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009734>