



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“PRESENCIA DE LOS GENES *cagA*, *picB* E *iceA* EN
COLONIAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS
DE NIÑOS Y ADULTOS CON ENFERMEDAD
ACIDO PEPTICA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ;
ADRIANA REYES LEON

ASESORES: M. EN C. YELDA A. LEAL HERRERA
O. F. I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

2005

M. 340527



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Presencia de los genes *caqA*, *picB* e *iceA* en colonias de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos con enfermedad ácido péptica.

que presenta la pasante: Adriana Reyes León

con número de cuenta: 9030454-5 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 05 de Octubre de 2000

PRESIDENTE

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL

Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

SECRETARIO

Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

PRIMER SUPLENTE

Q.B.P. Amparo Londoño Orozco

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Norma Laura Deigado Buenrostro

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de lograr todas mis metas, hasta el momento.

A esas personas tan importantes en mi vida que fueron los cimientos de lo que soy ahora, ya no están presentes pero siempre los recuerdo. **MIS ABUELOS.**

A mis **PADRES** por darme la vida, quererme, cuidarme y apoyarme incondicionalmente. Todo lo que soy es gracias a ellos.

A mis **HERMANOS** por estar todo el tiempo a mi lado, por quererme, entenderme y apoyarme siempre.

Al Dr. Javier Torres por la oportunidad, el apoyo, los conocimientos y la confianza brindadas hasta el momento.

AGRADECIMIENTOS

A Yelda por la asesoría, los conocimientos y el apoyo
recibido durante la realización de este trabajo.

--

A la profesora Andrea por la asesoría brindada.

A todas las personas del Laboratorio de Bacteriología y del resto de la Unidad
de Investigación por el apoyo y la amistad recibida durante mi estancia.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación
Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría del
Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI). IMSS.

INDICE

PAGINAS

I. RESUMEN 1

II. INTRODUCCION 2

II. - 1 Antecedentes Históricos 2

II. - 2 Clasificación del Género 3

II. - 3 Cultivo 3

II. - 4 Característica Generales de la Bacteria 3

 a) Morfología Colonial.

 b) Morfología Microscópica.

II. - 5 Familia Bacteriana 4

II. - 6 Genoma Bacteriano 6

II. - 7 Metabolismo 7

II. - 8 Epidemiología 7

 a) Prevalencia.

 b) Factores de Riesgo.

 c) Relación con Enfermedad.

 d) Reservorios.

 e) Transmisión.

	PAGINAS
II. - 9 Diagnóstico	14
a) Métodos Invasivos	
b) Métodos No Invasivos.	
II. - 10 Tratamiento	17
II. - 11 Fisiopatología de la Infección	19
a) Mecanismos de Daño e Inflamación.	
b) Factores de Patogenicidad.	
c) Isla de Patogenicidad (<i>cag</i> PAI).	
III. JUSTIFICACION	27
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
V. HIPOTESIS	29
VI. OBJETIVOS	30
VII. MATERIAL Y METODOS	31
VII. - 1 Diseño del Estudio	31
VII. - 2 Tamaño y Descripción de la Muestra	31
VII. - 3 Material	33
VII. - 4 Reactivos	33

VII. - 5 Equipos	35
VII. - 6 ALGORITMO 1.-Procesamiento de Muestras Biológicas	36
VII. - 7 ALGORITMO 2.- Obtención de Colonias	37
VII. - 8 ALGORITMO 3.- PCR	38
VII. - 9 Metodología	39
VII. - 10 Definiciones Operacionales	45
VIII. RESULTADOS	48
VIII. - 1 Imágenes en Geles de Agarosa	48
VIII. - 2 Resultados de PCR Específico	51
VIII. - 3 Resultados del Análisis de Colonias	57
VIII. - 4 Resultados de acuerdo a la Zona Anatómica del Estómago ...	75
VIII. - 5 Resultados del Análisis Estadístico	80
IX. DISCUSION	82
X. CONCLUSIONES	89
XI. ANEXO	91
XII. GLOSARIO	95
XIII. BIBLIOGRAFIA	97

ABREVIATURAS

cagA.- Gen asociado a la citotoxina A.

CagA.- Proteína inmunogénica de *H. pylori* codificada por el gen *cagA*.

cag PAI.- Isla de patogenicidad.

cagI.- Región derecha de *cag PAI*.

cagII.- Región izquierda de *cag PAI*.

DAR.- Dolor Abdominal Recurrente.

EAP.- Enfermedad ácido péptica.

EIA.- Ensayo inmunoenzimático de antígeno en heces.

ELISA.- Ensayo inmunoenzimático.

GCA.- Gastritis crónica activa.

GC.- Gastritis crónica.

glr.- Gen de glutamato racemasa.

G (-).- Gram negativo.

H. pylori.- *Helicobacter pylori*

Hsp.- Proteínas de choque térmico.

IBP.- Inhibidor de la bomba de protones.

iceA.- Gen que se induce cuando la bacteria hace contacto con el epitelio.

IgG, IgA, IgM.- Inmunoglobulina G, A y M.

IL.- Interleucina (citocinas).

Kb.- Kilobases.

Le.- Antígeno Lewis.

LPS.- Lipopolisacárido.

MALT.- Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa.

Mb.- Megabases.

MI.- Metaplasia intestinal.

NSAID.- Drogas anti-inflamatorias no esteroideas.

PAU.- Prueba de aliento de la ureasa.

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa.

picB.- Gen promotor en la inducción de citocinas.

PMN.- Polimorfonucleares.

RNA_r.- RNA ribosomal.

RT-PCR.- Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa.

SSF.- Solución salina fisiológica.

TNF- α .- Factor de necrosis tumoral alfa.

UG.- Úlcera gástrica.

μ m.- Micrómetros.

vacA.- Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante.

VacA.- Citotoxina vacuolizante.

I. RESUMEN

H. pylori es un bacilo G(-) curvo espiral, móvil con 4-6 flagelos polares con un genoma circular de 1.7 Mb. Aproximadamente el 70-90% de la población mundial esta infectada la mayoría cursa la infección de manera asintomática, solo una pequeña fracción desarrolla enfermedad, esto también se ha asociado a algunos factores de riesgo como la edad, nivel socioeconómico y hacinamiento así como a los factores propios del huésped. Dentro de las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* podemos mencionar, GCA, úlcera péptica, linfoma del tipo MALT y cáncer gástrico. Cabe mencionar que la bacteria posee ciertos factores que incrementan su virulencia como la ureasa, LPS, Hsp, antígenos Lewis, citotoxina vacuolizante (VacA) y la presencia de una Isla de Patogenicidad (*cag* PAI) donde se han identificado algunos genes como *cagA*, *picB*, *cagT* y *cagI0*, además de la presencia de *iceA*.

OBJETIVOS: Determinar la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT*, *cagI0* e *iceA*, todos ellos asociados a virulencia en cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos con enfermedad ácido péptica (EAP) mediante PCR específico y la posible asociación entre la presencia del gen *cagA* con la presencia de los genes *picB* e *iceA*.

RESULTADOS: De las 210 colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA el 87% fue *cagA+*, el 80.9% *picB+*, el 91.4 *cag* PAI+, el 4.3% *cag* PAI-, el 4.3% *cag* PAI no tipificables, el 69.5% *iceA1+*, el 51.9% *iceA2+*, 18/39 colonias fueron *cagT+* y 20/39 *cagI0+*; la asociación entre *cagA+/picB+* fue del 88.5%, de *cagA+/iceA1+* 68.8% y de *cagA+/iceA2+* 51.4%. De las 174 colonias aisladas de adultos con GC el 74.7% fue *cagA+*, el 67.8% *picB+*, el 86.2 *cag* PAI+, el 13.8% *cag* PAI-, el 34.5% *iceA1+*, el 89.1% *iceA2+*, 17/35 colonias fueron *cagT+* y 27/35 *cagI0+*; la asociación entre *cagA+/picB+* fue del 86.2%, de *cagA+/iceA1+* 34.5% y de *cagA+/iceA2+* 89.1%. De las 45 colonias aisladas de adultos con UG el 80% fue *cagA+*, el 77.8% *picB+*, el 80% *cag* PAI+, el 20% *cag* PAI-, el 17.8% *iceA1+*, el 91.1% *iceA2+*; la asociación entre *cagA+/picB+* fue del 80%, de *cagA+/iceA1+* 15.5% y de *cagA+/iceA2+* 91.1%.

CONCLUSIONES: Los genes *cagA*, *picB* están presentes en la mayoría de colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos con EAP. En niños predominó *iceA1* y en adultos *iceA2*. En niños y adultos la asociación entre *cagA* y *picB* es mayor que la de *cagA* e *iceA* (independientemente del alelo). Es importante mencionar que solo una fracción pequeña (74 colonias) del total de la población se analizó para los genes *cagT* y *cagI0* de *cagII* (*cag* PAI), de estas 35 colonias fueron *cagT+* y 47 *cagI0+*.

II. INTRODUCCION

II. - 1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Algunos patólogos europeos observaron microorganismos curvos similares a *Helicobacter*. Bizzozero (1893), reportó la presencia de espiroquetas en el estómago de perros; Salomon (1896), reportó resultados similares a los de Bizzozero; Balfour (1906), describió la presencia de espiroquetas en perros y monos con úlceras gástricas. Krienitz (1906), reportó microorganismos similares en estómago de pacientes con cáncer.²⁵ Doenges (1938), encontró espiroquetas en 104 de 242 estómagos de pacientes muertos. Freedburg y Barron (1938), encontraron espiroquetas en 13 de 37 gastrectomías, ninguno puede concluir si la bacteria coloniza el tejido y causa daño al epitelio ó solo actúa como saprofito oportunista.

Se ha reportado la presencia de bacterias similares en estómago de algunos mamíferos (changos y gatos), pero se les han considerado comensales porque no causan ninguna respuesta inflamatoria. Robin Warren y Barry Marshall (1983), de manera accidental lograron aislar y cultivar una bacteria espiral de mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, usando técnicas de aislamiento para el género *Campylobacter*.⁶⁶

II. - 2 CLASIFICACIÓN DEL GENERO

El microorganismo aislado por Warren y Marshall presentó algunos aspectos morfológicos y fisiológicos similares a *Campylobacter*, por lo que fue clasificado como "*Campylobacter pyloridis*".⁴⁹ Estudios más detallados comprobaron diferencias en la composición de ácidos grasos, en la secuencia del RNAr, en la producción de ureasa y en la ausencia de una quinona respiratoria. En 1989, se denomina a la bacteria "*Helicobacter pylori*".²³

II. - 3 CULTIVO

H. pylori es una bacteria fastidiosa, solo crece en agar sangre y/o skirrow y en medios suplementados con suero, hemina, almidón y sangre de caballo, bajo condiciones microaéofilicas (7-12% de CO₂) a 37°C y humedad elevada; es una bacteria de crecimiento lento (5-7 días), sin embargo, en casos de primo-aislamiento tarda en crecer hasta 10 días.⁸

II. - 4 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA BACTERIA

II. - 4 a) **MORFOLOGIA COLONIAL:** Son colonias pequeñas, circulares, convexas, lisas, translúcidas, húmedas como "*gotitas de rocío*" miden de 1- 2 mm. de diámetro.⁴⁹ (Figura 1)

II. – 4 b) MORFOLOGIA MICROSCOPICA: Bacilo curvo, espiral, de 2.5–5 μm de largo y 0.5–1 μm de ancho, de superficie lisa, extremos redondeados, móvil con 4–6 flagelos polares. Es catalasa, oxidasa y ureasa positivas.²² (**Figura 2**)

Al microscopio se observan bacilos curvos en forma de “U” o “Gaviota” son G (-) (**Figura 3**). Después de más de 12 días de cultivo, la bacteria adopta una forma cocoide (**Figura 4**), las cuales son metabólicamente activas pero no cultivables *in vitro*.⁶³ Estas formas tienen cierto daño y menor cantidad en DNA y RNA cuando se comparan con las formas helicoidales.⁴⁴ Incluso se ha reportado que pueden ser un mecanismo de defensa bacteriano, mediante el cual pueden llegar a persistir por períodos de tiempo prolongados (meses o años) en el tejido gástrico.¹⁸ Estas formas pueden ser inducidas por métodos Físicos (Incubar a baja temperatura, humedad y cantidad de oxígeno) y Químicos (Adicionando al cultivo sales biliares como ácido glycocenodeoxicólico, sales de bismuto como citrato de bismuto y disminuyendo la cantidad de nutrientes).⁴⁴

II. – 5 FAMILIA BACTERIANA

La familia *Helicobacteriaceae* (Del Griego *helicos* espiral y *bactros* bacilo), comprende 17 especies, 4 son patógenas para el hombre y 2 para animales (gatos, perros y changos):^{22, 21}

- Especies patógenas para el hombre: *Helicobacter pylori*, *Helicobacter heilmanni*,
Helicobacter cinaedi y *Helicobacter fennelliae*.
 - Especies patógenas para los animales: *Helicobacter felis* y *Helicobacter mustelae*.
-

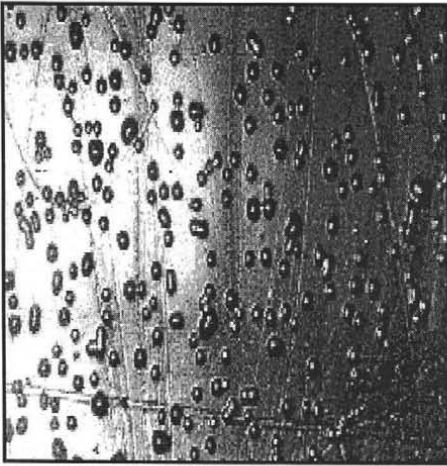


FIGURA 1- Morfología colonial de *H. pylori*.

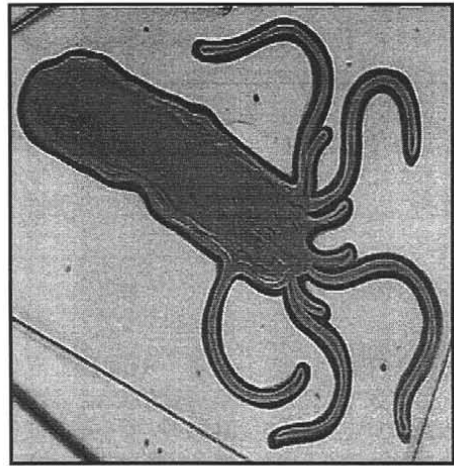


FIGURA 2- Morfología microscópica de *H. pylori*

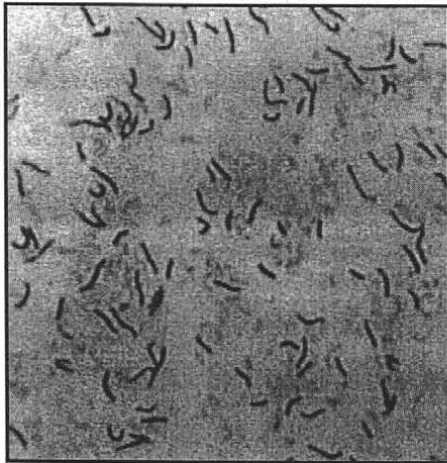


FIGURA 3. Tinción de Gram de bacilos curvos característicos de *H. pylori* en cultivos frescos.⁴⁴

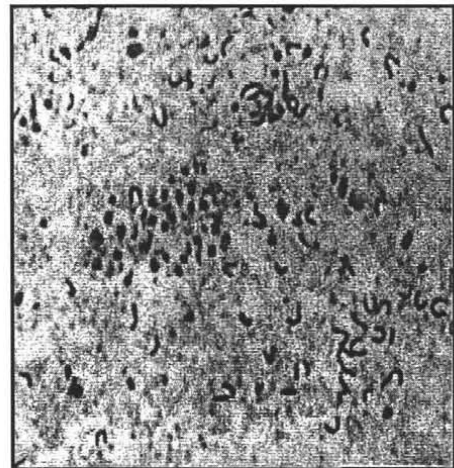


FIGURA 4. Tinción de Gram de formas cocoides de *H. pylori* características en cultivos viejos.⁴⁴

II. – 6 GENOMA BACTERIANO

El genoma de *H. pylori* esta constituido por un solo cromosoma circular de 1.6–1.7 Mb. El 40% de los aislados tienen plásmidos de 1.5-23.1 Kb, los cuales a la fecha no han sido reconocidos como factores de virulencia, dentro del genoma también existen 3 copias de los genes *16s* y *23s* RNAr.^{56, 58} Se ha demostrado por técnicas de biología molecular que el genoma de *H. pylori* presenta alta variabilidad genética, la cual puede ser explicada por 3 hipótesis:

- 1- Tiene gran variabilidad en secuencias cortas de DNA repetitivas.
- 2- Presenta una amplificación de secuencias de DNA cromosómico acompañado probablemente de la eliminación de un DNA adyacente.
- 3- Su DNA sufre algunos cambios en las secuencias de nucleótidos.⁵⁶

Aun se desconoce realmente cual es el mecanismo que provoca alteraciones en la organización de los genes; pero se sospecha que se pueden dar por transformación ya que se realizan reacomodos genéticos muy rápidos dentro de la bacteria, por recombinación entre las mismas cepas de *H. pylori* lo que produce poblaciones con genes organizados en forma de mosaico.^{55, 47}

Los aislados de *H. pylori* generalmente muestran secuencias genómicas muy conservadas pero llegan a presentar un cierto rango de variabilidad genética (3-7%) en el que existen pequeños cambios en las secuencias de nucleótidos de algunos genes que derivan de mutaciones puntuales (microdiversidad) o cambios en la organización de genes (macrodiversidad), la variabilidad en el orden de los genes es una característica única de *H. pylori* dentro del grupo de bacterias G (-).^{14, 47}

Una característica muy importante es la presencia de una o más copias de secuencias de inserción o transposones llamadas IS605. Los mecanismos de división celular, replicación, traducción, transcripción y translocación son similares a los de *E. coli* y *H. influenzae*, aunque existen diferencias importantes.⁵⁸ *H. pylori* contiene un pequeño grupo de genes metabólicos.^{14, 56}

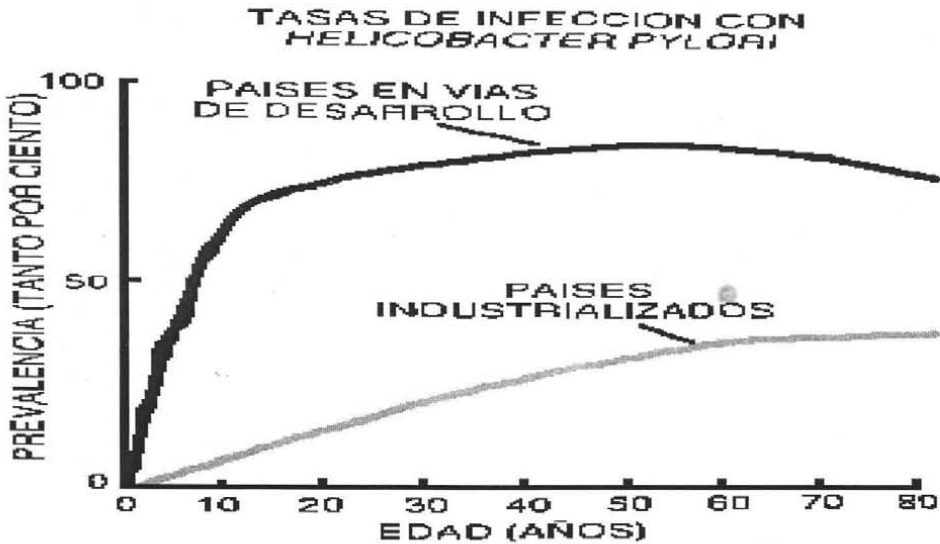
II. – 7 METABOLISMO

H. pylori utiliza como única fuente de energía a la glucosa, es capaz de metabolizar aminoácidos por vía fermentativa (serina, alanina, aspartato, prolina) y usar varios substratos como fuente de nitrógeno (urea, amonio, alanina, serina, glutamina).⁵⁸ Las proteínas de membrana externa más importantes y abundantes son la ureasa y la proteína de choque térmico B (Hsp).¹⁸

II. – 8 EPIDEMIOLOGIA

II. – 8 a) PREVALENCIA: La infección con *H. pylori*, es un problema de salud mundial, el 70-90% de la población mundial esta infectada, pero la mayoría cursa de forma asintomática.^{54, 20} La infección se adquiere principalmente durante la niñez; en países en vías de desarrollo aumenta con la edad. Entre los 2-10 años de edad el 45-55% están infectados y a los 20 años el 80% están infectadas; la incidencia de la infección en niños menores de 10 años es de 10% anual.

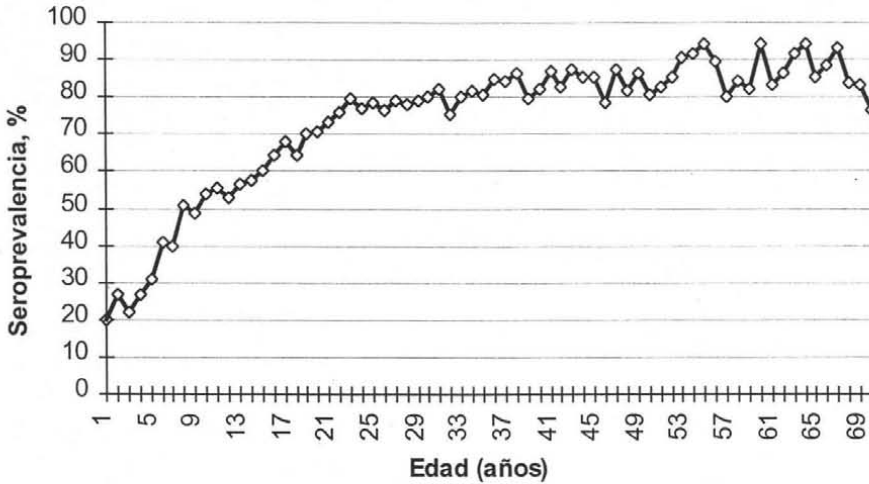
Mientras que en países desarrollados solo el 3.5% de los niños menores de 10 años y el 20% de las personas menores de 40 años están infectadas; en estos países la incidencia anual de infección es del 1% (Gráfica 1).²⁵ La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía entre diferentes grupos raciales y dentro del mismo grupo, el riesgo de infección a lo largo de la vida en países desarrollados es de aproximadamente del 40-60% mientras que en países en vías de desarrollo es del 90%.⁴⁷



GRAFICA 1- Tasas de infección por *H. pylori* en países en vías de desarrollo y desarrollados.

(Scientific American 1996; 274: 2. "The bacteria behind ulcers")

En un estudio seroepidemiológico realizado en nuestro país en 1998 se encontró que el 20 % de los niños menores de 1 año, están infectados; a los 10 años el 50% y a los 25 años el 80 % de la población mexicana esta infectada. (Gráfica 2)⁵⁹



GRAFICA 2- Seroprevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en México en 1998.⁵⁹

II. – 8 b) **FACTORES DE RIESGO:** En países en vías de desarrollo los factores de riesgo para la adquisición, permanencia y gravedad de la infección por *H. pylori* son la edad, bajo nivel socioeconómico, hacinamiento, raza ya que se ha demostrado por serología grandes diferencias en la prevalencia de la infección entre diferentes grupos raciales o étnicos de una misma área geográfica (blancos, negros e hispanos), falta de higiene, malos hábitos alimenticios (fumar, estrés) y factores genéticos que determinan la interacción huésped- bacteria.^{47, 64}

El factor de riesgo más importante para adquirir la infección en niños, es el contacto directo con adultos infectados dentro del ámbito familiar.⁶⁵ Además de la mala nutrición y el desarrollo de enfermedades que disminuye la secreción ácida y favorecen la colonización por *H. pylori*.²⁵

II. – 8 c) RELACION CON ENFERMEDAD: *H. pylori* se ha considerado como uno de los patógenos gástricos más importantes del humano, es capaz de infectar y colonizar la mucosa gástrica con posible desarrollo de gastritis crónica activa, úlcera péptica, linfoma del tipo MALT y cáncer gástrico.⁴⁷ La mayoría de la población cursa la infección de forma asintomática, una pequeña porción llega a desarrollar úlcera gástrica o duodenal, enfermedades linfoproliferativas y gastritis atrófica crónica y solo una minoría de estos desarrollan cáncer gástrico.²² (Figura 5)

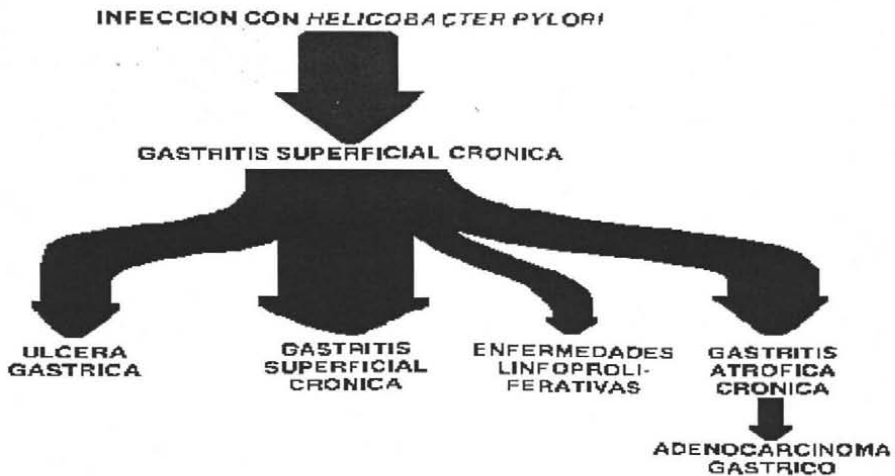


FIGURA 5. Evolución de la infección por *H. pylori*
(Scientific American 1996; 274:2. "The bacteria behind ulcers")

La magnitud de la enfermedad varía de huésped a huésped; para que un individuo desarrolle cualquiera de las enfermedades antes mencionadas se requieren de ciertos factores como son: Factores del huésped (fisiología y genotipo), factores ambientales (estrés, alcohol y tabaco) y factores de la bacteria (fenotipo y genotipo bacteriano).^{58, 14}

La gastritis es la inflamación de la mucosa gástrica con alteraciones en la estructura glandular; esta asociada al 90-95% de los pacientes infectados con *H. pylori*.³

La úlcera es la formación de hoyos en la mucosa gástrica, ocasionada por el uso de NSAID y por la infección con *H. pylori*.³ En Estados Unidos, casi el 100% de los pacientes con úlcera gástrica están infectados con *H. pylori*. Después de 10-20 años de infección el 60% de los pacientes desarrollan úlceras que posteriormente se convierten en metaplasias, displasias y cáncer.⁹

El reflujo gastroesofágico esta relacionado a la infección por *H. pylori* (agente biológico antisecretor), causa inflamación en la mucosa reduciendo la secreción ácida del estómago.⁹

El cáncer gástrico esta asociado al desarrollo de tejido metaplásico y gastritis atrófica causados por la infección con *H. pylori* posteriormente se forman linfomas del tipo MALT. Pero *H. pylori* es incapaz de colonizar tejidos cancerosos porque la estructura del epitelio ya no es ideal para la colonización de la bacteria, por lo que esta asociación es muy controversial. Para poder sustentar esta relación se debe realizar serología y comprobar que el paciente tiene respuesta de IgG contra *H. pylori*, ya que el cáncer gástrico puede ser causado por otros factores ambientales (nitrosaminas, compuestos nitrosos, alcohol, tabaco, chile, anemia perniciosa y virus Epstein-Barr). El cáncer en etapas avanzadas no se cura al erradicar a la bacteria sólo se puede prevenir al curar la gastritis atrófica. *H. pylori* esta considerado como un carcinógeno de primera clase.^{9, 3}

El Dolor Abdominal Recurrente (DAR) en niños es el síndrome más asociado a la infección por *H. pylori* además de la gastritis.⁵ Se ha sugerido que el DAR es una señal clínica de gastritis bacteriana en niños.^{11, 65} Los aspectos clínicos en niños y adultos son muy diferentes.

II. – 8 d) RESERVORIOS: El estómago humano parece ser el reservorio para *H. pylori*.¹⁸ Se han encontrado que algunos animales están colonizados por algunas especies de *Helicobacter*.²¹

En macacos se logró identificar una bacteria semejante a la especie *H. nemistrinae*, en estos animales la infección ocasiono inflamación gástrica y desarrollo de gastritis.²¹

Actualmente se ha sugerido que el cerdo puede ser un reservorio natural para *H. pylori* ya que dentro del estómago del cerdo están presentes otras bacterias ureasa (+), curvas, espirales, G (-), que pertenecen al género *Campylobacter*, pero, se han observado otras bacterias espirales que corresponden al género *Helicobacter*, lo que sugiere que los cerdos pueden estar infectados con *H. suis*, la distribución de la bacteria en el estómago de los cerdos es en forma de parches igual que en los humanos, además también desarrollan gastritis.²¹

En gatos se han podido identificar *H. felis* y *H. heilmanni*, como causantes de gastritis crónica en el 70% de los jóvenes y 97% de los adultos. Algunos estudios han demostrado que los perros también están colonizados por *H. pylori*.²¹

Se ha sugerido que el agua puede actuar como un reservorio ambiental, ya que la bacteria permanece metabólicamente activa y viable por menos de 48 hrs.⁴⁹ Datos experimentales indican que *H. pylori* en sus formas cocoides puede sobrevivir 1 año en agua de río y ser cultivada en menos de 10 días si el agua se mantiene a 4°C. También puede sobrevivir en leche varios días.²¹

II. – 8 e) **TRANSMISION:** Se desconocen los mecanismos de transmisión, aunque hay evidencias epidemiológicas y microbiológicas que sugieren 3 probables vías de transmisión:¹⁸

- 1) **Vía Gastro-Oral.-** Se lleva a cabo a través de endoscopios y sondas contaminadas, por el contacto directo con vómito o contenido gástrico de pacientes infectados. Es poco frecuente.
- 2) **Vía Fecal-oral.-** Es la más importante porque se ha logrado aislar *H. pylori* de heces.
- 3) **Vía oral-oral.-** Se ha podido identificar a la bacteria en muestras de saliva y sarro.¹⁸

2) **Transmisión Fecal-Oral:** La bacteria es removida de la mucosa gástrica y eliminada por el intestino de manera que puede sobrevivir en heces y ser eliminada al ambiente.

Algunos autores han logrado identificar DNA de *H. pylori* en aguas de ríos y lagos por lo que sugieren que el agua puede actuar como un reservorio ambiental.^{39, 50}

Existen evidencias microbiológicas que respaldan esta posible vía de transmisión:

- Evidencias Microbiológicas.- Thomas aisló *H. pylori* en heces de niños desnutridos.⁵⁷ Mapstone detectó la presencia de la bacteria en heces de pacientes infectados utilizando PCR.³⁷ Kelly detectó la bacteria en heces de pacientes dispépticos.³⁰ Namavar logró identificar a la bacteria por características fenotípicas pero no por PCR.⁴³

3) **Transmisión Oral-Oral:** La bacteria es removida de la mucosa gástrica, se puede encontrar en jugo gástrico y alcanzar la cavidad oral (posible reservorio) vía regurgitación.³⁹

Existen evidencias microbiológicas y epidemiológicas que respaldan esta vía de transmisión:

- Evidencias Microbiológicas.- Kraiden y Ferguson lograron cultivar *H. pylori* de placa dental y saliva de pacientes infectados.^{31, 19} Nguyen reportó la presencia de la bacteria en muestras

de placa dental utilizando RT-PCR.⁴⁶ Sin embargo, no todos los autores han logrado aislar e identificar *H. pylori* de placa dental y saliva.³⁹

- Evidencias Epidemiológicas.- Albenque encontró niños de población africana infectados con *H. pylori* que se alimentaban con bolos alimenticios premasticados por madres infectadas.²

La infección por *H. pylori* también puede ocurrir en el ámbito intra-familiar; ya que se ha encontrado una respuesta serológica elevada contra *H. pylori* en familiares de niños colonizados.¹⁷ Se ha demostrado que los aislados de la bacteria son idénticos entre los miembros de una misma familia.⁶ No en todos los estudios realizados se ha encontrado lo mismo.²⁴

II. – 9 DIAGNOSTICO

II. – 9 a) METODOS INVASIVOS: Se requiere de endoscopia para la obtención de biopsias gástricas (antro, cuerpo, fondo e incisura).¹⁸

- **Histología.**- *H. pylori* se localiza adherido al moco de la superficie del epitelio y dentro de las criptas por lo que se puede observar en cortes histológicos con tinción de Hematoxilina-Eosina y tinción de Warthin Starry. Es un método sensible, fácil de realizar, de bajo costo, pero se pueden obtener resultados falsos negativos por la distribución de *H. pylori* en el estómago y falsos positivos por la presencia de precipitados de colorante.¹⁸

- **Cultivo.**- Es considerado como el “**standard de oro**” para el diagnóstico de la infección. Permite determinar la susceptibilidad antimicrobiana y la obtención de cepas para su caracterización genética; se pueden obtener resultados falsos negativos por tomar biopsias de sitios no colonizados o por el transporte inadecuado de la muestra antes del cultivo.^{27, 18}
- **Prueba rápida de la ureasa.**- Es un método de detección indirecta, se basa en la actividad de la ureasa producida por *H. pylori* en estómago la cual degrada a la urea en amonio y CO₂. Es una prueba rápida pero se requiere de endoscopia además de un gran número de bacterias.^{49, 18}
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**- Se basa en el análisis de una secuencia específica de DNA del genoma de *H. pylori*. Es una prueba rápida, sensible y específica para la detección de *H. pylori*.^{28, 49, 18}

II. – 9 b) METODOS NO INVASIVOS: No se requiere de endoscopia, son más disponibles y económicos.¹⁸

Serología.- (ELISA). Se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori*. Cuando *H. pylori* infecta la mucosa gástrica se desarrolla una respuesta inmune local aumentando los niveles de IgM e IgA en suero y de IgA secretoras en estómago, después se crea una respuesta IgG de memoria. Esta prueba es relativamente rápida, fácil de realizar, aunque no se puede diferenciar entre una infección activa y una infección pasiva.^{18, 25}

- **Prueba de Aliento de la Ureasa (PAU).**- Se basa en la presencia de grandes cantidades de ureasa producida por *H. pylori*. Se monitorea la liberación de CO₂ marcado durante la espiración como resultado de la degradación de la urea marcada (con C¹³ y C¹⁴). Es una prueba rápida, sensible, permite medir la actividad de la ureasa en todo el estomago.^{28, 49}
- **PCR de Muestras Biológicas no Gástricas.**- Es una prueba utilizada para DNA de *H. pylori* extraído de muestras biológicas (saliva, placa dental y heces). Todavía no es muy reportado.¹⁸
- **Ensayo InmunoEnzimático para Detección de Antígeno en Heces (EIA).**- Es un método nuevo para detectar *H. pylori*. Se basa en la detección directa de antígenos de *H. pylori* en heces de pacientes particularmente niños con infección activa. Es un método simple, no requiere personal especializado ni equipo sofisticado y es altamente sensible y específico.^{35, 62}

La sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos diagnósticos es diferente. (Tabla 1)

Tabla 1.- Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas.

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Histología	93 - 98 %	95 - 98 %
Cultivo	77 - 95 %	100 %
Prueba Rápida de la Ureasa (CLO-test)	89 - 98 %	93 - 98 %
Prueba de aliento de la Ureasa (PAU)	90 - 95 %	90 - 95 %
Serología	88 - 95 %	86 - 95 %
PCR	85 - 96 %	90 - 100 %

II. – 10 TRATAMIENTO

El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* fue desarrollado por Borody en 1989, en donde se incluyen medicamentos como Bismuto, Metronidazol y Tetraciclinas. *H. pylori* desarrolla rápida resistencia a metronidazol y claritromicina, la cual es mediada a nivel cromosomal y no por plásmidos. Se recomienda el uso de terapias múltiples.²⁶ La resistencia a los antibióticos en países desarrollados es del 11-70% y en países en vías de desarrollo es mayor del 95%. Actualmente se ha propuesto la misma terapia de erradicación en niños y en adultos.¹⁸

Para el tratamiento de la infección por *H. pylori* se han utilizado 3 tipos de terapias:

- 1.- **Terapia Dual:** Un Antibiótico + Un Inhibidores de la Bomba de Protones (IBP). Tiene buenos resultados pero se causa resistencia por las bajas dosis de antibióticos. **(Tabla 2)**
- 2.- **Terapia Triple:** 2 Antibióticos + 2 IBP. Es la terapia más recomendada. Puede llegar a alcanzar una erradicación del 95%. **(Tabla 2)**
- 3.- **Terapia Cuádruple:** 2 Antibióticos en dosis elevadas + 2 IBP. **(Tabla 2)**^{26, 18}

Tabla 2.- Tratamientos de la FDA para la erradicación de la infección por *H. pylori*.¹⁸

REGIMEN MEDICAMENTOS	DOSIS TERAPEUTICA	EFICACIA	DURACION DEL TRATAMIENTO
TERAPIA DUAL			
Claritromicina ^a -Omeprazol ^b	500 mg 3x/día 40 mg diario	74 %	14 días
Claritromicina ^a -Ranitidina ^b	500 mg 3x/día 400 mg 2x/día	82 %	14 días
TERAPIA TRIPLE			
Tetraciclina ^a -Metronidazol ^a -Bismuto ^b	500 mg 4x/día 250 mg 4x/día 2 tabletas 4x/día	85 %	14 días
Amoxicilina ^a -Claritromicina ^a - Lansoprazol ^b	1 g 2x/día 500 mg 2x/día 30 mg 2x/día	90 %	14 días
Metronidazol ^a -Claritromicina ^a - Omeprazol ^b	500 mg 2x/día 500 mg 2x/día 20 mg 2x/día	90 %	14 días
Ranitidina ^b -Claritromicina ^a - Amoxicilina ^a	40 mg 2x/día 500 mg 2x/día 1 g 2x/día	90 %	14 días

a = Antibiótico

b = IBP

II. – 11 FISIOPATOLOGIA DE LA INFECCION

II. – 11 a) MECANISMOS DE DAÑO E INFLAMACION: *H. pylori* penetra la capa del moco con la ayuda de proteasas, llega al epitelio gástrico y se adhiere, amortigua la acidez del estómago por la acción de la ureasa, construye un ambiente ideal para crecer y multiplicarse sin competencia de ningún otro microorganismo.^{42, 3} Ocasiona daño a la mucosa gástrica por la liberación de sustancias quimiotácticas para neutrófilos y macrófagos y por la adhesión de neutrófilos PMN a las células endoteliales.⁴⁷ Provoca cambios intracelulares que inducen una respuesta inflamatoria aguda en el huésped, se producen varias citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8) y TNF- α en epitelio gástrico. TNF- α e IL-1 regulan la secreción de IL-8 que actúa como un mediador inflamatorio reclutando y activando neutrófilos, que se encargan de regular la inducción de citocinas y de ocasionar daño al epitelio gástrico. El incremento en la secreción de IL-8 y la respuesta de IgM contra *H. pylori* son las primeras señales de una respuesta inflamatoria aguda.^{51, 15} En el caso de una inflamación crónica de la mucosa gástrica se despierta una respuesta inmune celular de tipo CD4 y CD8 (infiltración de células plasmáticas, linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y eosinófilos); también se desarrolla una respuesta de IgA local específica contra *H. pylori* que impide la adherencia bacteriana y una respuesta de IgG sistémica.^{15, 16} Se ocasiona atrofia por la acción de reductasas que convierte nitritos a nitratos (responsables de mutaciones en el DNA de células epiteliales gástricas), disminuye la concentración de ácido ascórbico (vitamina con funciones antioxidantes protectoras del daño al DNA), sin esta protección se llega a inducir mutaciones y transformaciones neoplásicas.³

Las cepas tipo I de *H. pylori* inducen mayor grado de inflamación gástrica.¹⁵ *H. pylori* tiene una resistencia parcial a la fagocitosis. Un mecanismo de evasión inmune son las formas cocoides y el mimetismo molecular mediante los antígenos like Lewis.¹⁸

II. – 11 b) FACTORES DE PATOGENICIDAD: Se han descrito diferentes factores asociados a la virulencia de *H. pylori* los cuales pueden ser divididos en tres clases:

1. **Factores de Colonización.-** La bacteria se establece y coloniza la mucosa gástrica del huésped para causar daño.
2. **Factores de Persistencia.-** La bacteria sobrevive dentro de la mucosa gástrica del huésped.
3. **Factores que Inducen Enfermedad.-** Dañan la mucosa gástrica por infiltración de PMN, por daño en los mecanismos de defensa y por alteraciones en la fisiología gástrica. (Tabla 3)^{41, 18}

Tabla 3.- Factores de patogenicidad de *H. pylori*.

FACTORES DE COLONIZACIÓN	FACTORES DE PERSISTENCIA	FACTORES QUE INDUCEN ENFERMEDAD.
Motilidad Ureasa Adhesinas	Lipopolisacárido (LPS) Adhesinas Catalasa Proteínas de choque térmico Antígeno like Lewis	Citotoxina vacuolizante (Vac A) Fosfolipasa Antígenos Lewis Presencia del gen <i>cagA</i> Presencia de la Isla de Patogenicidad (<i>cag PAI</i>) Presencia de <i>iceA</i>

- **Motilidad.**- Su forma helicoidal y los flagelos le permiten moverse a través del moco viscoso. Es muy similar a la de *E. coli*.⁴¹
 - **Ureasa.**- Es una metaloenzima hexámerica de 540 Kda, codificada por 7 genes estructurales y accesorios, 2 de ellos (*ureA* y *ureB*) son estructurales e inmunogénicos; *ureC* es el más conservado y específico de *H. pylori*. Su actividad es requerida para neutralizar la acidez del estómago por el amonio (producto de degradación de la urea). Estimula la activación fagocítica y la producción de citocinas.^{41, 18}
 - **Adhesinas.**- Para la adherencia de *H. pylori* al estómago se necesitan adhesinas específicas que actúan como ligandos para receptores en el epitelio gástrico, son muy importantes para la colonización de la mucosa gástrica. Las hemaglutininas producidas por la bacteria pueden contribuir a la adherencia in vivo.⁴¹
 - **LPS.**- Es el principal componente de la membrana externa, tiene poca actividad inmunológica. Dentro del Lípido A se encuentran los antígenos Le^x y Le^y formando parte del LPS, ambos antígenos son similares a los antígenos Le de grupos sanguíneos humanos expresados en células gástricas; ellos actúan como mediadores en el ataque a las células del moco gástrico.^{18, 29} Mimetizan la respuesta inflamatoria local. La expresión de Le en el tejido gástrico ayuda a que la bacteria pase desapercibida a la respuesta inmune del huésped, lo que juega un papel importante en el desarrollo de una reacción autoinmune.⁴¹
 - **Catalasa.**- Proporciona resistencia al ataque de leucocitos PMN, le da protección contra neutrófilos, una fracción de la enzima se encuentra en la superficie de la bacteria viable.¹⁸
 - **Proteínas de Choque Térmico (Hsp).**- Actúan como proteínas acompañantes (chaperonas) aumentando la actividad de la ureasa. Son proteínas codificadas por el gen *HspB*.¹⁸
-

- **Fosfolipasas (A₂ y C).**- Causan la ruptura de la capa fosfolipídica protectora en la membrana apical de las células epiteliales.¹⁸
 - **Tipos de Cepas.**- *H. pylori* presenta polimorfismo genético, las cepas comparten muchas características estructurales, bioquímicas y fisiológicas pero no la virulencia, estas diferencias tienen que ver con la presencia de 2 genes (*cagA* y *vacA*) ambos se localizan en diferentes posiciones dentro del genoma bacteriano. De acuerdo a la presencia de ellos se han descrito 2 tipos de cepas: Tipo I son *cagA* y *vacA* (+) y Tipo II son *cagA* y *vacA* (-).^{41,9}
 - **Citotoxina Vacuolizante (VacA).**- Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA* y solo el 50-60% expresan VacA (citotoxina de 87 Kda), el gen *vacA* (3.9 Kb) tiene regiones conservadas y no conservadas formando un mosaico genético, que incluye 2 regiones: Región "s" (codifica para la secuencia señal) con 3 tipos alélicos (*s1a*, *s1b*, *s2*) y la región "m" (codifica para la región media) con 2 tipos alélicos (*m1*, *m2*); las cepas *s1a* son más citotóxicas y causan mayor grado de inflamación gástrica y las *s2* no son citotóxicas.¹⁸ VacA es capaz de inducir la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucarióticas. Se ha reportado que VacA esta asociada a la presencia de CagA.^{18,41}
 - **Gen *cagA* (Citotoxin Associated Gene A).**- Solo el 60% de las cepas de *H. pylori* poseen este gen que actúa como un marcador de *cag* PAI.¹⁸ Codifica para una proteína inmunogénica de 120-128 Kda de función desconocida llamada CagA (Antígeno inmunodominante).⁴¹ Las cepas *cagA*+ no necesariamente son VacA+.⁶⁰ La presencia de *cagA* se asocia a úlcera péptica; se ha reportado que las cepas *cagA*+ actúan como promotoras en la inducción de citocinas principalmente de IL-8 en células del epitelio gástrico.⁴¹
-

- **Gen *picB* o *cagE* (Promote the Induction of Cytokines).**- Hay cepas *cagA*- que inducen la producción de IL-8, debido a la presencia de otros genes como *picB* (codifica para una proteína de 101 Kda), es un gen que actúa como promotor de la respuesta inflamatoria aumentando la producción de IL-8 en epitelio gástrico. Es un fuerte homólogo a las proteínas de secreción de tipo IV.^{18, 61} Presenta cierta semejanza con la toxina de *B. pertussis* (PtlC) y con la proteína VirB4 de *A. tumefaciens* involucradas en el transporte del DNA.⁶¹
 - **Isla de Patogenicidad (*cag* PAI).**- Es un fragmento de DNA extraño presente en cepas tipo I, dentro del cual se encuentran los genes *cagA* y *picB* (asociados a virulencia), la presencia de *cag* PAI aumenta la virulencia de las cepas que la poseen.¹⁰ Esta involucrada en la inducción de IL-8, pero se ha demostrado que solo algunos genes de la región derecha (*cagI*) de *cag* PAI principalmente *picB* son necesarios para la síntesis de IL-8 en cultivos de células epiteliales gástricas.¹ Algunos genes de la región izquierda (*cagII*) de *cag* PAI son esenciales para la transcripción de IL-8; por lo que se ha considerado que la presencia de *cag* PAI es un factor de virulencia muy importante en aislados de *H. pylori*.⁵³
 - **Gen *iceA* (Induced by Contact with Epithelium).**- Es un nuevo gen asociado a virulencia, no se encuentra dentro de *cag* PAI; se activa cuando la bacteria hace contacto con las células de la mucosa gástrica. Presenta 2 alelos llamados *A1* y *A2*; la presencia de *iceA1* esta fuertemente asociada a pacientes con úlcera péptica y al incremento en la concentración de IL-8 en la mucosa gástrica.⁴⁸ Se sospecha que la función de *iceA1* es muy parecida a la de las endonucleasas de restricción tipo II, parece ser un marcador para úlcera, la presencia de *iceA* es independiente a la presencia de *cagA* y *vacA*.^{33, 67}
-

II. – 11 c) ISLA DE PATOGENICIDAD (*cag* PAI): El concepto de *cag* PAI se describió inicialmente en *E. coli* para describir segmentos discretos de DNA cromosomal presentes en especies patógenas de este género, se ha demostrado que estos segmentos codifican para proteínas que pueden contribuir a la colonización y desarrollo de enfermedad.¹ Posteriormente este fenómeno se describió para *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, en donde también se han encontrado fragmentos de DNA que contienen genes que codifican para proteínas asociadas a virulencia. Actualmente se sabe que estos fragmentos de DNA son inestables, que solo se presentan en bacterias G (-) y que se adquieren mediante transmisión horizontal.¹⁰

Censini y cols. sugieren que *H. pylori* contiene un fragmento de DNA extraño de alrededor de 40 Kb derivado posiblemente de un plásmido o un fago al cual se le ha denominado Isla de Patogenicidad (*cag* PAI), único en cepas *cagA*+ (cepas tipo I) que probablemente fue adquirido horizontalmente e integrado al cromosoma dentro del gen de glutamato racemasa (*glr*).^{10, 1}

En *H. pylori* *cag* PAI, esta flanqueada por secuencias repetitivas de aproximadamente 31 pb, la presencia de estas secuencias sugieren que *cag* PAI pudo haber sido adquirida a través de un evento recombinante, la adquisición de *cag* PAI es un evento muy importante en la evolución de la bacteria.¹⁰ Se ha descrito que *cag* PAI contiene aproximadamente 31 genes diferentes que codifican para algunos factores de virulencia únicos en cepas tipo I de *H. pylori*, dentro de los cuales se encuentra *cagA* a quien se le ha considerado como marcador de *cag* PAI.^{1, 34} En algunas cepas *cag* PAI esta dividida en 2 regiones por un segmento de inserción o transposon llamado IS605:

- **Región *cagI*.**- Es la región que se encuentra después del IS605 (región derecha). (**Figura 6**)
- **Región *cagII*.**- Es la región que se encuentra antes del IS605 (región izquierda). (**Figura 6**).¹⁰

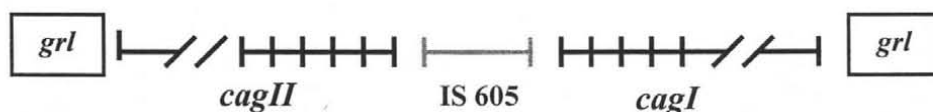


Figura 6- Posición de *cagI*, *cagII* e IS605 en *cag* PAI dentro del genoma de *H. pylori*.

H. pylori al igual que *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella* secretan factores de virulencia durante la interacción celular huésped-bacteria; se ha reportado que algunos de los genes contenidos en *cag* PAI codifican para proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo IV.¹⁰ Este es un sistema especializado en exportar factores de virulencia liberados directamente hacia las células del huésped, alterando las funciones normales de las células blanco, benefician el ataque de la bacteria al huésped; este sistema es activado cuando la bacteria hace contacto con las células del huésped por lo que también se le ha llamado sistema de secreción contacto-dependiente.³⁸

Dentro de la región *cagI* se localizan aproximadamente 15 genes llamados: *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagD*, *cagE* (*picB*), *cagF*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*, *cagN*, *cagO*, *cagP*, *cagQ*; algunos de ellos actúan como fuertes homólogos a endonucleasa de restricción tipo I y a proteínas transportadoras de iones. (**Figura 7**).³⁴

Dentro de la región *cagII* se localizan por lo menos 16 genes llamados: *cagS*, *cagT*, *cag18*, *cag17*, *cag16*, *cag15*, *cag14*, *cag13*, *cag12*, *cag11*, *cag10*, *cag9*, *cag8*, *cag7*, *cag6*, y *cagA5*; al parecer todos ellos son homólogos a proteínas de choque térmico, y algunos son homólogos a 4 genes del complejo *ptl/vir* y a varios otros genes eucariotes. (Figura 7).³⁴

Isla de Patogenicidad (*cag* PAI)

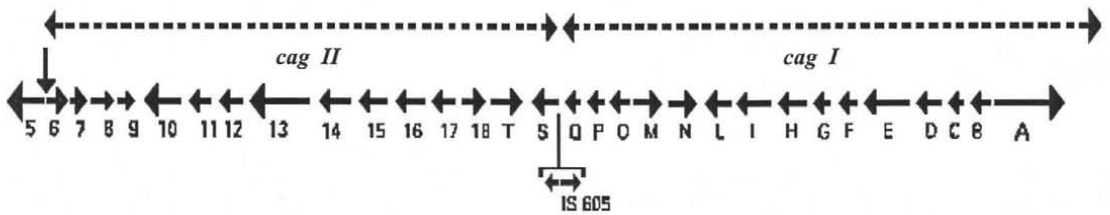


Figura 7- Estructuración general de la Isla de patogenicidad (región *cagI* y *cagII*)

El tamaño de *cagII* es de aproximadamente 21 Kb, esta región exhibe altos niveles de homología para proteínas que se encuentran en la superficie celular de *Bordetella*, *E. coli*, *Neisseria*, *V. cholera* que participan en el ensamble del *phili*s y en la transferencia del DNA.¹³

H. pylori es una bacteria con gran diversidad genética debido a mutaciones puntuales, reacomodos genómicos, genes no conservados, variación alélica en genes conservados, secuencias de inserción en el DNA cromosómico y plásmidos. Es importante mencionar que *cagA* es considerado como un marcador de *cag* PAI, sin menospreciar la presencia de otros genes tan importantes como *picB* (*cagE*) involucrados en los mecanismos de virulencia de la bacteria.¹⁸

III. JUSTIFICACION

H. pylori es el principal agente etiológico de gastritis, úlcera péptica y es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer gástrico; el desarrollo de estas enfermedades se ha asociado a la presencia o ausencia de algunos genes específicos de *H. pylori* asociados a virulencia, tales como: *cagA*, *picB*, *cagT*, *cagI0* incluidos en *cag* PAI (recientemente descrita) e *iceA* que se encuentra fuera de *cag* PAI.

En nuestro país existe una alta prevalencia de la infección por esta bacteria, sin embargo, se han realizado muy pocos estudios que determinen la presencia de estos genes asociados a virulencia en cepas aisladas tanto de niños como de adultos que presenten alguna de las enfermedades antes mencionadas.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que la presencia de algunos genes como *cagA*, *picB*, *cagT*, *cag10* e *iceA* asociados a virulencia en cepas de *H. pylori* se relacionan fuertemente con el desarrollo de formas más severas de la infección, sin embargo, en nuestro país se desconoce si las cepas aisladas de pacientes (niños y de adultos) expresan estos genes y cual es la frecuencia con que lo hacen; por lo cual es importante conocer:

- 1- Si los genes *cagA*, *picB*, *cagT*, *cag10* e *iceA* asociados a virulencia están presentes en las cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos infectados.
- 2- La frecuencia con la que se presentan estos genes en las cepas aisladas de niños y adultos infectados.

V. HIPOTESIS

- ◆ La expresión de los genes *cagA*, *picB*, *cagT*, *cag10* e *iceA* asociados a virulencia será mayor en las colonias de *H. pylori* aisladas de adultos que de niños.

- ◆ La expresión de todos los genes asociados a virulencia será menor en las colonias de *H. pylori* aisladas de adultos que de niños.

- ◆ La expresión de todos los genes asociados a virulencia será igual en niños y adultos independientemente de la enfermedad

- ◆ La expresión de todos los genes asociados a virulencia será mayor en adultos con úlcera que con gastritis.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ◆ Genotipificar *cagA*, *picB* (*cagE*), *cagT* y *cag10* (*cag* PAI) e *iceA*; genes de *H. pylori* asociados a virulencia, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ◆ Determinar la presencia de los genes *cagA*, *picB* (*cagE*), *cagT* y *cag10* de *cag* PAI en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con Dolor Abdominal Recurrente (DAR) y de adultos con enfermedad ácido péptica (EAP).
 - ◆ Determinar la presencia del gen *iceA*, asociado a virulencia en colonias de *H. pylori*, aisladas de niños con DAR y de adultos con EAP.
 - ◆ Relacionar la presencia del gen *cagA* como marcador de *cag* PAI con la presencia de *picB* en colonias aisladas de niños con DAR y de adultos con EAP.
 - ◆ Relacionar la presencia del gen *cagA* con la presencia de *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con DAR y de adultos con EAP.
 - ◆ Determinar la frecuencia con la cual se presenta *cag* PAI e *iceA* de acuerdo a la zona anatómica del estómago de donde se obtuvieron las biopsias (antro y cuerpo).
-

VII. MATERIAL Y METODOS

VII. - 1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo Transversal Descriptivo.

VII. - 2 TAMAÑO Y DESCRIPCION DE LA MUESTRA

Se incluyeron:

- ◆ 13 pacientes niños al Departamento de Gastroenterología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) IMSS; de ambos sexos (10 niños y 3 niñas) con un rango de edad de 4-13 años ($x = 10.3$ años), con diagnóstico clínico inicial de DAR. 12 pacientes con gastritis crónica activa (GCA) y 1 metaplasia intestinal (MI). A todos se le practicó endoscopia para la obtención de biopsias gástricas (antro y cuerpo); a partir de las cuales se aislaron 210 colonias de *H. pylori* para ser genotipificadas. (**Tabla 4**)

- ◆ 18 pacientes adultos referidos al Departamento de Gastroenterología del Hospital de Especialidades del C.M.N. SXXI, IMSS; de ambos sexos (11 hombres y 7 mujeres) con un rango de edad de 29 a 55 años ($x = 45.0$ años), con diagnóstico clínico inicial de enfermedad ácido péptica (EAP). 14 pacientes con gastritis crónica (GC) 9 hombres y 5 mujeres de 29-54 años de edad y 4 pacientes con úlcera gástrica (UG), 2 hombres y 2 mujeres de 48-55 años de edad.

A todos ellos se les practicó endoscopia para la obtención de biopsias gástricas de antro y cuerpo; a partir de las cuales se aislaron un total de 219 colonias de *H. pylori* (174 colonias de GC y 45 colonias de UG) para ser genotipificadas. (Tabla 5)

Tabla 4.- Tamaño y descripción de la población pediátrica.

NIÑOS	DIAGNOSTICO	COLONIAS	BIOPSIAS GASTRICAS	
			ANTRO	CUERPO
12 Pacientes	Gastritis Crónica Activa	198	109	89
1 Paciente	Metaplasia Intestinal	12	5	7
TOTAL 13 Pacientes		210	114	96

Tabla 5.- Tamaño y descripción de la población de adultos.

ADULTOS	DIAGNOSTICO	COLONIAS	BIOPSIAS GASTRICAS	
			ANTRO	CUERPO
14 Pacientes	Gastritis Crónica	169	104	65
4 Paciente	Úlcera Gástrica	45	25	20
TOTAL 18 Pacientes		214	129	85

NOTA: De uno de los pacientes adultos con gastritis crónica (paciente 12) se lograron aislar 5 colonias de Jugo Gástrico.

VII. – 3 MATERIAL

- Tubos eppendorf de 1.9 y 0.5 ml (ELKAY Products, Inc.)
- Homogeneizadores de vidrio con pistilo de vidrio esmerilado.
- Placas Petri de plástico desechables (100 x 15 mm de dm.)
- Puntas estériles con y sin filtro de 10µl, 200µl y 1000µl (Labsystems).
- Micropipetas de 0.5 - 10µl, 5 - 40µl, 20 - 200µl y de 200 - 1000µl (Labsystems).
- Portaobjetos.
- Asas bacteriológicas estériles desechables.
- Microplacas de 96 pozos (Uniwel, ELKAY).
- Palillos de madera estériles.
- Isopos de algodón estériles.
- Crioviales estériles de 2 ml con tapón de rosca.
- Celdas de cuarzo.
- Gradillas.
- Tubos de PCR de 0.2 ml (PCR-0sD-Y, Axygen Scientific).

VII. – 4 REACTIVOS

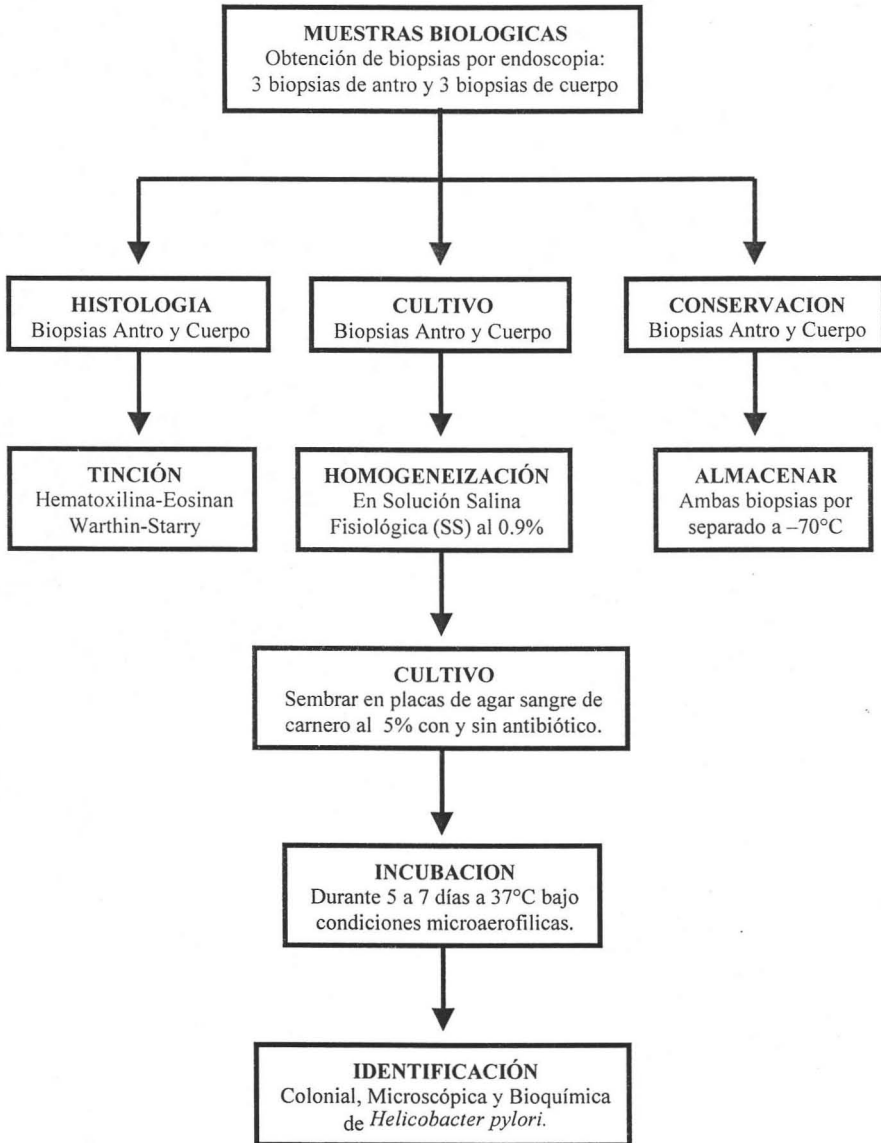
- Solución Salina Fisiológica estéril (S.S.) al 0.9%.
 - Glicerol (SIGMA).
 - Base de agar sangre (BBL Becton Dickinson).
 - Sangre de carnero desfibrinada (ERIKAR).
 - Colorantes para tinción de Gram (Hycel de México, S.A de C.V.).
 - Reactivo de Ureasa. (Ver ANEXO)
 - Peróxido de Hidrógeno al 3% para la prueba de catalasa (SIGMA).
-

- Caldo Brucella (DIFCO).
- Buffer Tris 100mM – EDTA 1mM (TE) (SIGMA).
- Lisozima a 10 mg/ml. (SIGMA).
- Proteínasa K a 10 mg/ml. (SIGMA).
- Agua destilada.
- SDS al 10% (SIGMA).
- Buffer saturado de fenol (GIBCO).
- Cloroformo al 99.9% (SIGMA-ALDRICH).
- Acetato de sodio 3M (SIGMA).
- Etanol Absoluto (MERCK).
- Etanol al 70% (MERCK).
- Agua inyectable estéril (Sector Salud).
- Buffer de PCR 10x sin cloruro de magnesio (GIBCO BRL, Life Technologies).
- Cloruro de magnesio 50 mM (GIBCO BRL, Life Technologies).
- dNTP's: dGTP, dCTP, dATP, dTTP, 10mM 25μMol (GIBCO BRL, Life Technologies).
- Iniciadores o primers 25μM (GIBCO BRL, Life Technologies).
- Taq DNA polymerasa recombinante 500U (5U/μl) (GIBCO BRL, Life Technologies).
- Buffer Tris - Acido acético – EDTA 0.5M pH 8 (TAE).
- Agarosa (Certified Molecular Biology, Scientific Imaging Systems. EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, N.Y.).
- Buffer de corrimiento (Loading buffer). Ver ANEXO
- Marcador molecular de 1 Kb 250μlg, 1μg/μl (GIBCO BRL, Life Technologies).
- Bromuro de etidio 10mg/ml (SIGMA).

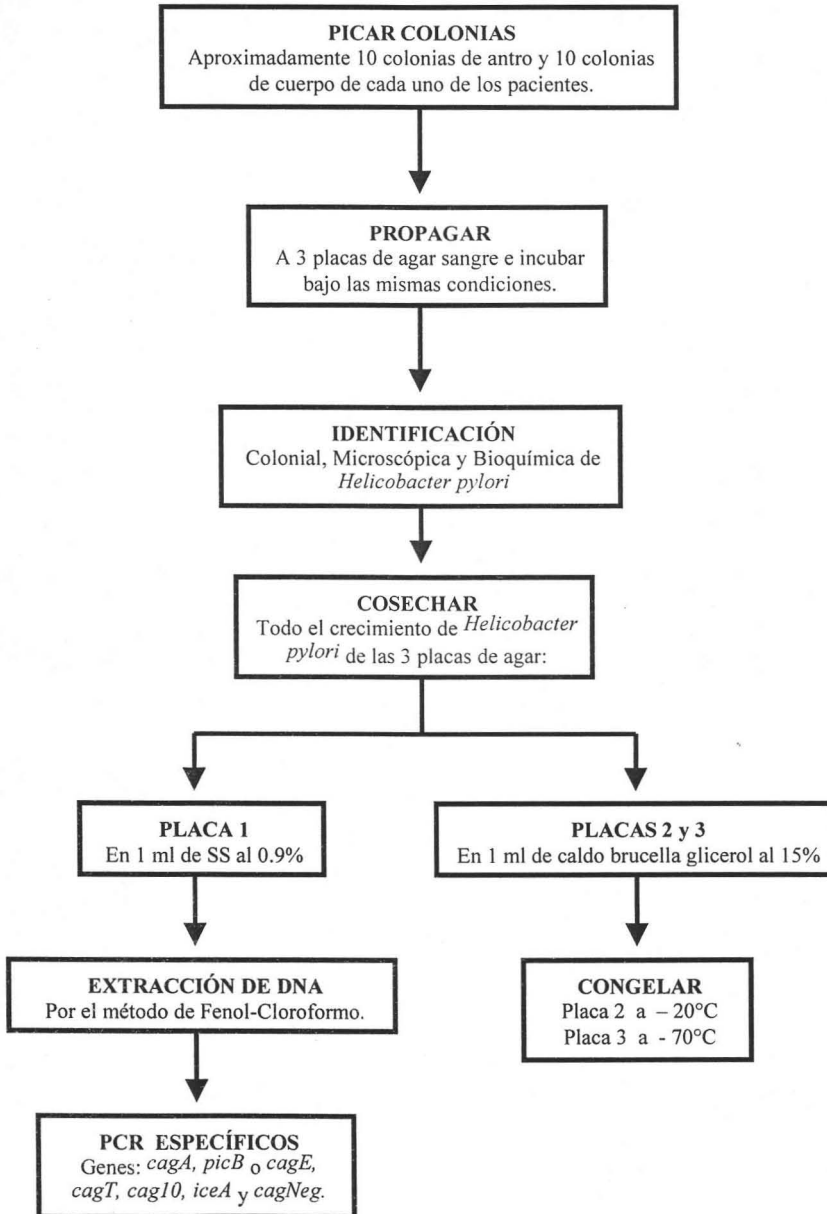
VII. – 5 EQUIPOS

- Estufa de CO₂ (CO₂ Water-Jacketed Incubator, AIRE™ US Autoflow, NUAIRE).
- Microscopio de luz (NIKON).
- Refrigerador de –20°C (Isotemp, Fisher Scientific).
- Refrigerador de –70°C (Freezer, Forma Scientific).
- Microcentrifuga refrigerada (Sorvall RMC 14).
- Baño María (Water Bath, Lab-Line Imperial IV).
- Campana de Flujo Laminar (Biological Safety Cabinets, NUAIRE).
- Espectrofotómetro. Ultrospec 2000 UV/visible Spectro Photometer Pharmacia Biotech.
- Termociclador (GeneAmp® PCR Systems 9700, PE Applied Biosystems).
- Cámara de Electroforesis Horizontal (DNA Sub Cell, BIO-RAD).
- Fuente de Poder (Power Pac 300, BIO-RAD).
- Agitador (Orbitron Rotator II, Boekel Scientific).
- Procesador de imágenes para observar los geles (Documentador de Geles Genegenius, Syngene. Synoptics. LTD).

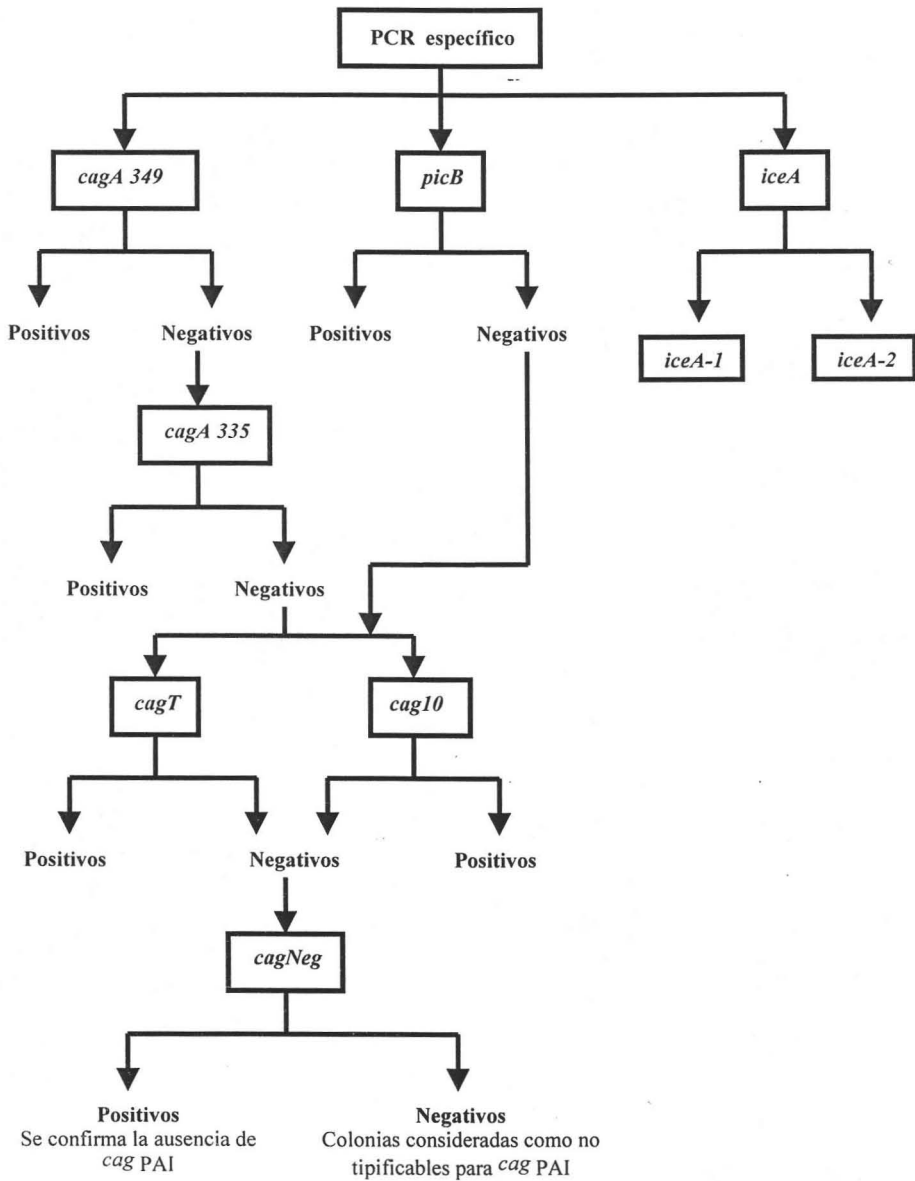
VII. - 6 ALGORITMO 1.- Procesamiento de las Muestras Biológicas.



VII. - 7 ALGORITMO 2.- Obtención de Colonias (Clonas)



VII.- 8 ALGORITMO 3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



VII. – 9 METODOLOGIA

Se realizó el mismo procedimiento tanto en niños como en adultos.

1. Se obtuvieron por endoscopia biopsias gástricas de antro y cuerpo de pacientes pediátricos y adultos infectados con *H. pylori*.
2. 2 biopsias de antro y 2 de cuerpo se transportaron en 1 ml de S.S.F. al 0.9% en hielo para procesarlas dentro de las 2 primeras horas después de la endoscopia.
3. Dos biopsias (1 de antro y 1 de cuerpo) se congelaron a -70°C en 500 μl de S.S.F. con glicerol para su conservación.
4. 1 biopsia de antro y 1 de cuerpo se homogeneizaron con 200 μl de S.S.F. Homogeneizar el tiempo necesario para destruir el tejido y no dañar a la bacteria.
5. Se sembraron 50 μl del homogeneizado en 2 placas de agar sangre de carnero al 5% (con y sin antibiótico), dispersando el homogeneizado por rotación de la placa.
6. El resto del homogeneizado se almacenó a -70°C con 2 gotas de glicerol.

NOTA: Los pasos 4-6 se llevaron a cabo en campana de flujo laminar.

7. Las placas se incubaron a 37°C con 9% de CO_2 durante 5-7 días.
8. Los cultivos sugestivos por morfología colonial a *H. pylori*, se identificaron por microscopia (tinción de Gram) y pruebas bioquímicas (ureasa y catalasa positivas).
9. Después de la identificación de *H. pylori* se picaron alrededor de 8 colonias de antro y 8 de cuerpo de cada muestra y se sembraron en $\frac{1}{4}$ de placa de agar sangre sin antibiótico.
10. Las placas se incubaron bajo las mismas condiciones durante 3-5 días.
11. Posteriormente se propagó el crecimiento del $\frac{1}{4}$ de placa a 3 placas de agar sangre sin antibiótico y se incubaron bajo las mismas condiciones que en el paso 10.

12. Se identificó *H. pylori* en las 3 placas de agar sangre como en el paso 8.
13. Todo el crecimiento de las placas se recolectó con isopos de algodón estériles:
 - PLACA 1.-** El crecimiento se resuspendió en 1 ml de S.S.F.
 - PLACA 2.-** El crecimiento se resuspendió en 1 ml de caldo brucella glicerol al 15% para congelar a -20°C .
 - PLACA 3.-** El crecimiento se resuspendió en 1 ml de caldo brucella glicerol al 15% para congelar a -70°C .
14. A partir del crecimiento cosechado de la placa 1 se realizó la extracción de DNA cromosomal de *H. pylori* por el método de Fenol-Cloroformo. (Ver ANEXO).
15. Posteriormente se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría a 260 nm con una dilución 1:500 de DNA ($2\mu\text{l}$ de DNA stock + $998\mu\text{l}$ de agua inyectable).
16. Se prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 100ng/ml de DNA para el PCR.

Metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1. Se seleccionaron por grupo los DNA's de cada pacientes para realizar PCR's específicos.
 2. Se identificaron cada uno de los tubos de reacción para el PCR incluyendo controles positivos, negativo y blanco de reacción para cada ensayo.
 3. Se preparó la mezcla de reacción para los PCR's (Tabla 6). El volumen de cada reactivo se multiplicó por el número de tubos totales adicionando un tubo extra.
 4. Se colocaron $49\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción a cada tubo previamente marcados.
 5. Se adicionó $1\mu\text{l}$ de DNA a cada uno de los tubos de reacción para los PCR's de *cagA 349*, *cagA 335*, *picB (cagE)*, *cagT*, *cag10* y *cagNeg* y $2\mu\text{l}$ para los PCR's de *iceA1* e *iceA2*.
-

6. Para cada ensayo también se prepararon tubos de reacción con DNA de controles positivos y negativos de acuerdo al gen amplificado. (Tabla 8).
7. Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador para la amplificación de los productos de acuerdo a los protocolos establecidos para cada gen. (Tablas 9 y 10).
8. Los productos del PCR se almacenaron a 4°C hasta su uso.
9. Los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en buffer Tris-Acido Acético-EDTA 1x (TAE).³⁶
10. Se mezclaron 2.5µl de buffer de corrimiento (loading buffer) con 10µl del producto de PCR, se colocaron 10µl de esta mezcla en cada pozo del gel y 8µl del marcador de 1 Kb.³⁶
11. El orden de colocación de las muestras en los geles de agarosa fue de la siguiente manera:

Marcador 1 Kb	Control + 1	Control + 2	Control -	Blanco	Muestra 1	Muestra 2
------------------	----------------	----------------	-----------	--------	--------------	--------------

12. La electroforesis horizontal se corrió a 150 volts durante 40-50 min.
13. Los geles de agarosa se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (100µl de bromuro de etidio a 10mg/ml en 500ml de buffer TAE 1x) durante 10 min.³⁶
14. Los geles de agarosa teñidos con bromuro se observaron con luz ultravioleta (UV) en el procesador de imágenes SYNGENE.³⁶
15. Se determinó como amplificación positiva cuando las muestras presentaron una banda de tamaño molecular igual a la banda de los controles positivos.

Tabla 6.- Cantidades y concentraciones de los reactivos usados para la mezcla de PCR

Reactivos	Volumen Total 50µl	Concentraciones Finales
Buffer de PCR 10x s/MgCl ₂	5 µl	1x
Cloruro de magnesio 50 mM	1.5 µl	1.5 mM
Mezcla de dNTP's 10 mM 1ul x 4	4.0 µl	0.2 mM c/u
Mezcla de primers 25 µM c/u*	1µl + 1µl	0.5 µM
Taq DNA polimerasa 5U/µl	0.5 µl	2.5 unidades
Agua inyectable estéril	36 µl o 37 µl	

La preparación de la mezcla de reacción se realizó en frío (hielo)

*El juego de primers utilizado para el PCR va a depender del gen que se amplifique. (Tabla 7)

Tabla 8.- DNA de controles positivos y negativos.

Genes	Controles Positivos	Controles Negativos
<i>cagA 349</i> <i>cagA 335</i> <i>picB</i>	Cepas Tipo: 84183 y B-128	Cepa Tipo: 86313
<i>cagNeg</i>	Cepa Tipo: 86313	Cepa Tipo: 84183
<i>cagT</i>	Cepas Tipo: 84183 y B-128	Cepas Tipo: 86313 y 8823
<i>cag10</i>	Cepa Tipo: 84183	Cepas Tipo: 86313, B-128 y 8823
<i>iceA1</i>	Cepa Tipo: J-176 Cepas Clínicas: 42-VO y 75-a	Cepa Tipo: 86313
<i>iceA2</i>	Cepas Tipo: J-178 y 84183	Cepas Clínicas: 75-a y 69

Tabla 7.- Secuencias y nombres de los iniciadores (primers) utilizados en la mezcla de reacción de PCR de acuerdo al gen que se amplificó.

Gen	Iniciadores	Secuencias de Nucleotidos	Tamaño del Producto	Ref.
<i>cagA 349</i>	F1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT TGA GG	349 pb	60
	B1	CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG		
<i>cagA 335</i>	<i>cagA-1</i>	AAG AAA GGC AAG CAG AAA A	335 pb	60
	<i>cagA-2</i>	ACA CAG AAG ACA GAG CGT TAT T		
<i>picB</i>	<i>picB 101</i>	TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC	510 pb	61
	<i>picB 102</i>	GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C		
<i>cagT</i>	<i>cag T-F</i>	ATG AAA GTG AGA GCA AGT GT	823 pb	34
	<i>cag T-R</i>	TCA CTT ACC ACT GAG CAA AC		
<i>cag10</i>	<i>cag 10-F</i>	ATG GAA GAC TTT TTG TAT AA	2208 pb	34
	<i>cag 10-R</i>	TCA CAG TTC GCT TGA ACC CA		
<i>cagNeg</i>	<i>cagNeg-2</i>	ACA TTT TGG CTA AAT AAA CGC TG	360 pb	1
	<i>cagNeg-25</i>	TCA TGC GAG CGG CGA TGT G		
<i>iceA1</i>	AN576	GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC	270 pb	33
	AN577	CTA TAG CCA STY TCT TTG CA		
<i>iceA2</i>	AN578	GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT	240 pb	33
	AN579	TTR CCC TAT TTT CTA GTA GGT		

Tabla 9.- Protocolos del termociclador para la amplificación de los genes *cagA-349*, *cagA-335*, *picB* y *cagT* estudiados.

<i>cagA 349</i>	<i>cagA 335</i>	<i>picB</i>	<i>cagT</i>
94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 30 seg
55°C 1 min	46°C 1 min	52°C 1 min	50°C 30 seg
72°C 2 min	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 2 min
35 ciclos	25 ciclos	35 ciclos	30 ciclos
72°C 6 min			

Tabla 10.- Protocolos del termociclador para la amplificación de los genes *cag10*, *cagNeg*, *iceA1* e *iceA2* estudiados.

<i>cag10</i>	<i>cagNeg</i>	<i>iceA1</i>	<i>iceA2</i>
94°C 30 seg	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min
52°C 30 seg	52°C 1 min	62°C 1min	54°C 1 min
72°C 2 min	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 1 min
30 ciclos	35 ciclos	30 ciclos	30 ciclos
		72°C 7 min	72°C 7 min

A todas las colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos se les determinó la presencia del gen *cagA* de la región *cagI* de *cag* PAI con 2 juegos de iniciadores; también se determinó la presencia del gen *picB* el cual también se localiza dentro de *cagI*. **(Figura 8)**

A todas las colonias que fueron negativas para *cagA* y/o *picB* se les determinó la presencia de los genes *cagT* y *cag10* para el análisis de la región *cagII* de *cag* PAI. **(Figura 8)**

A todas las colonias que no amplificaron para ninguno de los genes *cagA*, *picB*, *cagT*, *cagI0* se les determinó la ausencia de *cag* PAI con los iniciadores *cagNeg* que detecta la presencia del gen *grl*; para confirmar la presencia o ausencia de *cag* PAI en las colonias de *H. pylori* analizadas. (Figura 9)

Finalmente se determinó la presencia del gen *iceA* con 2 juegos de iniciadores, el primer juego se utilizó para determinar la presencia del alelo *iceA1* y el segundo juego se utilizó para determinar la presencia del alelo *iceA2*. (Figura 8)

VII. – 10 DEFINICIONES OPERACIONALES

INFECCION HOMOGENEA: Se considerará como infección homogénea, cuando todas las colonias de un mismo paciente presenten el mismo perfil genético. (Cuando dentro de un paciente solo exista un mismo tipo de cepa, ya sean cepas tipo I o cepas tipo II).

INFECCION HETEROGENEA o MIXTA: Se considerará como infección heterogénea o mixta, cuando todas las colonias de un mismo paciente presenten diferentes perfiles genéticos. Cuando dentro de un paciente existan diferentes tipos de cepas (cepas tipo I y cepas tipo II).

METODOLOGIA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

CEPAS TIPO I DE *Helicobacter pylori*:

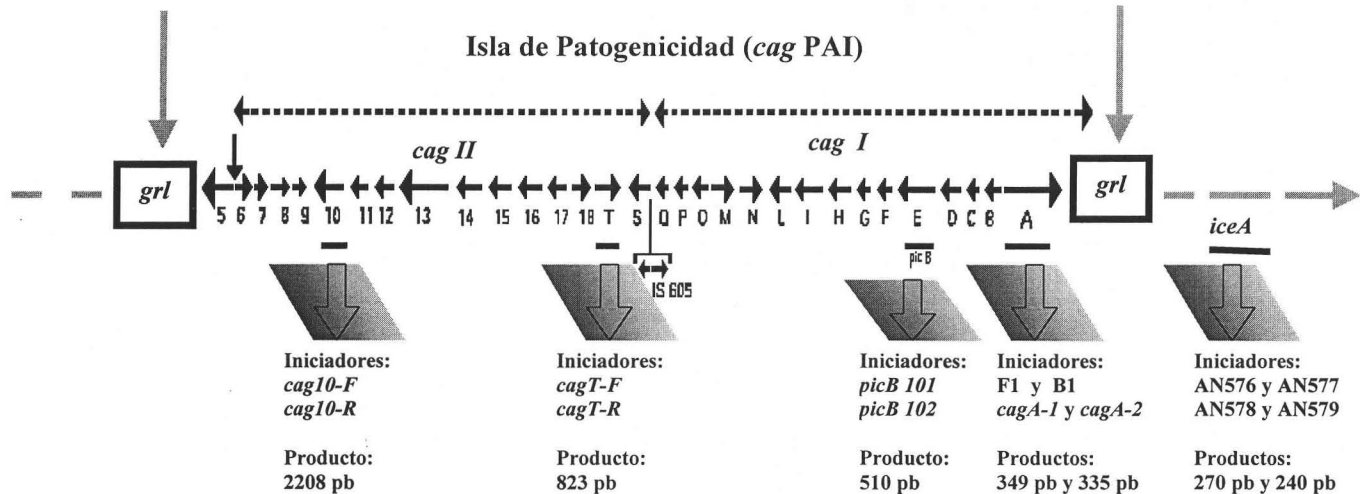


Figura 8- Esquema del genoma de *H. pylori* con el inserto de *cag* PAI y localización de cada uno de los genes que conforman las regiones *cag I* y *cag II*. Localización de los genes analizados en este trabajo (marcados con una línea) y señalando los iniciadores utilizados.

METODOLOGIA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

CEPAS TIPO II DE *Helicobacter pylori*:

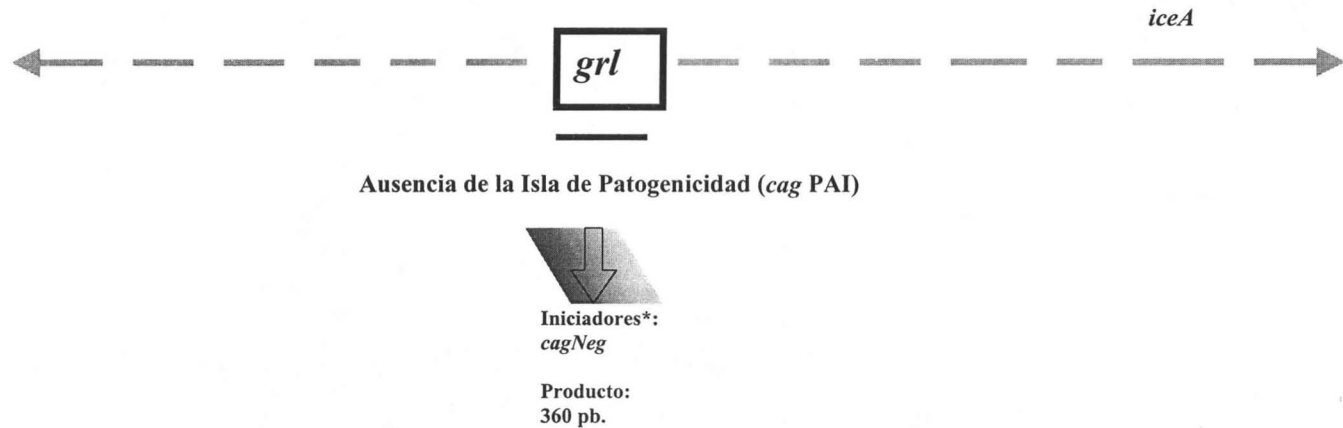


Figura 9- Esquema general del genoma de *H. pylori* sin el inserto de *cag* PAI. Señalando los iniciadores que se utilizaron para determinar la ausencia de *cag* PAI (marcada con una línea).

* Los iniciadores son para el gen *grl*.

VIII. RESULTADOS.

VIII. – 1 IMAGENES DE GELES DE AGAROSA

Inicialmente se determinó la presencia del gen *cagA* con el juego de iniciadores *cagA349* y posteriormente se usó otro juego de iniciadores *cagA335*, junto con las muestras problemas (**Mta**) se corrieron en el gel, el marcador de tamaño molecular de 1 Kb (**M**), los controles positivos (**C+**), los controles negativos (**C-**) y el blanco de reacción (**Bco**). (**Figura 10 a y b**).

De igual manera se determinó la presencia de los genes *picB*, *cagT*, *cag10* y la presencia de los alelos *iceA1* e *iceA2* del gen *iceA*, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para determinar la presencia del gen *cagA*. (**Figuras 11 a y b. 12 a. 13 a y b**)

También se confirmó la ausencia de *cag* PAI en todas aquellas colonias que fueron negativas para *cagA* utilizando un juego de iniciadores llamado *cagNeg*; la estrategia que se siguió en cuanto al procedimiento del PCR fue la misma que en las pruebas anteriores. (**Figura 12 b**).

Las muestras se consideraron como positivas cuando la banda del producto amplificado era del mismo tamaño molecular que la banda del producto amplificado por los controles positivos.

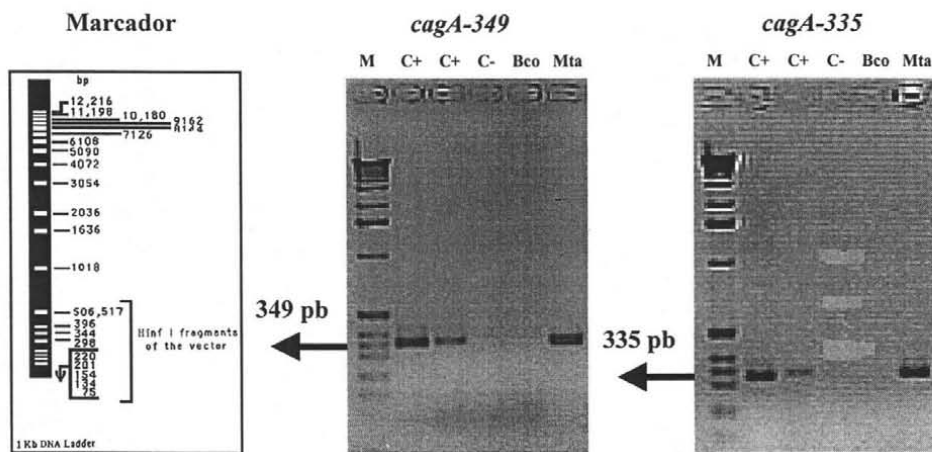


Figura 10 a

Figura 10 b

FIGURA 10- Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR *cagA*. En 10a y 10b, C+ = Cepas tipo 84183 y B-128 y C- = Cepa tipo 86313.

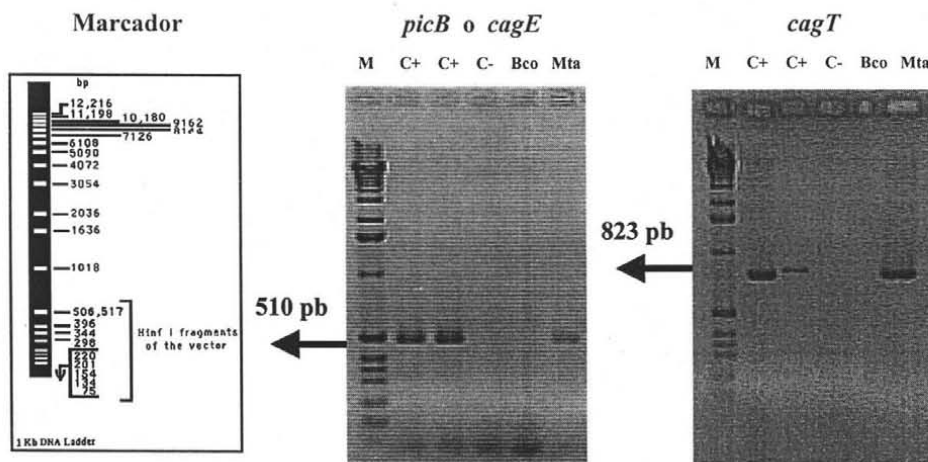


Figura 11 a

Figura 11 b

FIGURA 11- Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR *picB* y *cagT*. En 11a y 11b, C+ = Cepas tipo 84183 y B-128 y C- = Cepa tipo 86313.

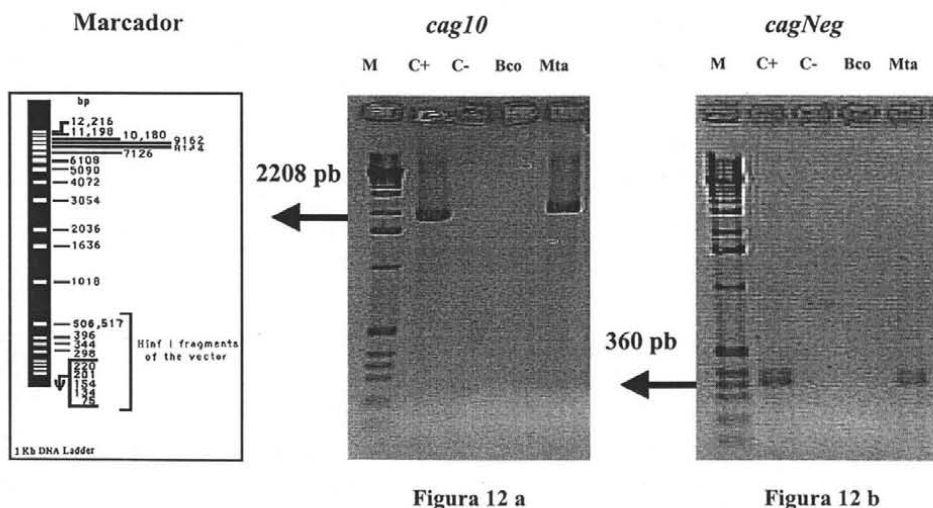


FIGURA 12- Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR *cag10* y *cagNeg*. En 12a, C+ = Cepa tipo 84183 y C- = Cepa tipo 86313. En 12b, C+ = Cepa tipo 86313 y C- = Cepa tipo 84183.

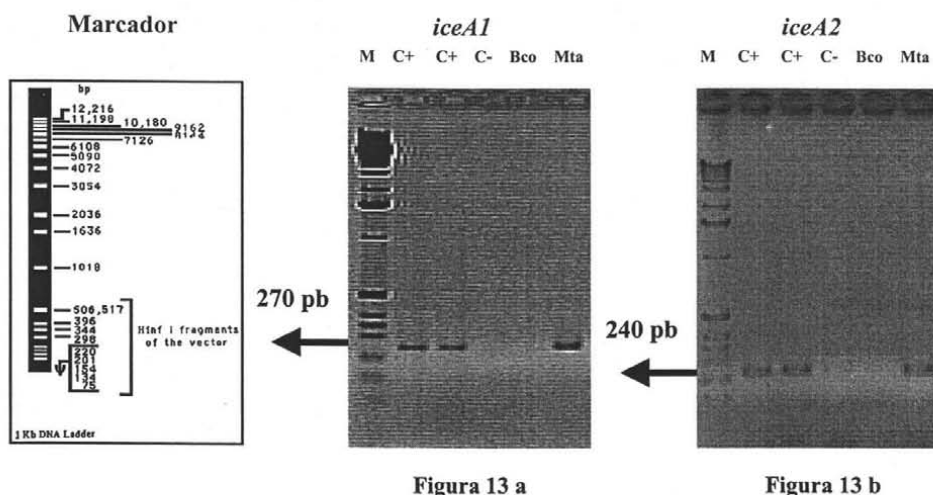


FIGURA 13- Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR *iceA1* e *iceA2*. En 13a, C+ = Cepas clínicas 42-VO, 75a y C- = Cepa tipo 86313. En 13b, C+ = Cepas tipo J-178, 84183 y C- = Cepas clínicas 75a y 69.

VIII. – 2 RESULTADOS DEL PCR ESPECIFICO

NIÑOS CON GASTRITIS CRÓNICA ACTIVA (GCA): ..

Todas las colonias analizadas de 9 de los 13 niños con GCA, fueron *cagA*+ y todas las colonias de 7 niños fueron *picB*+, por lo que se consideró que *cag* PAI esta presente en todas las colonias de estos pacientes. Se documentó diversidad en 4 pacientes con respecto a la presencia de *cagA*, ya que en un mismo paciente existen colonias *cagA*+ y *cagA*- y en 5 pacientes con respecto a la presencia de *picB* pues en un mismo paciente existen colonias *picB*+ y *picB*-; todas las colonias aisladas de 1 paciente fueron negativas para el gen *picB*. (Tabla 11)

A las colonias de los 7 pacientes con variabilidad en la presencia de los genes *cagA* y *picB* de la región derecha (*cagI*) de *cag* PAI, se les realizó PCR específico para los genes *cagT* y *cag10* de la región izquierda (*cagII*) de *cag* PAI; en todas las colonias de 3 niños se logró determinar la presencia de ambos genes de la región izquierda de *cag* PAI (Tabla 11). Finalmente, en algunas de las colonias de 4 pacientes se encontró diversidad en cuanto a la presencia de los genes *cagT* y *cag10*, por lo que se realizó un PCR específico (*cagNeg*) para verificar la ausencia de *cag* PAI. Solo en 1 paciente se demostró realmente la ausencia de *cag* PAI en las colonias estudiadas, en los otros 3 pacientes no se confirmó la ausencia de *cag* PAI; cabe mencionar que en 1 de los 3 pacientes (13) se encontraron 9 colonias negativas para los 4 genes estudiados, sin embargo, no se confirmó la ausencia de *cag* PAI por lo que estas colonias fueron consideradas como no tipificables para *cag* PAI. (Tabla 11)

Posteriormente se determinó la presencia de los alelos de *iceA* que es otro gen de *H. pylori* relacionado a virulencia el cual se encuentra fuera de *cag* PAI. De los 13 niños 12 presentaron ambos alelos y solamente 1 paciente predominó la presencia del alelo *iceA2*. (Tabla 12)

Tabla 11- Resultados de la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag* PAI mediante PCR específico en niños con GCA infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Región <i>cagI</i>		Región <i>cagII</i>		<i>cag</i> PAI (-)
	<i>cagA</i>	<i>cagE (picB)</i>	<i>cagT</i>	<i>cag10</i>	<i>cagNeg</i>
5	+	+	N.D	N.D	N.D
6	+	+	N.D	N.D	N.D
7	+	+	N.D	N.D	N.D
12	+	+	N.D	N.D	N.D
1	+	+	N.D	N.D	N.D
10 *	+	+	N.D	N.D	N.D
11	+/-	+	+	+/-	-
3	+	+/-	+	+	N.D
2	+	+/-	+	+	N.D
9	+	+/-	+	+	N.D
8	+/-	+/-	+/-	+	-
13	+/-	-	+/-	+/-	-
4	+/-	+/-	+/-	+/-	+

* Paciente con un cuadro clínico de Metaplasia Intestinal (MI).

+ Presencia del gen en todas las colonias.

- Ausencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias aisladas.

N. D. Gen no determinado en el estudio.

Tabla 12- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en niños con GCA infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Alelo <i>iceA1</i>	Alelo <i>iceA2</i>	Gen <i>iceA</i>
2	+/-	+/-	+/-
3	+/-	+/-	+/-
5	+	+/-	+
6	+/-	+/-	+/-
7	+	+	+
9	+/-	+	+
12	+/-	+/-	+/-
1	+	+	+
4	+/-	+/-	+/-
8	+/-	+	+
11	+/-	+/-	+/-
13	+/-	+/-	+
10 *	-	+/-	+/-

* Paciente con un cuadro clínico de MI

+ Presencia del gen en todas las colonias.

- Ausencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias del paciente.

ADULTOS CON GASTRITIS CRÓNICA (GC) :

Todas las colonias de 9 de 14 pacientes fueron *cagA*+ y 4 *picB*+. Por otro lado se documentó diversidad en cuanto a la presencia de *cagA* en 4 pacientes y de *picB* en 7 pacientes; en 1 paciente todas las colonias fueron *cagA*- y en 3 pacientes fueron *picB*-.

En 10 pacientes, se determinó la presencia de los genes *cagT* y *cag10* de *cag II* (*cag PAI*) y en 3 pacientes se confirmó la ausencia de *cag PAI*. (Tabla 13)

En cuanto a la presencia de *iceA*. 7. pacientes presentaron solo *iceA2*, en 1 predominó *iceA2* aunque también estaba presente *iceA1* y 6 presentaron ambos alelos. (Tabla 14)

Tabla 13.- Resultados de la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag PAI* mediante PCR específico en adultos con GC infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Región <i>cagI</i>		Región <i>cagII</i>		<i>cag PAI (-)</i>
	<i>cagA</i>	<i>cagE (picB)</i>	<i>cagT</i>	<i>cag10</i>	<i>cagNeg</i>
5	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
4	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
6	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
14	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
3	+	+/-	+	+	N. D.
7	+	+/-	+	-	N. D.
9	+	+/-	+	+	N. D.
12	+	+/-	+	+	N. D.
13	+	+/-	+	+	N. D.
11	+/-	+/-	+	+/-	N. D.
10	-	+/-	+/-	+	N. D.
8	+/-	-	+/-	+/-	+
1	+/-	-	+/-	-	+
2	+/-	-	+/-	+/-	+

+ Presencia del gen en todas las colonias.

- Ausencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias aisladas del paciente.

N. D. Gen no determinado en el estudio.

Tabla 14.- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en adultos con GC infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Alelo <i>iceA1</i>	Alelo <i>iceA2</i>	Gen <i>iceA</i>
1	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
6	-	+	+
7	-	+	+
9	-	+	+
14	-	+	+
2	-	+/-	+/-
13	+/-	+	+
10	+	+/-	+
5	+/-	+/-	+
12	+/-	+/-	+/-
8	+/-	+/-	+
11	+/-	+/-	+/-

+ Presencia del gen en todas las colonias.

- Ausencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias aisladas del paciente.

PACIENTES CON ULCERA GÁSTRICA (UG) :

Todas las colonias de 3 pacientes fueron *cagA*+ y de 2 *picB*+; se documentó diversidad en 1 paciente con respecto a *cagA* y en 2 con respecto al gen *picB*. Solo en 1 paciente se determinó la presencia de *cagII* y en 1 paciente se confirmó la ausencia de *cag* PAI. (Tabla 15)

Tabla 15- Resultados de la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag* PAI mediante PCR específico en adultos con UG infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Región <i>cagI</i>		Región <i>cagII</i>		<i>cag</i> PAI (-)
	<i>cagA</i>	<i>cagE</i> (<i>picB</i>)	<i>cagT</i>	<i>cag10</i>	<i>cagNeg</i>
3	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
1	+	+	N. D.	N. D.	N. D.
4	+	+/-	+	+	N. D.
2	+/-	+/-	N. D.	N. D.	+/-

+ Presencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias aisladas del paciente.

N. D. Gen no determinado en el estudio.

Con respecto a los alelos de *iceA*, 3 pacientes presentaron ambos alelos (*iceA1+*, *iceA2+*) y solo en 1 paciente se documentó el dominio del alelo *iceA2*. (Tabla 16)

Tabla 16- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en adultos con UG infectados con *H. pylori*.

PACIENTE	Alelo <i>iceA1</i>	Alelo <i>iceA2</i>	Gen <i>iceA</i>
1	+	+/-	+
4	-	+/-	+/-
3	+/-	+	+
2	+/-	+/-	+/-

+ Presencia del gen en todas las colonias.

- Ausencia del gen en todas las colonias.

+/- Presencia y ausencia del gen en las colonias aisladas del paciente.

VIII. – 3 RESULTADOS DEL ANALISIS DE COLONIAS

NIÑOS CON GASTRITIS CRÓNICA ACTIVA (GCA) :

En cuanto a la presencia de *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* en las colonias de *H. pylori* aisladas, se encontraron 12 pacientes con infección homogénea y 1 con infección mixta. (Tabla 17)

Tabla 17- Resultados de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA.

PACIENTE	COLONIAS	Región <i>cag I</i>				Región <i>cag II</i>				<i>cag PAI</i>		INFECCION
		<i>cagA</i>		<i>picB</i>		<i>cagT</i>		<i>cag10</i>		<i>cagNeg</i>		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
2	25	25	0	22	3	3	0	3	0	0	25	Homogénea
3	26	26	0	25	1	1	0	1	0	0	26	Homogénea
5	18	18	0	18	0	0	0	0	0	0	18	Homogénea
6	13	13	0	13	0	0	0	0	0	0	13	Homogénea
7	8	8	0	8	0	0	0	0	0	0	8	Homogénea
9	15	15	0	10	5	5	0	5	0	0	15	Homogénea
10 *	12	12	0	12	0	0	0	0	0	0	12	Homogénea
12	24	24	0	24	0	0	0	0	0	0	24	Homogénea
1	16	16	0	16	0	0	0	0	0	0	16	Homogénea
8	9	2	7	8	1	6	1	7	0	0	9	Homogénea
11	13	11	2	13	0	2	0	1	1	0	13	Homogénea
13	21	12	9	0	21	1	9	3	9	0	21	Homogénea
4	10	1	9	1	9	0	9	0	9	9	1	Mixta

NOTA: Solo se realizó PCR para *cagT* y *cag10* en aquellas colonias que fueron *cagA*- y/o *picB*-

* Paciente con un cuadro clínico de MI.

Con respecto a la presencia de *iceA* se encontró que en 6 pacientes predominó *iceA1*; en 5 *iceA2* y en 2 están presentes ambos alelos. (Tabla 18)

Tabla 18.- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA.

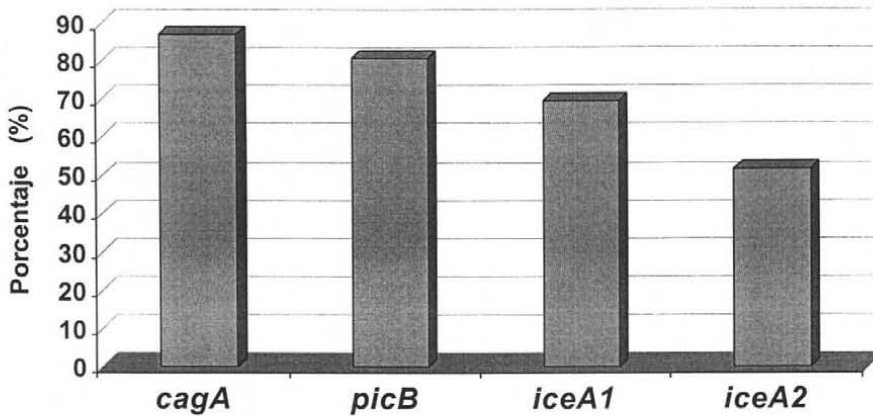
PACIENTE	COLONIAS	Alelo <i>iceA1</i>		Alelo <i>iceA2</i>		Gen <i>iceA</i>		<i>iceA1</i> / <i>iceA2</i>	
		+	-	+	-	+	-	+	-
2	25	21	4	5	20	23	2	3	2
3	26	15	11	5	21	20	6	0	6
5	18	18	0	12	6	18	0	12	0
12	24	17	7	5	19	18	6	4	6
11	13	8	5	2	11	9	4	1	4
13	21	20	1	5	16	21	0	4	0
6	13	5	8	8	5	11	2	2	2
9	15	5	10	15	0	15	0	5	0
8	9	7	2	9	0	9	0	7	0
4	10	6	4	8	2	9	1	5	1
7	8	8	0	8	0	8	0	8	0
1	16	16	0	16	0	16	0	16	0
10 *	12	0	12	11	1	11	1	0	1
Total	210	146	64	109	101	188	22	134	76

* Paciente con un cuadro clínico de MI.

De los 13 pacientes, se obtuvieron un total de 210 colonias de *H. pylori* de las cuales:

El 87.1% fueron *cagA*+; el 80.9% *picB*+; el 69.5% *iceA1*+; el 51.9% *iceA2*+; el 89.5% *iceA*+ y el 31.9% *iceA1*+ / *iceA2*+. (Gráfica 3)

Gráfica 3.- Presencia de los genes *cagA* , *picB* e *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA.



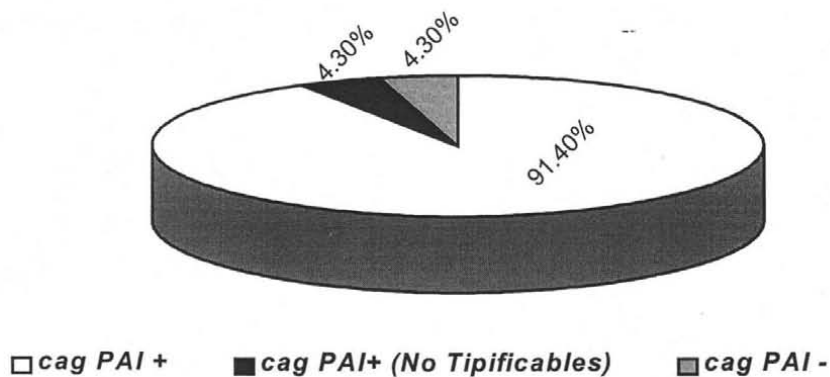
Para el estudio de *cagII* solo se analizaron las colonias que fueron *cagA*- y/o *picB*-, sumando un total de 39 colonias de las cuales 18 fueron *cagT*+, 20 *cagI0*+ y 16 *cagT*+ y *cagI0*+.

Después de la estrategia anterior se encontraron 9 colonias (4.3%) *cagA*-, *picB*-, *cagT*- y *cagI0*- en un mismo paciente (13), sin embargo, no se confirmó la ausencia de *cag* PAI, por lo cual fueron consideradas como colonias no tipificables para *cag* PAI.

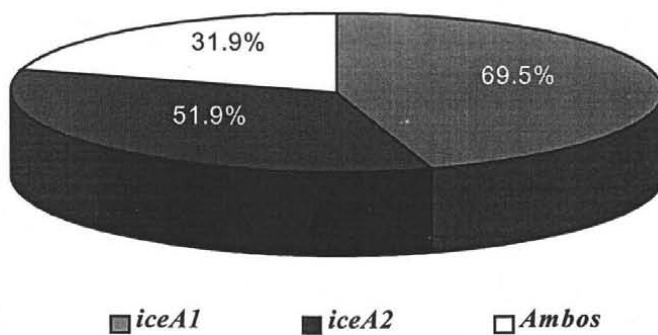
En total el 91.4% de las colonias fueron *cag* PAI+, el 4.3% *cag* PAI- y el 4.3% fue *cag* PAI no tipificable. (Gráfica 4)

Con respecto a *iceA* el 69.5% fue *iceA1*+; el 51.9% *iceA2*+ y el 31.9% *A1*+ - *A2*+. (Gráfica 5)

Gráfica 4- Distribución de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en niños con GCA.



Gráfica 5- Distribución de la presencia de los alelos del gen *iceA* mediante PCR específico en niños con GCA.



Al analizar la presencia de *cagA*, *picB*, *cagT*, *cag10* e *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas, se logró documentar que existe diversidad dentro de un mismo paciente. (Tabla 19 y 20)

Tabla 19.- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados del PCR específico de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* (*cag* PAI) en niños con GCA.

Patrones de Genotipificación	1 Patrón	2 Patrones	3 Patrones	4 Patrones
PACIENTES	6	4	1	2

Tabla 20.- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados obtenidos del PCR específico del gen *iceA* en niños con GCA.

Patrones de Genotipificación	1 Patrón	2 Patrones	3 Patrones	4 Patrones
PACIENTES	1	5	2	5

Con respecto a la asociación entre la presencia de *cagA*, *picB* e *iceA*. Se logró documentar que la asociación entre *cagA* y *picB* es mayor que entre *cagA* e *iceA*. También se demostró que existe asociación entre *cagA*- (NT) y *picB* e *iceA*, solo existe asociación entre *cagA*- e *iceA*. (Tabla 21)

También se estableció la asociación entre la presencia de *cagA*, *picB* e *iceA*. (Tabla 22)

Tabla 21.- Asociación entre la presencia de *cagA*, *picB* e *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA.

GENES	<i>cagA</i> + n = 183 Colonias (%)	<i>cagA</i> - (N. T.) n = 18 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 9 Colonias (%)
<i>picB</i> +	162 (88.5)	8 (44.4)	0 (0)
<i>picB</i> -	21 (11.5)	10 (55.5)	9 (100)
<i>iceA1</i> +	126 (68.8)	14 (77.8)	5 (55.6)
<i>iceA1</i> -	57 (31.1)	4 (22.2)	4 (44.4)
<i>iceA2</i> +	94 (51.4)	7 (38.9)	8 (88.9)
<i>iceA2</i> -	89 (48.6)	11 (61.1)	1 (11.1)

Tabla 22.- Asociación entre la presencia de los genes *cagA*, *picB* y los alelos del gen *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños con GCA.

GENES	<i>cagA</i> + n = 183 Colonias (%)	<i>cagA</i> - (N. T.) n = 18 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 9 Colonias (%)
<i>picB</i> +/ <i>iceA1</i> +	113 (61.7)	5 (27.8)	0 (0)
<i>picB</i> +/ <i>iceA2</i> +	85 (46.4)	6 (33.3)	0 (0)

ADULTOS CON GASTRITIS CRÓNICA (GC) :

En el análisis de la presencia de *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag* PAI, se encontró que 11 pacientes tienen infección homogénea y 3 tiene infección mixta. (Tabla 23)

Tabla 23- Resultados de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos con GC.

PACIENTE	COLONIAS	Región <i>cag I</i>				Región <i>cag II</i>				<i>cag PAI</i>		INFECCION
		<i>cagA</i>		<i>picB</i>		<i>cagT</i>		<i>cag10</i>		<i>cagNeg</i>		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
5	12	12	0	12	0	0	0	0	0	0	12	Homogénea
4	13	13	0	13	0	0	0	0	0	0	13	Homogénea
6	12	12	0	12	0	0	0	0	0	0	12	Homogénea
14	13	13	0	13	0	0	0	0	0	0	13	Homogénea
3	12	12	0	11	1	1	0	1	0	0	12	Homogénea
7	9	9	0	8	1	1	0	0	1	0	9	Homogénea
9	10	10	0	9	1	1	0	1	0	0	10	Homogénea
12	21	21	0	17	4	4	0	4	0	0	21	Homogénea
13	14	14	0	13	1	1	0	1	0	0	14	Homogénea
11	10	8	2	9	1	3	0	0	3	0	10	Homogénea
10	17	0	17	1	16	1	16	17	0	0	17	Homogénea
8	6	3	3	0	6	2	2	2	2	2	14	Mixta
1	10	1	9	0	10	1	0	0	1	9	1	Mixta
2	15	2	13	0	15	2	0	1	1	13	2	Mixta

NOTA : Solo se realizó PCR para *cagT* y *cag10* en aquellas colonias que fueron *cagA*- y/o *picB*-

En cuanto a la presencia de *iceA* se encontró que en 7 pacientes predominó *iceA2*; en 1 *iceA2* e *iceA1* y en 4 están presentes ambos alelos. (Tabla 24)

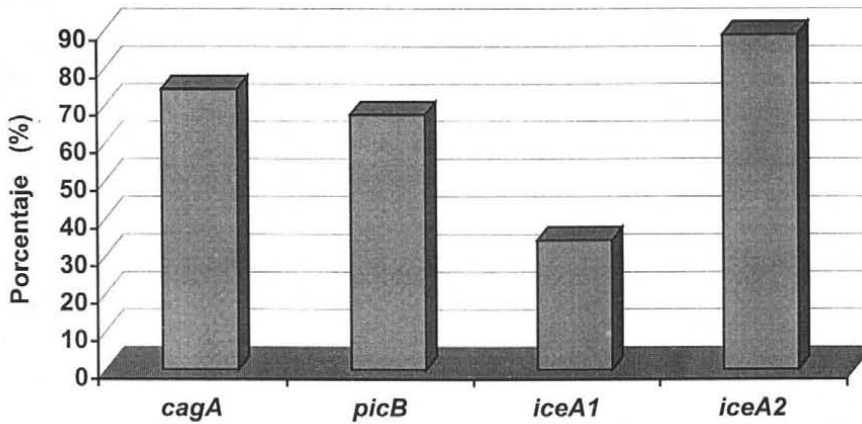
Tabla 24.- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos con GC.

PACIENTE	COLONIAS	Alelo <i>iceA1</i>		Alelo <i>iceA2</i>		Gen <i>iceA</i>		<i>iceA1</i> / <i>iceA2</i>	
		+	-	+	-	+	-	+	-
3	12	0	12	12	0	12	0	0	0
4	13	0	13	13	0	13	0	0	0
6	12	0	12	12	0	12	0	0	0
7	9	0	9	9	0	9	0	0	0
9	10	0	10	10	0	10	0	0	0
14	13	0	13	13	0	13	0	0	0
1	10	0	10	10	0	10	0	0	0
2	15	0	15	14	1	14	1	0	1
5	12	7	5	10	2	12	0	5	0
12	21	19	2	19	2	19	2	19	2
13	14	12	2	14	0	14	0	12	0
8	6	3	3	5	1	6	0	2	0
10	17	17	0	13	4	17	0	13	0
11	10	2	8	1	9	2	8	1	8
Total	174	60	114	155	19	163	11	52	11

De los 14 pacientes, se obtuvieron un total de 174 colonias de *H. pylori* de las cuales:

El 74.7% fue *cagA*+; el 67.8% *picB*+; el 34.5% *iceA1*+; el 89.1% *iceA2*+; el 93.7% *iceA*+ y el 29.9% *iceA1*+ / *iceA2*+. (Gráfica 6).

Gráfica 6.- Presencia de los genes *cagA*, *picB* e *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos con GC.

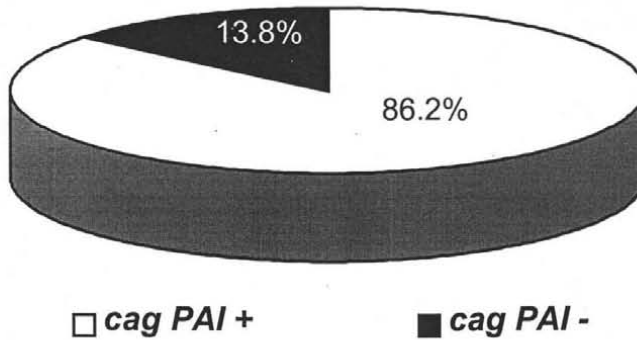


Para el estudio de *cagII* solo se analizaron las colonias que fueron *cagA*- y/o *picB*-, sumando un total de 35 colonias de las cuales 17 fueron *cagT*+, 27 *cagI0*+ y 11 *cagT*+ y *cagI0*+

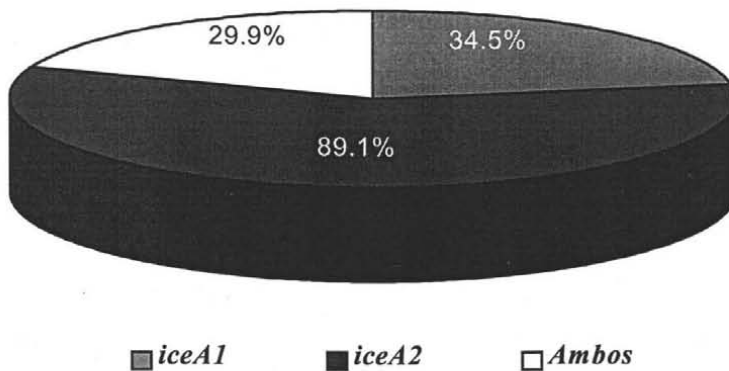
En total el 86.2% fue *cag* PAI+ y el 13.8% fue *cag* PAI- (pertenecen a 3 pacientes). (Gráfica 7)

Con respecto a la presencia de los alelos de *iceA* en las colonias de *H. pylori* tenemos que el 34.5% fue *iceA1*+; el 89.1% *iceA2*+ y el 29.9% presentaron ambos alelos. (Gráfica 8)

Gráfica 7- Distribución de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en adultos con GC.



Gráfica 8- Distribución de la presencia de los alelos del gen *iceA* mediante PCR específico en adultos con GC.



Al analizar la presencia de *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* e *iceA*, en las colonias de *H. pylori*, se logró documentar que existe diversidad dentro de un mismo paciente. (Tabla 25 y 26)

Tabla 25- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados del PCR específico de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* (*cag* PAI) en adultos con GC.

Patrones de Genotipificación	5 Patrón	6 Patrones	7 Patrones	8 Patrones
PACIENTES	4	6	3	1

Tabla 26- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados obtenidos del PCR específico del gen *iceA* en adultos con GC.

Patrones de Genotipificación	5 Patrón	6 Patrones	7 Patrones
PACIENTES	7	4	3

ADULTOS CON ULCERA GÁSTRICA (UG) :

En el análisis de la presencia de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* de *cag* PAI, se encontró que 3 pacientes tienen infección homogénea y 1 tiene infección mixta. (Tabla 27)

En cuanto a la presencia de *iceA*, se encontró que en 1 paciente solo se encuentra *iceA2*, en 2 pacientes *iceA2* e *iceA1* y en 3 pacientes están presentes ambos alelos. (Tabla 28)

Tabla 27- Resultados de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* de adultos con UG.

PACIENTE	COLONIAS	Región <i>cag I</i>				Región <i>cag II</i>				<i>cag PAI</i>		INFECCION
		<i>cagA</i>		<i>picB</i>		<i>cagT</i>		<i>cag10</i>		<i>cagNeg</i>		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
3	11	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	Homogénea
1	6	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	Homogénea
4	12	12	0	11	1	1	0	1	0	0	0	Homogénea
2	16	7	9	7	9	0	0	0	0	9	0	Mixta

NOTA : Solo se realizó PCR para *cagT* y *cag10* en aquellas colonias que fueron *cagA*- y/o *picB*-

Tabla 28 .- Resultados de la presencia del gen *iceA* mediante PCR específico en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos con UG.

PACIENTE	COLONIAS	Alelo <i>iceA1</i>		Alelo <i>iceA2</i>		Gen <i>iceA</i>		<i>iceA1 / iceA2</i>	
		+	-	+	-	+	-	+	-
2	6	6	0	5	1	6	0	4	0
3	11	1	10	11	0	11	0	1	0
1	16	1	15	14	2	15	1	0	1
4	12	0	12	11	1	11	1	0	1
TOTAL	45	8	37	41	4	43	2	5	2

De los 4 pacientes, se obtuvieron un total de 45 colonias de *H. pylori* de las cuales:

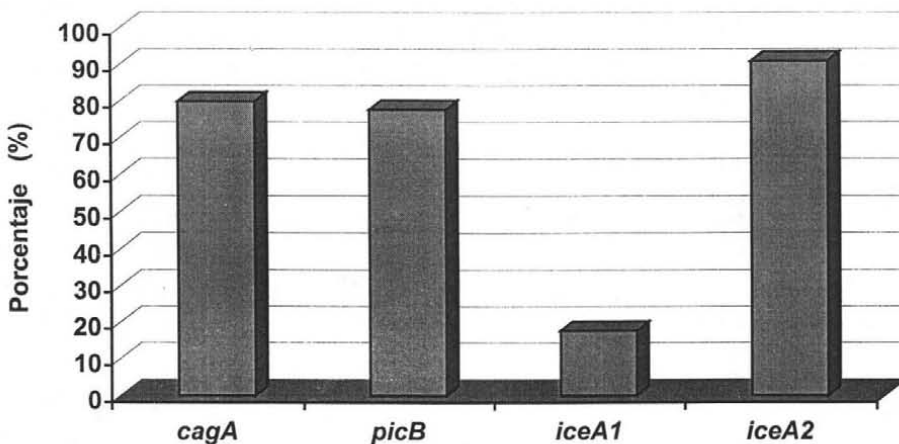
El 80% fue *cagA*+; el 77.8% *picB*+; el 17.8% *iceA1*+; el 91.1% *iceA2*+; el 95.5% *iceA*+ y el 11.1% *iceA1*+ / *iceA2*+. (Gráfica 9)

Solo se analizó 1 colonia para *cagII* y esta fue *cagT*+ y *cagI0*+.

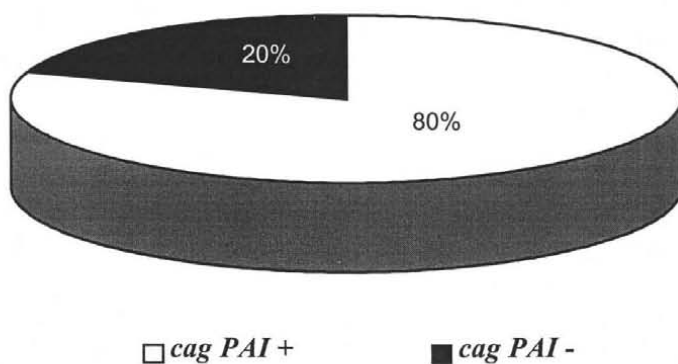
En total el 80% fue *cag* PAI+ y el 20% fue *cag* PAI-. (Gráfica 10)

Con respecto a la presencia de los alelos de *iceA* se encontró que el 17.8% fue *iceA1*+, el 91.1% fueron *iceA2*+ y el 11.1% presentaron ambos alelo. (Gráfica 11)

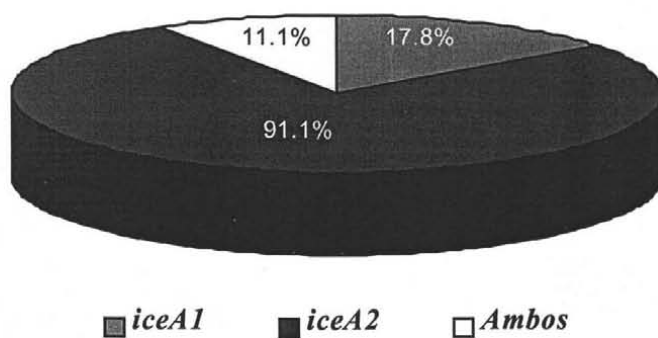
Gráfica 9.- Presencia de los genes *cagA*, *picB* e *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos con UG.



Gráfica 10- Distribución de la presencia de *cag* PAI mediante PCR específico en adultos con UG



Gráfica 11- Distribución de la presencia de los alelos del gen *iceA* en adultos con UG.



Se logró documentar diversidad dentro de un mismo paciente con respecto a presencia de los genes de *H. pylori* asociados a virulencia (*cagA*, *picB*, *cagT*, *cag10* e *iceA*),. (Tabla 29 y 30)

Tabla 29.- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados del PCR específico de los genes *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* (*cag* PAI) en adultos con UG.

Patrones de Genotipificación	1 Patrón	2 Patrones
PACIENTES	2	2

Tabla 30.- Patrones de genotipificación de acuerdo a los resultados obtenidos del PCR específico del gen *iceA* en adultos con UG.

Patrones de Genotipificación	2 Patrón	3 Patrones
PACIENTES	2	2

En total de las 219 colonias aisladas de adultos (GC y UG), el 84.9% fue *cag* PAI+, el 15.1% *cag* PAI-; el 30.6% *iceA1*+, el 89.5% *iceA2*+, el 94.1% *iceA*+ y el 26.5% presentaron ambos alelos. (Tabla 31)

Tabla 31- Resultados comparativos y globales de la presencia de *cag* PAI e *iceA* mediante PCR específico en las colonias de *H. pylori* aisladas de adultos.

GENES	DIAGNOSTICO		TOTAL
	GASTRITIS CRONICA	ULCERA GASTRICA	
	14 Pacientes n = 174 Colonias	4 Pacientes n = 45 Colonias	18 Pacientes n = 219 Colonias
	No. Colonias (%)	No. Colonias (%)	No. Colonias (%)
<i>cag</i> PAI + (<i>cag A, E, T, 10</i>)	150 (86.2)	36 (80)	186 (84.9)
<i>cag</i> PAI -	24 (13.8)	9 (20)	33 (15.1)
<i>iceA1</i> +	60 (34.5)	7 (15.5)	67 (30.6)
<i>iceA1</i> -	114 (65.5)	38 (84.5)	152 (69.4)
<i>iceA2</i> +	155 (89.1)	41 (91.1)	196 (89.5)
<i>iceA2</i> -	19 (10.9)	4 (8.9)	23 (10.5)
<i>iceA</i> +	163 (93.7)	43 (95.5)	206 (94.1)
<i>iceA</i> -	11 (6.3)	2 (4.5)	13 (5.9)
<i>iceA1</i> +/ <i>iceA2</i> +	52 (29.9)	5 (11.1)	58 (26.5)

Se determinó la asociación entre *cagA*, *picB* e *iceA*. (Tabla 32). Así mismo la asociación entre *cagA*, *picB* e *iceA* en las colonias de *H. pylori* aisladas de adultos. (Tabla 33)

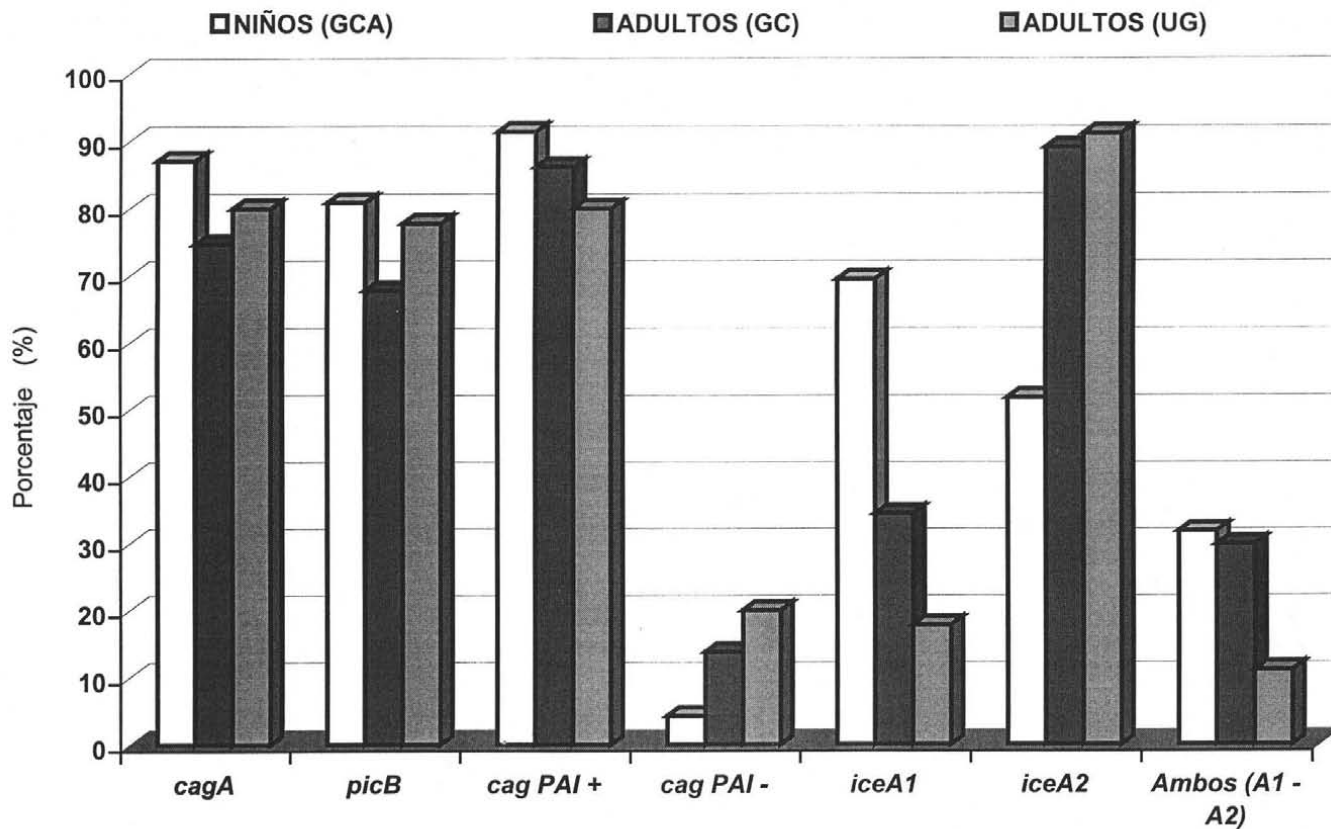
Tabla 32- Asociación entre la presencia de *cagA* con *picB* y los alelos de *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos.

GENES	GASTRITIS CRONICA			ULCERA GASTRICA	
	n = 174 colonias			n = 45 colonias	
	<i>cagA</i> + n = 130 Colonias (%)	<i>cagA</i> - (N. T.) n = 20 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 24 Colonias (%)	<i>cagA</i> + n = 36 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 9 Colonias (%)
<i>picB</i> +	115 (88.5)	3 (15)	0 (0)	35 (97.2)	0 (0)
<i>picB</i> -	15 (11.5)	17 (85)	24 (100)	1 (2.8)	9 (100)
<i>iceA1</i> +	42 (32.3)	18 (90)	0 (0)	6 (16.7)	1 (11.1)
<i>iceA1</i> -	88 (67.7)	2 (10)	24 (100)	30 (83.3)	8 (88.9)
<i>iceA2</i> +	118 (90.8)	13 (65)	23 (95.8)	33 (91.7)	8 (88.9)
<i>iceA2</i> -	12 (9.2)	7 (35)	1 (4.2)	3 (8.3)	1 (11.1)

Tabla 33- Asociación entre la presencia de los genes *cagA*, *picB* y los alelos del gen *iceA* en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos.

GENES	GASTRITIS CRONICA			ULCERA GASTRICA	
	n = 174 colonias			n = 45 colonias	
	<i>cagA</i> + n = 130 Colonias (%)	<i>cagA</i> - (N. T.) n = 20 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 24 Colonias (%)	<i>cagA</i> + n = 36 Colonias (%)	<i>cagA</i> - n = 9 Colonias (%)
<i>picB</i> ⁺ / <i>iceA1</i> ⁺	39 (30)	1 (5)	0 (0)	6 (16.7)	0 (0)
<i>picB</i> ⁺ / <i>iceA2</i> ⁺	108 (83.1)	1 (5)	0 (0)	32 (88.9)	0 (0)

Gráfica 12.- Resultados de la presencia de *cagA* y *picB* (*cag* PAI) e *iceA* (alelos) en colonias de *H. pylori* aisladas de niños (GCA) y adultos (GC y UG).



VIII. – 4 RESULTADOS DEL ANALISIS DE ACUERDO A LA ZONA ANATOMICA DEL ESTOMAGO (ANTRO Y CUERPO)

NIÑOS CON GASTRITIS CRÓNICA ACTIVA (GCA) :

De las 114 colonias aisladas de antro:

El 88.6% fue *cag PAI+*, el 6.1% *cag PAI* (No Tipificables) y el 5.3% *cag PAI-*. (Gráfica 13).

El 73.7% fue *iceA1+*, el 43% *iceA2+*, el 86.8% *iceA+* y el 29.8% presentó ambos alelos.

(Gráfica 14)

De las 96 colonias aisladas de cuerpo:

El 94.9% fue *cag PAI+*, el 2.1% *cag PAI* (No Tipificables) y el 3.1% *cag PAI-*. (Gráfica 13).

El 36.4% fue *iceA1+*, el 62.5% *iceA2+*, el 92.7% *iceA+* y el 15.2% presentó ambos alelos.

(Gráfica 14)

ADULTOS CON GASTRITIS CRÓNICA (GC) :

De las 104 colonias aisladas de antro:

El 80.8% fue *cag PAI+*, el 19.2% *cag PAI-*. (Gráfica 15).

El 32.7% fue *iceA1+*, el 88.5% *iceA2+*, el 94.2% *iceA+* y el 26.9% ambos alelos. (Gráfica 16)

De las 65 colonias aisladas de cuerpo:

El 93.8% fue *cag* PAI+ y el 6.1% *cag* PAI-. **(Gráfica 15).**

El 32.3% fue *iceA1*+, el 89.2% *iceA2*+, el 92.3% *iceA*+ y el 29.2% presentó ambos alelos.

(Gráfica 16)

ADULTOS CON ULCERA GÁSTRICA (UG) :

De las 25 colonias aisladas de antro:

El 76% fue *cag* PAI+ y el 24% *cag* PAI-. **(Gráfica 17).**

El 12% fue *iceA1*+, el 100% *iceA2*+, el 100% *iceA*+ y el 12% presentó ambos alelos.

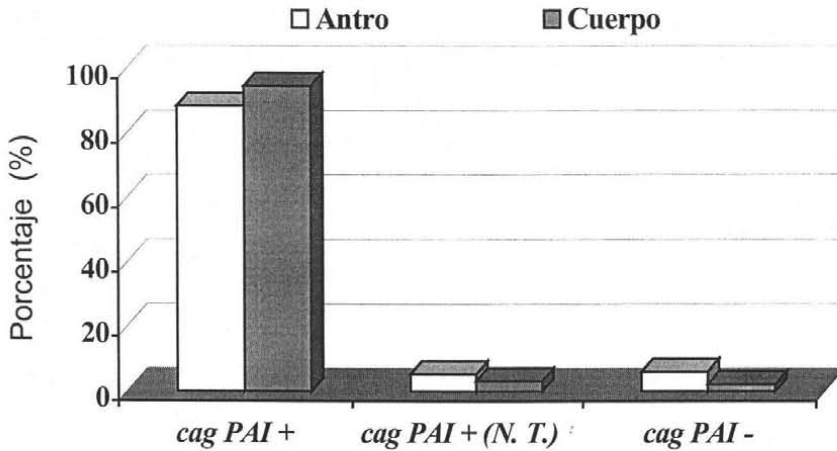
(Gráfica 18)

De las 20 colonias aisladas de cuerpo:

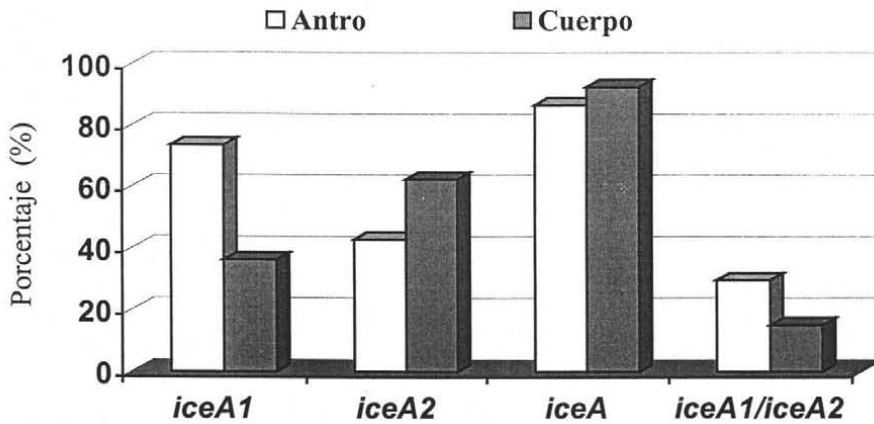
El 85% fue *cag* PAI+ y el 15% *cag* PAI-. **(Gráfica 17).**

El 20% fue *iceA1*+, el 80% *iceA2*+, el 90% *iceA*+ y el 10% presentó ambos alelos. **(Gráfica 18)**

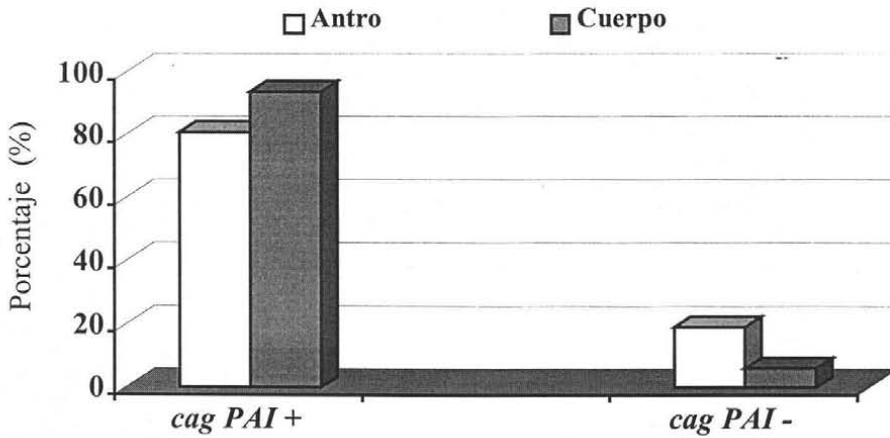
Gráfica 13- Presencia de *cag* PAI en niños con GCA de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



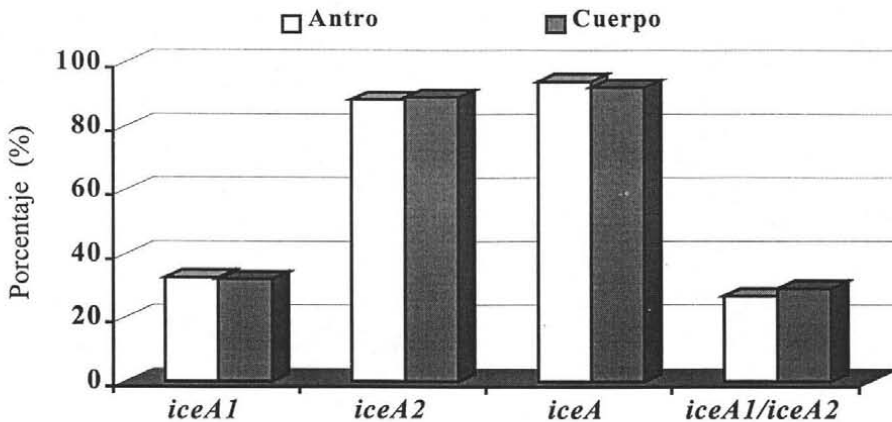
Gráfica 14- Presencia de *iceA* en niños con GCA de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



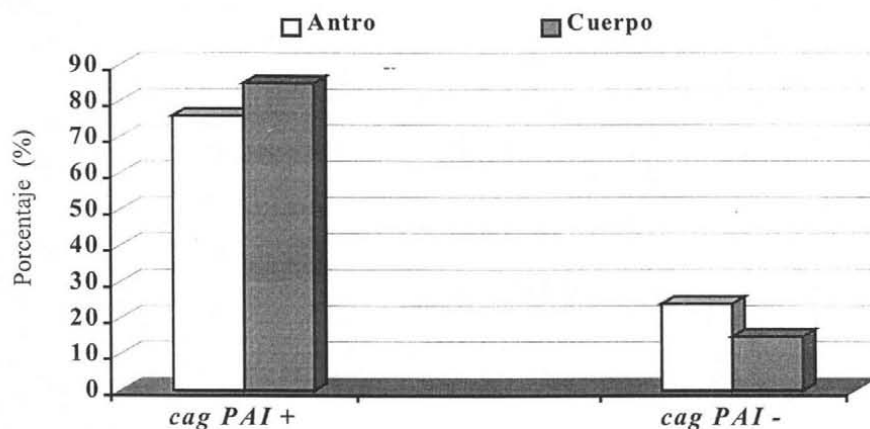
Gráfica 15- Presencia de *cag* PAI en adultos con GC de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



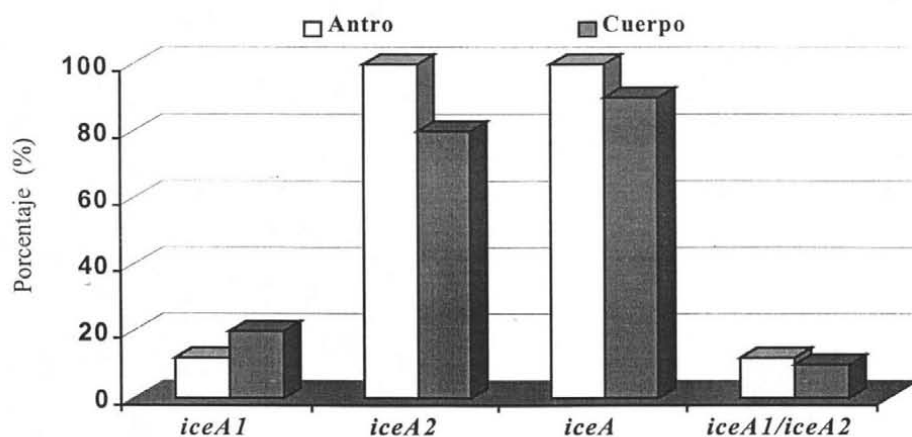
Gráfica 16- Presencia de *iceA* en adultos con GC de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



Gráfica 17- Presencia de *cag* PAI en adultos con UG de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



Gráfica 18- Presencia de *iceA* en adultos con UG de acuerdo a la zona anatómica del estómago.



VIII. – 5 RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO

NIÑOS CON GASTRITIS CRÓNICA ACTIVA (GCA) :

El análisis de correlación entre la presencia de los genes de *cagA* con respecto a *picB* (ambos pertenecientes a *cag* PAI) se realizó mediante la prueba de correlación de Speerman en donde se obtuvo una r^2 del 89%. En cuanto a la presencia de *cagA* con *iceA* el valor de r^2 no fue significativa.

Para evaluar la presencia de los alelos de *iceA* se realizó el análisis estadístico de la Prueba de Xi cuadrada (χ^2), se encontró que existe una diferencia significativa entre la presencia de *iceA1* e *iceA2* ($\chi^2 = 13.7$ y $p = 0.0002$), también se encontró que los niños tienen un riesgo dos veces mayor de colonizarse por cepas *iceA1+* que por cepas *iceA2+* (OR = 2.1) esto fue el resultado de acuerdo a un intervalo de confianza del 95%.

La presencia de *iceA1* fue mayor en antro con una diferencia significativa con respecto a cuerpo ($\chi^2 = 29.4$ y $p = 0.001$), el riesgo de colonizarse con cepas *iceA1+* en antro es de 5 veces mayor que en cuerpo (OR = 4.9) con un intervalo de confianza del 95%.

La presencia de *iceA2* fue mayor en cuerpo con una diferencia significativa con respecto a antro ($\chi^2 = 7.9$ y $p = 0.004$), el riesgo de colonizarse por cepas *iceA2* en cuerpo es de 50% mayor que en antro (OR = 0.5) con un intervalo de confianza del 95%.

ADULTOS CON GASTRITIS CRÓNICA (GC) :

Existe diferencia significativa entre la presencia de *iceA2* e *iceA1* ($\chi^2 = 109.8$ y $p < 0.001$), los adultos tienen un riesgo 15 veces mayor de colonizarse con cepas *iceA2+* que con cepas *iceA1+* (OR = 15.5) con un intervalo de confianza del 95%.

En la presencia de los alelos de *iceA* en antro y cuerpo no hay diferencia significativa ($p = 0.95$), pero si hay diferencia entre *iceA2* e *iceA1* en antro ($\chi^2 = 97.7$ y $p < 0.001$) con un riesgo de colonización de 15 veces (OR = 15.8) con un intervalo de confianza del 95%. La diferencia entre *iceA2* e *iceA1* en cuerpo fue significativa ($\chi^2 = 44.2$ y $p < 0.001$) con un riesgo de colonización de 17 veces (OR = 17.4) con un intervalo de confianza del 95%.

ADULTOS CON ULCERA GÁSTRICA (UG) :

Existe una diferencia significativa entre la presencia de *iceA2* e *iceA1* ($\chi^2 = 48.8$ y $p < 0.001$), con un riesgo de colonización de 47 veces más por cepas *iceA2+* que por cepas *iceA1+* (OR = 47.4) con un intervalo de confianza del 95%. No existe diferencia significativa entre la presencia ambos alelos en antro y cuerpo ($p = 0.95$), pero si existe diferencia entre *iceA2* e *iceA1* en antro ($\chi^2 = 39.3$ y $p < 0.001$) y en cuerpo ($\chi^2 = 14.4$ y $p < 0.001$) con un riesgo de colonización de 16 veces (OR = 17.4) con un intervalo de confianza del 95%.

La correlación entre *cagA* y *picB* fue de una r^2 del 97% y de *cagA* con *iceA* no fue significativa.

IX. DISCUSION

Se determinó la presencia de varios genes (*cagA*, *cagT*, *cag10* y *picB*) pertenecientes a *cag* PAI, además de la presencia de *iceA* los cuales han sido considerados como factores de virulencia muy importantes en *H. pylori*.^{18,1,33}

cagA ha sido considerado como marcador de *cag* PAI, anteriormente se pensaba que todas las cepas *cagA*+ tenían *cag* PAI completa.¹⁰ En Japón se ha observado que el 100% de las cepas con *cag* PAI son *cagA*+, aunque esto no significa que *cag* PAI esta completa, también han encontrado que el 5-10% de los aislados tienen una eliminación parcial de *cag* PAI.³⁴ De los aislados mexicanos, el 91% y 89.2% de las colonias de niños y adultos respectivamente con *cag* PAI son *cagA*+, algo similar se encontró con *picB*.

La presencia de *cagII* de *cag* PAI solo se determinó en las colonias que fueron *cagA*- aunque se incluyeron algunas colonias *cagA*+, *picB*+, *picB*- (58 colonias de niños y 79 de adultos), se encontró que aproximadamente el 50% de las colonias de niños y el 40% de las colonias de adultos fueron *cagT*+ y/o *cag10*+; sin embargo, no se puede asegurar si la ausencia de los genes se debe a una eliminación parcial de *cag* PAI como se ha reportado en otras poblaciones,³⁴ debido a que solo se utilizó un juego de iniciadores para *picB*, *cagT* y *cag10* y dos juegos para *cagA*, en este caso algunas de las colonias que fueron *cagA*- con un juego posteriormente fueron *cagA*+ con el otro juego de iniciadores, esto puede ser causado por la alta variación genética en la región en donde se amplificó *cagA*⁴⁰ por lo tanto, no todos los juegos de iniciadores son capaces de reconocer la secuencia del gen, esto hace suponer que lo mismo puede ocurrir con *picB*, *cagT* y *cag10* en las colonias negativas para ellos.

Posiblemente si se usaran otros iniciadores las muestras pudieran ser amplificadas. No se puede descartar la posibilidad de que una o varias regiones de *cag* PAI se encuentren parcialmente eliminadas, lo cual podría explicar los resultados negativos para los genes. En las colonias *cagA*-/*picB*- podría estar eliminado el extremo inicial de *cagI*; en colonias *cagT*+/*cag10*- la parte final de *cagII*, en colonias *cagT*-/*cag10*+ la región central y en colonias *cagT*-/*cag10*- *cagII* podría estar totalmente ausente. (Figura 8)

Otra posibilidad es que existan pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos (mutaciones puntuales) dentro del gen,⁵⁶ lo cual impide que los iniciadores lo reconozcan y se alinien, por lo tanto no existe amplificación; todo lo anterior se atribuye a la zona con alta variabilidad genética presente en *H. pylori* (3-7%) aunque generalmente las secuencias genómicas de la bacteria son altamente conservadas, incluso se ha demostrado que los genes contenidos en *cag* PAI también son conservados tanto en estructura como en posición.^{14, 47, 1} Es más factible que la ausencia de los genes se deba a eliminaciones parciales de *cag* PAI, pues durante el proceso de inserción pueden ocurrir algunos eventos que impiden que la inserción se lleve a cabo adecuadamente, por lo que este proceso es incompleto, además *cag* PAI pasa por una serie de reajustes genéticos los cuales son diferentes en cada cepa, esto hace que en algunas cepas este presente un gen y en otras no, por lo que se considera que la estructura de *cag* PAI no es idéntica en todas las cepas tipo I, se ha sugerido que la presencia de IS605 puede ser la responsable de las eliminaciones parciales o totales de *cag* PAI en varias cepas de *H. pylori*.¹⁰ Se logró identificar algunas colonias *cagA*- verdaderas, esto significa que no tienen *cag* PAI y por consecuencia tampoco tienen *picB*, *cagT* y *cag10*, por lo tanto estas colonias se clasifican como cepas tipo II. En cepas de pacientes japoneses y coreanos se ha encontrado una baja frecuencia de aislados *cagA*-, la cual se atribuye a la disminución en la capacidad de ciertos

aislados para adquirir *cag* PAI y a algunos factores del huésped que en cierta manera restringen el crecimiento de las cepas *cagA*¹⁴.

También se identificaron pacientes con colonias *cagA*- y *cagA*+, se sugiere que ellos tienen infección mixta, sin embargo, algunos autores mencionan que *cag* PAI puede ser insertada en cepas tipo II después de un proceso de evolución; por lo que las cepas tipo II que inicialmente colonizaban al paciente después se convierten en cepas tipo I, por lo tanto, el paciente está colonizando por la misma cepa pero en diferentes etapas de evolución.¹

En un niño con GCA (13) se encontraron colonias *cagA*+ y *cagA*- (no tipificables), se sugiere que la cepa que coloniza al paciente ha evolucionado, por lo que algunas colonias han adquirido *cag* PAI y el resto no la han adquirido; esta es la razón por la cual no se puede amplificar con los iniciadores de *cag* PAI, seguramente porque el fragmento de DNA insertado no contiene los 4 genes analizados pero posiblemente si tiene otros genes de *cag* PAI.

En la mayoría de los artículos se ha reportado una gran asociación entre la presencia de *cagA* y *picB*, sugiriendo que *cag* PAI está completa.¹⁰ Sin embargo, se encontró que la asociación entre *cagA* y *picB* en niños con GCA y adultos con GC fue del 88-89%, lo que nos hace pensar que dentro del genoma de *H. pylori* y dentro de *cag* PAI si existe una gran variabilidad genética;⁵⁶ por lo tanto, la presencia de *cagA* no necesariamente indica la presencia de *picB* o de alguno de los otros genes de *cag* PAI, esto se debe principalmente a que *cag* PAI puede llegar a sufrir reacomodos genéticos y como consecuencia eliminaciones parciales de ciertas regiones de *cag* PAI lo que significa que algunos genes no están presentes aunque la isla si lo está, otra posibilidad es que se lleven a cabo mutaciones impidiendo el alineamiento de los iniciadores por lo cual no pueden ser amplificados.^{55, 47, 14, 34}

En los adultos con UG la asociación entre estos genes fue del 97%, esto nos indica que en estos pacientes la presencia de *cagA* puede ser un indicativo de que *cag* PAI esta completa. Esto es un punto muy relevante ya que si *cag* PAI esta completa los genes en ella podrían estar funcionalmente activos causando mayor daño al epitelio (cepas más virulentas).

El alelo *iceA1*, ha sido considerado como un marcador muy importante para el desarrollo de úlcera en pacientes adultos infectados con *H. pylori*.^{14, 33, 67} Actualmente no se conoce nada acerca del comportamiento de *iceA* en niños (no existen reportes), por lo que consideramos que este es un estudio con gran relevancia dentro de este campo.

En niños la presencia de *iceA1* e *iceA2*, fue muy similar (69% y 52% respectivamente) La presencia de *iceA1* en niños es muy similar a lo encontrado en pacientes holandeses, japoneses y coreanos con úlcera aunque en niños la presencia de úlcera es muy rara.^{33, 67}

En adultos se encontraron resultados que en primera instancia son totalmente diferentes a lo reportado por algunos autores.^{33, 67} En este caso predominó *iceA2* (89 en GC y 91% en UG). Al parecer los aislados mexicanos con GC se comportan igual a los estadounidenses y colombianos, en donde también predomina *iceA2*.⁶⁷ En algunas colonias se encontró la presencia de ambos alelos, hasta el momento se desconoce cuales son realmente las razones para que se lleve a cabo este fenómeno, pero se sospecha que el paciente esta cursando por una infección crónica en donde la bacteria esta más en contacto con las células de la mucosa gástrica, por lo tanto, *iceA* se activa potencialmente en esta situación y es la causa de la presencia de *iceA1* e *iceA2* al mismo tiempo.⁴⁸ Dentro de este mismo punto se esperaba que el porcentaje de expresión de ambos alelos *iceA* se encontrara en un rango del 10-25% como máximo, de acuerdo a lo reportado.⁶⁷

En niños la presencia de ambos alelos fue del 32%, en adultos con GC 30% y en UG 11%. Algo similar se ha reportado en aislados japoneses y colombianos.⁶⁷ La asociación entre *cagA* e *iceA1* fue mayor (69%) que entre *iceA2* (51%), el comportamiento es similar al de aislados japoneses y holandeses en donde se reporta una mayor asociación entre *cagA* e *iceA1*.^{33,67} En adultos (GC y UG) existe mayor asociación de *cagA* con *iceA2* (91% en ambos) que con *iceA1* (32 y 16% respectivamente), actualmente no se sabe realmente cual es la función que desempeña *iceA2* en la patogenesis de *H. pylori*, pero se puede considerar que la función es similar a la de *iceA1*, aunque de acuerdo a lo reportado se esperaba que la asociación entre *cagA* e *iceA1* predominara en pacientes con UG ya que este es el genotipo más asociado a esta enfermedad.^{48, 33, 67} También se encontraron colonias que a pesar de no tener *cag* PAI si presentan *iceA*, por lo que la presencia o ausencia de *cag* PAI no es un factor predisponente para la presencia de *iceA* ya que son genes independientes que solo se pueden asociar para aumentar la virulencia de las cepas de *H. pylori*.¹⁸

El DAR es el principal síntoma de la infección por *H. pylori* en niños.¹¹ La presencia de *cag* PAI completa es una condición necesaria para el desarrollo de la enfermedad.³⁴

Se encontró que 6/12 niños tienen *cag* PAI completa, 5 *cag* PAI incompleta y 1 en su mayoría colonias sin *cag* PAI. No parece haber relación entre el desarrollo de enfermedad y la presencia de *cag* PAI completa, más bien parece que la GCA en niños se debe a la presencia de *cagA*, se ha demostrado que las cepas *cagA+* en niños se asocian con el desarrollo de gastritis ya que este gen actúa como un marcador de inflamación gástrica en niños.²⁹

Por lo tanto la presencia de *cagA* es la principal causa de gastritis y no la presencia de *cag* PAI completa como algunos autores lo han reportado,³⁴ El 90% de los niños con cepas *cagA+* desarrollaron gastritis severa.²⁹

La presencia de *cag* PAI completa es un factor predisponente para que la bacteria cause daño potencial e inflamación a la mucosa gástrica.¹⁰

En el paciente 3 que al parecer tiene *cag* PAI completa el grado de inflamación es más intenso con respecto a los pacientes que tienen *cag* PAI incompleta (paciente 13), sin embargo, en el paciente 4 que tiene infección mixta el grado de inflamación es muy similar a la del paciente 13, la diferencia es que la GCA es “moderada” esto se atribuye a que las cepas tipo II son menos productores de VacA además de tener poca capacidad de adherirse a receptores de antígenos Le^b, lo que significa que este tipo de cepas son incapaces de expresar todos los factores de virulencia que se han asociado a las cepas tipo I.^{10,41,9} En niños predomina *iceA1*, que es más virulento y se ha asociado a úlcera en adultos.⁴⁸ Se tienen reportes de la presencia de *iceA* en niños. Solo 1 niño presentó un cuadro clínico de metaplasia intestinal (MI) el cual se asocia a la presencia de *cag* PAI completa y a la presencia de *iceA2*; al parecer el genotipo *cagA+iceA2+* esta más asociado a cáncer gástrico en Japón, EE.UU. y Colombia.⁶⁷ El grado de inflamación en el paciente 10 (MI) es menor al de los pacientes 3, 4 y 13; cuando el epitelio se atrofia, *H. pylori* no es capaz de crecer porque su hábitat cambia, por lo tanto, el factor que inicia el proceso de la atrofia es excluido y la respuesta inflamatoria disminuye.

La mayoría de los estudios en donde relacionan la presencia de *cagA* e *iceA* con el desarrollo de un cuadro clínico específico coinciden que el genotipo *cagA+iceA1+* es el más virulento y es el que predomina en cepas aisladas de pacientes con úlcera.³³ El genotipo *cagA+iceA2+* predominó en aislados de adultos mexicanos con GC y en UG predominó el genotipo *cagA+iceA1+iceA2+*, al parecer los aislados mexicanos se comportan de manera semejante a los colombianos.⁶⁷

Las colonias que tienen una eliminación parcial o total de *cag* PAI (cepas tipo II) son de niños con GCA y adultos con GC, el desarrollo de esta enfermedad se atribuye a que al no tener la isla completa, tampoco se tienen todos los genes asociados a virulencia lo cual repercute en la capacidad de virulencia de las colonias.³⁴

Se ha demostrado que *H. pylori* es una bacteria con gran diversidad genética debido a cambios en las secuencias de nucleótidos o a mutaciones puntuales que se desarrollan durante el curso de la infección.^{56,32} De acuerdo a todos estos cambios se ha sugerido que la mayoría de los pacientes están infectados con dos o más cepas diferentes de *H. pylori*.¹⁴

Se consideró que en nuestra población existe infección mixta porque en 6/13 niños con GCA se encontraron de 2 a 6 patrones de genotipificación diferentes, en 11/14 adultos con GC hay de 2 a 5 patrones y en 4 adultos con UG hay 2 a 4 patrones de genotipificación diferentes. Esto nos hace pensar que los niños tienden a colonizarse por más de una cepa de *H. pylori*, ya que el riesgo de adquisición de la infección es mayor durante la infancia, ya que suelen estar más en contacto directo con adultos infectados dentro del ámbito familiar,^{25,65} lo que hace a los niños más susceptibles a adquirir un gran número de cepas. En los adultos la infección mixta se puede deber a la evolución genética de las cepas de *H. pylori* que colonizan al paciente a lo largo del tiempo, esto es porque la bacteria se adapta a las condiciones del estómago, por lo tanto, se llevan a cabo algunos cambios dentro del genoma de la bacteria, causando heterogeneidad en las cepas aunque hallan sido aislados de un mismo paciente.^{4,32}

X. CONCLUSIONES.

- Se logró determinar la presencia de *cagA*, *picB*, *cagT* y *cag10* pertenecientes a *cag* PAI, así como la presencia de *iceA* de *H. pylori* mediante PCR.
- Los genes *cagA* y *picB* están presentes en el 80-90% de las colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos con EAP. *cagT* y *cag10* están presentes únicamente en el 50-60% de las colonias estudiadas de niños y adultos con EAP.
- En niños con GCA predominó el alelo *iceA1* y en adultos con GC y UG el alelo *iceA2*.
- La asociación entre *cagA* - *picB* fue mayor que entre *cagA* - *iceA* en niños y adultos.
- La presencia de *cag* PAI+ es mayor en cuerpo tanto en niños como en adultos (GC y UG).
- En niños la presencia de *iceA1* y ambos alelos es mayor en antro e *iceA2* en cuerpo. En adultos con GC la presencia de *iceA1* e *iceA2* es igual en antro y cuerpo, en UG la presencia de *iceA2* y ambos alelos es mayor en antro e *iceA1* es mayor en cuerpo.

- La presencia de *cagA* no necesariamente indica que *cag* PAI esta completa ya que una fracción de las colonias aisladas de pacientes mexicanos fueron *cag* PAI⁺ pero *cagA*⁻.
- *cagA* no actúa como un buen marcador de la presencia de *cag* PAI completa en niños con GCA y adultos con GC, pero si en adultos con UG.
- En niños con GCA y adultos con UG predominó el genotipo *cagA*⁺/*iceA1*⁺/*iceA2*⁺ y en adultos con GC predominó el genotipo *cagA*⁺/*iceA2*⁺.
- Se debe de utilizar más de un juego de iniciadores para determinar la presencia de *picB*, *cagT* y *cag10* y más de dos juegos de iniciadores para determinar la presencia de *cagA*.

XI. ANEXO

- **MEZCLA DE ANTIBIOTICOS PARA PREPARAR EL AGAR SANGRE DE CARNERO AL 5% CON ANTIBIOTICO:**

Disolver en 10 ml de agua inyectable: 0.1mg de Acido Nalidixico; 0.05mg de Trimetoprim; 0.03mg de Vancomicina y 0.02mg de Anfotericina B. De esta mezcla se adicionan 1.8 ml a 1 litro de agar sangre de carnero al 5%.

- **PRUEBA DE UREASA:**

Preparación del Reactivo de ureasa: Adicionar 100µl de rojo de fenol al 1% a 100 ml de D-PBS, mezclar y disolver 0.06 g de urea y ajustar a pH 6. Almacenar a 4°C.

Prueba de Ureasa: Depositar 1-2 gotas del reactivo para ureasa en pozos de microplacas. Con asa bacteriológica tomar un inóculo de bacterias y mezclarlo con el reactivo de ureasa. Si ocurre un cambio de color de rojo a rosa (reacción positiva). La reacción ocurre en 1-3 minutos.

- **BUFFER DE CORRIMIENTO (LOADING BUFER):**

Para un volumen total de 10 ml, se pesaron 3g de Urea (5M), 0.05g de SDS (0.5%), 0.025g de azul de bromofenol, se adiciono 1 ml de glicerol (10%), 0.2 ml de TAE 50x y 8.8 ml de agua destilada. Se prepararon alícuotas de 1 ml para uso y se almaceno a -20°C.

- **MARCADOR DE 1 Kb (Alícuota de trabajo):**

Se preparo una mezcla de 20µl de marcador comercial de 1Kb, con 20µl de buffer de corrimiento (loading buffer) y 80µl de agua destilada. Se almaceno a -20°C.

• METODO DE FENOL CLOROFORMO:

Centrifugar el paquete celular suspendido en S.S a 10,00rpm/10 min, decantar el sobrenadante, adicionar 800µl de buffer TE, centrifuga a 10,000rpm/10 min, decantar el sobrenadante, adicionar 400µl de buffer TE, homogeneizar perfectamente el paquete celular y adicionar 50µl de lisozima (10mg/ml) e incubar a 37°C/30 min en baño María. Adicionar 50µl de SDS al 10% mezclar e incubar a 37°C/30 min en baño María. Adicionar 5µl de proteinasa K (10mg/ml) mezclar e incubar a 56°C/1 hr en baño María. Adicionar 500µl de fenol equilibrado a pH 8, mezclar por inversión y centrifugar a 10,000rpm/10 min. Transferir la fase acuosa a otro tubo limpio y adicionar 500µl de fenol equilibrado pH 8, mezclar por inversión y centrifugar a 10,000rpm/10 min. Nuevamente se transfiere la fase acuosa y se adiciona un volumen igual de cloroformo se mezcla y se centrifuga nuevamente como en el paso anterior. Adicionar un volumen igual de etanol absoluto y 20µl de acetato de sodio 3M e incubar toda la noche a -20°C. Posteriormente centrifugar a 10,000rpm/20 min decantar el sobrenadante y lavar la pastilla de DNA con 800µl de etanol al 70% después centrifugar a 10,000rpm/10 min decantar todo el etanol y secar el DNA a 37°C. Finalmente se adicionan 200µl de agua inyectable estéril para resuspender el DNA y se incuba a 56°C durante 5-7 min para disolverlo, las muestras se almacenan a -70°C.

• REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es un método ideado por Karry B. Mullis en 1985, en California, E.U. El PCR consiste en la síntesis enzimática in vitro de millones de copias de un segmento específico de DNA.

El término PCR se aplica al proceso bioquímico in vitro mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos, al final las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima produciendo de manera exponencial millones de copias del segmento de DNA específico sometido al proceso.

Para que se lleve a cabo la reacción se necesita :

- **DNA blanco.**- La amplificación se puede realizar con solo una molécula de DNA.
- **Iniciadores o Primers.**- Oligonucleótidos específicos que flanquean al segmento de DNA blanco. Es un componente muy importante que determina la especificidad de la reacción.
- **Mezcla de Desoxinucleótidos (dNTPs).**- Ayuda a la incorporación de oligonucleótidos a las cadenas de DNA complementario.
- **Buffer de PCR con Cloruro de Magnesio.**- Los iones magnesio actúan como una coenzima de la Taq polimerasa y ayuda a la incorporación de los oligonucleotidos.
- **DNA polimerasa.**- Tiene actividad de DNA polimerasa de exonucleasa 3' a 5' (correctora de prueba), y de exonucleasa de 5' a 3'. Amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3,000 pares de bases y tiene una actividad a altas temperaturas.

La reacción se lleva a cabo en tres pasos:

- 1- **DESNATURALIZACIÓN:** (92-98°C / 30-90 seg). Se desnaturalizan las cadenas de DNA blanco.
 - 2- **ALINEAMIENTO:** (50-60°C / 30-60 seg). Se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples de DNA blanco desnaturalizado. Las temperaturas son muy críticas para la especificidad.
 - 3- **EXTENSIÓN:** (70-74°C / 30-90 seg). La DNApol polimeriza los dNTP libres formando nuevas cadenas complementarias
-

Teóricamente el nivel de amplificación del DNA blanco aumenta en forma exponencial con cada ciclo, pero en la práctica la amplificación se detiene gradualmente debido al agotamiento de la actividad enzimática. Los errores más frecuentes son la obtención de poco producto amplificado, productos inespecíficos y la formación de dímeros de oligonucleótidos.⁷ El PCR puede amplificar en pocos minutos el DNA de varias fuentes, proporciona una absoluta especificidad para definir los ácidos nucleicos marcados, es un método muy confiable para identificar especies bacterianas.⁵²

Es una prueba ampliamente descrita para diferentes marcadores genómicos de *H. pylori* por ejemplo para los genes *UreC* que es un gen altamente conservado y específico para *H. pylori* y *16sRNA* ribosomal este es un gen que forma parte de las bases de la clasificación de *H. pylori* como un organismo independiente, ambos genes son específicos para género y especie; también se pueden determinar por PCR otros genes como *cagA* que es un gen muy importante, ya que actúa como un marcador de virulencia muy específico de *H. pylori* y *vacA* que es un gen que está presente en la mayoría de las cepas de *H. pylori* el cual también ha sido considerado como un factor de virulencia muy importante.¹

XII. GLOSARIO

ALELOS: Son dos genes homólogos en un mismo cromosoma que pueden tener expresión igual o diferente.

CARCINÓGENO: Es un agente capaz de causar cáncer.

CITOSINAS: Es un factor producido por células que afectan a otras células, tienen funciones inmunomoduladoras múltiples.

CLONA: Es una célula o molécula que procede de una sola célula o molécula ancestral.

ENDONUCLEASAS: Son enzimas que cortan las cadenas de DNA en un sitio específico.

EPIDEMIOLOGIA: Es una disciplina que tiene que ver con el estudio de enfermedades en poblaciones.

FENOTIPO: Son las características morfológicas y funcionales de un individuo, que son producto de la expresión de los genes que poseen.

GEN: Es un segmento de DNA implicado en la producción de una cadena polipeptídica, es la unidad de la herencia.

GENOTIPO: Es la potencialidad hereditaria de un individuo contraída en el conjunto total de sus genes.

INCIDENCIA: Es la proporción de un grupo que inicialmente esta libre del proceso de interés que se va a estudiar. Es lo que sucede en el curso de un periodo de tiempo y esta relacionado a él.

MUTACIÓN: Es un cambio brusco hereditario en el genotipo.

PATOGENICIDAD: Es la propiedad y los mecanismos de un agente infeccioso para causar enfermedad.

PATÓGENO: Es un microorganismo capaz de causar enfermedad.

PLASMIDO: DNA celular extracromosómico autónomo y autoreplicativo.

PREVALENCIA: Es la proporción de un grupo con una condición clínica en un momento dado del tiempo.

RECOMBINACION: Es el intercambio de material genético.

REPLICACIÓN: Proceso mediante el cual el DNA se duplica para generar 2 nuevas cadenas hijas en donde la información genética es perpetuada.

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV: Es un sistema que lleva a cabo la translocación de proteínas del citoplasma a un compartimiento intracelular de una célula blanco en un solo paso.

TRADUCCIÓN: Es el mecanismo de síntesis de proteínas a partir del mRNA.

TRANSCRIPCIÓN: Es el mecanismo de síntesis de nuevas cadenas de RNA a partir de una cadena de DNA.

TRANSFORMACIÓN: Es la captación directa de DNA del donador por la célula receptora, puede ser natural o forzada.

TRANSLOCACION: Es un tipo de mutación en donde se cambian las posiciones de los genes o de las bases de los genes.

TRANSPOSONES: Son secuencias discretas de DNA, las cuales son móviles dentro del genoma.

VIRULENCIA: Propiedad cuantitativa de un agente para causar enfermedad.

XIII. BIBLIOGRAFIA

- 1- Akopyants S. Natalia, Sandra W. Clifton, et al. "Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*" Mol. Microbiology. 1998; 28 (1): 37-53.
 - 2- Albenque M., Tall F., et al "Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa" Rev. Esp. Enfer. Dig. 1990; 78 (suppl 1): 48 (Abstract).
 - 3- Alcántara Vázquez Avissai, José Chanona Vilchis, et al. "Cáncer gástrico e infección por *Helicobacter pylori*" Revista Médica del Hospital General. 1997; 60 (2): 60-65.
 - 4- Arie van der Ende, Zhi-Jun Pan, et al. "*cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and the Netherlands are distinct" Infection and Immunity. 1998; 66 (5): 1822-1826.
 - 5- Ashorn A., M. Mäki, et al. "*Helicobacter pylori* infection in finnish children and adolescents. A serologic cross-sectional and follow-up study" Scand. Journal of Gastroenterology. 1995; 30: 876-879.
 - 6- Bamford K. B., J. Bickley, et al. "*Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection" Gut. 1993; 34: 1348-1350.
 - 7- Barrera S. Hugo A., Rocío Ortíz López, et al. "Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una nueva época dorada en la Biología Molecular" Ciencia y Desarrollo. 1993. Pp: 50-59.
 - 8- Blaser M. J. "Bacteriology characteristics of *Campylobacter pylori*" Proceeding of the first Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*. Tokyo, Japón. 1988.
 - 9- Blaser M. J. "Origen bacteriano de la úlcera de estómago" Investigación y Ciencia. 1996; 54-59.
-

- 10- Censini Stefano, Christina Lange, et al. “*cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors” Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 14648–14653.
 - 11- Chong K. F., Qinyuan Lou, et al. “*Helicobacter pylori* infection in recurrent abdominal pain in childhood: comparison of diagnostic test and therapy” Pediatrics. 1995; 96 (2): 211-215.
 - 12- Clayton C. L. and H. L. T. Mobley. “Methods in Molecular Medicine. *Helicobacter pylori* Protocols” Editorial: Humana Press Inc. Totowa, N. J. E.U. 1997.
 - 13- Clifton S., B. Roe, “DNA sequence of *cagII*, a new multigene locus implicated in *Helicobacter pylori* virulence” Gut. 1995; 37 (suppl 1): A61 (Abstract).
 - 14- Covacci Antonello, John L. Telford, et al. “*Helicobacter pylori*, virulence, and genetic geography” Science. 1999; 284: 1-6.
 - 15- Crabtree J. E. “Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection” Scand. Journal Gastroenterology. 1996; 31 (suppl 215): 3-10.
 - 16- Dixon Michael F. “Classification and grading of gastritis. The update Sydney System” The American Journal of Surgical Pathology. 1996; 20 (10): 1161-1181.
 - 17- Drumm Brendan, Guillermo I. P.-P., Martin J. B., et al. “Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection” The New England J. of Medicine. 1990; 322 (6): 359–363.
 - 18- Dunn Bruce E., Hartley Cohen, et al. “*Helicobacter pylori*” Clinical Microbiology Reviews. 1997; 10 (4): 720–741.
 - 19- Ferguson Donald A., Chuanfu Li, et al. “Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva” Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31 (10): 2802–2804.
-

- 20- Figura Natale. “*Helicobacter pylori* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection” *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10 (suppl 1): 79-96.
- 21- Fox J. G. “Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*” *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9 (suppl 2):93-103.
- 22- González Saldaña Napoleón “*Infectología Clínica Pediátrica*” Sexta edición. Editorial: Trillas. México, D.F. 1997. P.p 569-572
- 23- Gooding C. S., Armstrong J. A., et al. “Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* a *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* com. nov. respectively” *Int. Journal Sist. Bacteriology.* 1989; 39: 397-405.
- 24- Graham D., Malary H., et al. “*Helicobacter pylori* infection clusters in families” *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 1990; 78 (suppl 1): 26.
- 25- Graham S. K., Graham Y. D. “Contemporary Diagnosis and Management of *H. pylori*-Associated Gastrointestinal Diseases” 1ª edición. Editorial: Handbooks in Health Care Co. Newtown, Pennsylvania, USA. 1998.
- 26- Graham S. K., Graham Y. D. “Therapy” en *Contemporary Diagnosis and Management of H. pylori*-Associated Gastrointestinal Diseases. Graham S. K., Graham Y. D. 1ª edición. Editorial: Handbooks in Health Care Co. Newtown, Pennsylvania, USA. 1998; Pp: 87–119.
- 27- Hammar Marten, Tadeusk Tyszkiewicz, et al. “Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction” *Journal of Clinical Microbiology.* 1992; 30 (1): 54-58.
- 28- Haruhiko Yoshida, et al. “Use of gastric juice-based PCR assays to detect *Helicobacter pylori* infection in culture-negative patients” *The J. of Infectious Diseases.* 1998; 81: 527-535.
-

- 29- Husson Marie-Odile, Frederic Gottrand, et al. "Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children" *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33 (12): 3300-3303.
- 30- Kelly S. M., Maxton C. L. Pitcher, et al. "Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom" *Gastroenterology*. 1994; 107: 1671-1674.
- 31- Krajden S., Fuksa M., et al. "Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *Campylobacter pylori*" *J. Clin. Microbiology*. 1989; 27: 1397-1398.
- 32- Kuipers Ernst J., Dawn A. Israel, et al. "Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observer in paired isolates obtained years apart from the same host" *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181: 273-282.
- 33- Lee-Jan Van Doorn, Céu Figueiredo, et al. "Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*" *Gastroenterology*. 1998; 115: 58-66.
- 34- Maeda S., H. Yoshida, et al. "Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates" *Gut*. 1999; 44: 336-350.
- 35- Makristathis Athanasios, Eva Pasching, et al. "Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and Antigen Enzyme Immunoassay" *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36 (9): 2772-2774.
- 36- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. "Molecular cloning: A laboratory manual" Segunda edición. Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, N. Y. 1989.
- 37- Mapstone N.P., D. A. F. Lynch, et al. "PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients" *The Lancet*. 1993; 341: 447.
-

-
- 38- Meccas Joan, Evelyn J. Strauss. "Molecular mechanisms of bacterial virulence: Type III secretion and pathogenicity islands" *Emerging Infectious Diseases*. 1996; 2(4): 271-288.
- 39- Mégraud F. "Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route" *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9 (suppl 2): 85-91.
- 40- Miehlik Stephan, Kirsten Kibler, et al. "Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States" *The American Journal of Gastroenterology*. 1996; 91 (7): 1322-1325.
- 41- Moran A. P. "Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*" *Scand. Journal Gastroenterology*. 1996; 31 (suppl 215): 22-31.
- 42- Muñoz Andrea. "La úlcera péptica ¿Estrés o infección?" *Gastroenterología*. 1995; No. 32: 6-13.
- 43- Namavar F., Roosendaal R., et al. "Detection of *Helicobacter pylori* in stomach, faeces and oral cavity of dyspeptic patients" *Am. J. Gastroenterology*. 1994; 89: 1310 (Abstract).
- 44- Narikawa Shinichi, Shinichi Kawai, et al. "Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*" *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1997; 4 (3): 285-290.
- 45- Neale K. R., Logan R. P. H. "The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection in children" *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9 (suppl 2): 77-84.
- 46- Nguyen Anne-Marie H., Lars Engstrand, et al. "Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction" *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31 (4): 783-787.
-

- 47- Pajares García J. M., Correa P., "Infección por *Helicobacter pylori* en las lesiones gastroduodenales" Editorial: Prous Science, S.A. Barcelona, España. 1998.
- 48- Peek Richard M. "Expression of an ulcer-associated *Helicobacter pylori* gene, *iceA* is induced by contact with gastric epithelial cells and is associated with enhanced mucosal IL-8" Correspondencia personal. University Vanderbilt. Nashville, Tennessee. USA.
- 49- Queiroz Dulciene M. M., Gifone A. Rocha, et al. "*Helicobacter pylori*." Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1995; 15 (6): 424-429.
- 50- Shalamat M., Mai U., et al. "Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water" Epidemiology Infect. 1993; 111: 483-490.
- 51- Sharma Smita A., Murali K. R. Tummuru, et al. "Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro" Infection and Immunity. 1995; 63 (5): 1681-1687.
- 52- Sheng-Ang Ho, Jane A. Hoyle, et al. "Direct polymerase chain reaction test for detection of *H. pylori* in humans and animals" J. of Clin. Microb. 29 (11): 2543-2549.
- 53- Shude D. L., Dangeruta K., et al. "Multiple genes in the left of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are requires for Tyrosine Kinase-Dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells" Inf. and Imm. 1999; 67 (8): 3893-3899.
- 54- Talley N.J., Noack K.B. "The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori*: asymptomatic infection and clinical states associated with infection in adults" En *Helicobacter pylori* biology and clinical practice. Goodwin C.S.; Worsley B.W. editores. CRC Press. London - Tokyo. 1993: 63-83.
-

-
- 55- Taylor Diane E. "Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*" Annu. Rev. Microbiology. 1992; 46: 35-64.
- 56- Taylor Diane E., Michelle Eaton, et al. "Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level" Journal of Bacteriology. 1992; 174 (21): 6800-6806.
- 57- Thomas J.E., Gibson G. R., et al. "Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces" The Lancet. 1992; 340: 1194-1195.
- 58- Tomb Jean-F., Owen White, et al. "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*" Nature. 1997; 388: 539-547.
- 59- Torres Javier, Yelda L-H, et al. "A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México" The J. of Infec. Diseases. 1998; 178: 1089-1094.
- 60- Tummuru Murali K R., Cover Timothy L, et al. "Cloning and expression of a High-Molecular-Mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence on linkage to cytotoxin production" Infection and Immunity. 1993; 61 (5): 1799-1809.
- 61- Tummuru Murali K. R., Smita A. Sharma, "*Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells" Molecular Microbiology. 1995; 18 (5): 867-876.
- 62- Vaira Dino, Peter Malfertheiner, et al "Diagnosis of *Helicobacter pylori* with a new non-invasive antigen-based assay" Lancet. 1999; 354: 30-33.
- 63- Vasile Soltesz, Barbro Z., et al "Optimal Survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions" Journal of Clinical Microbiology. 1992; 30 (6): 1453-1456.
-

- 64- Veldhuyzen Van Zanten S.J.O. "Do socio-economic status, marital status and occupation influence the prevalence of *Helicobacter pylori* infection?" *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9 (suppl 2): 41-44.
- 65- Vincenzo Rutigliano, Enzo Ierardi, et al. "*Helicobacter pylori* and nonulcer dyspepsia in childhood: clinical pattern, diagnostic techniques, and bacterial strains" *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 1999; 28: 296-300.
- 66- Warren Robin J., Marshall Barry. "Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis" *The Lancet.* 1983; 4:1273-1275.
- 67- Yamaoka Yoshio, Tadashi Kodama, Oscar Gutierrez, et al. "Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: Studies in four different countries" *Journal of Clinical Microbiology.* 1999; 37 (7): 2274-2279.