



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

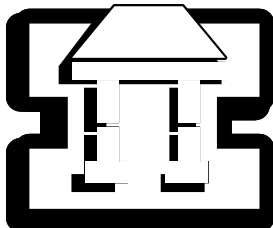
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori* MEDIANTE PCR EN
LA SALIVA DE PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ALCÁNTARA CARMONA MAYRA LORENA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. ERIC MONROY PÉREZ

PROYECTO FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL
PERSONAL ACADÉMICO (PROYECTO PAPIME PE200705)



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 2007



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.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por haberme permitido cumplir una de mis metas a lado de las personas que amo.

Gracias a la UNAM, por darme la oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios.

Gracias a mi asesor M. en C. Eric Monroy Pérez, por su gran apoyo y asesoramiento en todo momento en la elaboración de esta tesis.

A la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, por su paciencia, atención y compartir sus conocimientos en el laboratorio de Análisis Clínicos.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por su apoyo para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Diego J. Arenas Aranda por su apoyo y participación en esta tesis.

A la Bióloga Susana E. Gonzáles Almazán, por su enseñanza y apoyo brindado en el laboratorio de Análisis Clínicos.

Al M. en C. Octavio Patricio García González, por su apoyo y participación en la elaboración de la presente tesis.

A Ime y Paty, por su apoyo, paciencia y enseñanza ofrecida durante mi estancia en el Laboratorio.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio Betsa, Paloma, Keren, Rita y Zule.

Al Doctor Ricardo Mejía Zepeda, por sus palabras y apoyo y sobre todo por darme la oportunidad de trabajar con él.

A todos los profesores que me impartieron clase durante la carrera, a quienes les debo lo que ahora soy.

DEDICATORIAS

A mi mamá, Don, Eduardo, Cesar y Gaby quienes por su apoyo y cariño logré cumplir una de mis metas, gracias por creer en mi y ser mi familia.

A los nuevos integrantes de la familia: Fernando, Leo, Israel, Claudia y Gaby, quienes también forman parte de éste logro.

A mi abue Lucy por su cariño y amor, mi abue Juanita, tíos, tías, primos y primas, por estar a mi lado y por los momentos y alegrías compartidas, gracias.

A mis amigos: Mina, Shaaron, La Dra. Marthita, Beto, Luis Arturo, Eder, Narda, Carlos Garmona, mi maestra Nery, Oswaldo, Virip, Gigio, Darío, Lety, Vicky, Hugo, Rafa, Lupita, Tanya, Cacho, Alma, Erika, Arjona, la Trompuda, Manu, Sony, Karla, Alejandra, Gil, Carlos, Bety... y por supuesto a todo el resto de la plus 29, a Silver, Lety y Álvaro de la U de B, a mis amigos en Iztacala: la flaka, Paco, Pilar, David, Rosibel, Rocío, Ismael, Estela, Gaby y a todos los que influyeron en algún momento de mi vida..., en especial a la memoria de Jaime F. Luna R.

A todos y cada uno de ustedes muchas gracias, por haber sido parte de mis alegrías, por haber creído en mí cuando más lo necesité, por darme su mano, y sobre todo por brindarme su tiempo y tenerme mucha paciencia.

Gracias, Mayra Lorena

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| Descubrimiento y Descripción de Helicobacter pylori | 1 |
| Epidemiología | 1 |
| Transmisión | 2 |
| Morfología del estómago | 3 |
| Patología del estómago | 4 |
| Patogénesis y factores de virulencia. | 4 |
| Asociación entre la infección de H. pylori y enfermedades gástricas; Error! Marcador no definido. | |
| Pruebas de diagnóstico | 9 |
| Tratamiento | 11 |
| | |
| ANTECEDENTES | 13 |
| | |
| OBJETIVO GENERAL | 15 |
| | |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 15 |
| METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO | 16 |
| Selección de los pacientes y toma de los productos. | 16 |
| Extracción de DNA de H. pylori para PCR. | 17 |
| Detección de IgG contra Helicobacter pylori. | 17 |
| Detección de H. pylori por PCR anidado. | 17 |
| Detección de los genes de virulencia vacA y cagA de H. pylori por PCR multiplex | 19 |
| Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa. | 20 |
| Análisis de los datos. | 20 |
| | |
| RESULTADOS | 21 |
| Pacientes estudiados | 21 |
| Detección de IgG contra H. pylori en los adultos con gastritis y en el grupo control | 23 |
| Detección de H. pylori por PCR anidado en las muestras de saliva de los pacientes. | 23 |
| Amplificación por PCR multiplex de los alelos de vacA y del gen cagA de H. pylori en las muestras de saliva de adultos. | 26 |
| Relación de los niveles séricos de IgG con los genotipos detectados en las muestras de saliva de los pacientes adultos. | 28 |
| | |
| DISCUSIÓN | 30 |
| Seroprevalencia de H. pylori en los pacientes estudiados | 30 |
| Detección de H. pylori por PCR anidado en la saliva de los pacientes adultos seropositivos. | 32 |
| | |
| REFERENCIAS | 36 |

RESUMEN

En este estudio, y por el uso de un método de PCR anidado y de PCR multiplex, nosotros estimamos la prevalencia de *Helicobacter pylori* y de las variantes alélicas de *vacA* y del gene *cagA* en la saliva de adultos Mexicanos (17-30 años) con gastritis (n = 102). Los Niveles séricos de IgG contra *H. pylori* en el grupo de adultos y en el grupo control (n = 20) se midieron por el método inmunoenzimático de ImmunoCombII. El 74% (n = 76) de los pacientes adultos con gastritis presentó anticuerpos contra *H. pylori*, dentro de los cuales la prevalencia de *H. pylori* en la saliva fue del 78% (n = 60). La prevalencia de los genotipos de *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en la saliva de los adultos fue del 45% (n = 27); 10% para *vacA* m2 (n = 6), 8.3% para *vacA* s1 (n = 5) y 6.6% para *vacA* s2/*cagA*, *vacA* s2 y *vacA* m1 (en cada caso, n = 4). Los resultados obtenidos mostraron que la cavidad oral podría ser reservorio de *H. pylori* y un importante mecanismo de transmisión de individuo-individuo. Por otro lado los genotipos *vacA* m2 y *vacA* s1 predominaron en la saliva de los pacientes adultos.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, anticuerpos, genotipos.

INTRODUCCIÓN

Descubrimiento y Descripción de *Helicobacter pylori*

La asociación entre las espiroquetas y úlceras pépticas en el humano fue reportada por Doengues en 1939 [1]. Sin embargo, desde el descubrimiento de Marshall y Warren (1983) de la presencia constante de una bacteria espirilada, denominada inicialmente *Campylobacter pyloridis*, en la mucosa gástrica de las úlceras gástricas y duodenales, los conceptos etiológicos de la enfermedad sufrieron una verdadera revolución [2]. Las diferencias genéticas entre este nuevo organismo y las especies que pertenecen al género *Campylobacter* llevaron a la propuesta del género *Helicobacter* y el organismo fue conocido como *Helicobacter pylori* [1]. Actualmente el género *Helicobacter* alberga más de 15 especies, la mayoría aisladas a partir de mucosa gástrica de diferentes mamíferos [3]. *H. pylori* es una bacteria Gramnegativa, microaerofílica, flagelada, espirilada, que se encuentra en la mucosa gástrica y las criptas gástricas del estómago humano [4].

Epidemiología

H. pylori se considera el patógeno responsable de la gastritis, úlceras pépticas y como un factor de riesgo de cáncer gástrico [4]. La infección por *H. pylori* es una de las más comunes en el humano; a pesar de numerosos estudios, la hipótesis de que la flora oral pueda conservar permanentemente a *H. pylori* aún es controversial [5]. Esta

bacteria, es considerada como agente causal de la inmensa mayoría de las úlceras por hechos tan relevantes como la asociación constante de la infección con la enfermedad ulcerosa, de forma que en la úlcera duodenal el antro gástrico está infectado en el 90 a 95% de los casos y en la úlcera gástrica del 60 al 80%. Estas cifras superan las tasas de infección en la población general de los países desarrollados [2]. En naciones desarrolladas existe una “disminución de la frecuencia” de la infección por *H. pylori*, y es probable que también disminuya la incidencia de la enfermedad vinculada [6].

Se calcula que la mitad de la población del planeta está infectada. La infección se adquiere muy a menudo durante los primeros meses de vida y comienzo de la niñez [7], y ello ha originado el llamado “fenómeno de cohorte” [6].

Transmisión

El organismo es transmitido de persona a persona, la transmisión de *H. pylori* usualmente puede ser por ingestión y se ha reportado una asociación entre el predominio de la infección y la fuente de donde se bebe el agua; sin embargo se cree que las rutas fecal-oral y oral-oral son medios comunes de transmisión de *H. pylori* [1].

Oro-oral. La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de *Helicobacter* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva; también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva [3]. Diversos estudios han sugerido que

la placa dental en la cavidad oral, puede actuar como una reserva extragástrica para *H. pylori* [8].

Oro-gástrica. Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Tal posibilidad llevaría también a relacionarle con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños ya que estos vomitan más frecuentemente que adultos, además de que se llevan objetos a la boca.

Feco-oral. Esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda un cierto paralelismo con las tasa de enfermedades diarreicas en esos mismos países [3].

Morfología del estómago

El estómago es un saco hueco y elástico con forma de J, siendo la parte más ancha del tubo digestivo. Su superficie externa es lisa, mientras que la interna presenta numerosos pliegues que favorecen la mezcla de los alimentos con los jugos digestivos. En este lugar las sustancias alimenticias, permanecen almacenadas durante algún tiempo antes de pasar al intestino en un estado de digestión avanzado. Las enzimas que se encuentran en el jugo gástrico son la pepsina que en presencia de ácido fragmentan las proteínas en peptonas, la renina que coagula la leche y la lipasa que rompe las grasas en ácidos grasos y glicerol. Un tercer tipo de células producen

mucosidades, para proteger al estómago de sus propias secreciones. Cuando un trastorno psicosomático o patológico impide las secreciones adecuada de mucosidad, la mucosa gástrica se erosiona y se forma una úlcera [9].

Patología del estómago

La patología digestiva asociada a *Helicobacter pylori* es la gastritis crónica, úlcera péptica y linfomas. La gastritis crónica es una inflamación del revestimiento del estómago que se presenta gradualmente y que persiste durante un tiempo prolongado. La úlcera péptica es una pérdida de sustancia en la mucosa de las regiones del tracto digestivo expuestas a la acción del ácido clorhídrico y la pepsina, que se extiende hasta la submucosa o muscularis mucosa. El linfoma del Tejido Linfoide asociado a las Mucosas se encuentra englobado dentro de los linfomas de células B extranodal y encuadrado dentro de los linfomas de la zona marginal, siendo posible el compromiso de los nodos linfáticos y de otros órganos durante su evolución [10].

Patogénesis y factores de virulencia

Con los avances de técnicas bioquímicas, ha surgido nueva información sobre patogenia y factores de virulencia de *H. pylori*, indicando que la infección por *H. pylori* requiere de complejas interacciones tanto de la bacteria como del huésped [11]. La búsqueda de los factores causantes de ulceración se han intensificado en los

últimos años, señalándose entre ellos a la ureasa bacteriana, adhesinas, hemaglutininas y la producción de una toxina vacuolizante [3].

La colonización por *H. pylori*, origina liberación de interleucina-8 y otros mediadores de inflamación por parte del epitelio estomacal. Lo cual, junto con al respuesta inmunitaria local, culmina en la producción de una cascada de citocinas que a su vez afecta otras células y otras funciones. Es posible que factores propios del huésped, como tabaquismo y mecanismos genéticos; factores propios de *H. pylori* como los productos genéticos *cag-A* y otros más; y factores ambientales como exposición a antioxidantes, cloruro de sodio y nitratos en la dieta, contribuyan a la transformación de *H. pylori* en un patógeno que causa enfermedad clínicamente manifiesta [6]. Actualmente es conocido que la infección por *H. pylori* origina alteraciones en los diversos mecanismos que regulan la secreción de ácido y pepsina [2].

Ureasa. El jugo gástrico normal posee un $\text{pH} < 4$, el cual le confiere un carácter bactericida y por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, implica la capacidad de sobrevivir en este ambiente ácido. La adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa. La ureasa mediante una variedad de mecanismos es responsable parcialmente del reclutamiento inicial de monocitos y neutrófilos, de una mayor activación y estimulación del sistema inmune, así como de la producción de una lesión inflamatoria local asociada con la licuefacción del moco gástrico, lo cual indirectamente expone la mucosa a la acción del pH ácido del

estómago. La ureasa representa alrededor de un 5 % del total de proteínas celulares de *H. pylori*, se localiza en el citosol de la bacteria y en su superficie, posee un peso molecular de 600 kDa [3].

Factor de adherencia. Los procesos de adhesión de *H. pylori*, pueden estimular la formación y desarrollo (atacando y destruyendo) de lesiones gástricas [12]. La adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular. Estas lesiones se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión. En lesiones duodenales, la colonización inicial se realiza en focos de metaplasma gástrica y nunca en epitelio intestinal, lo cual denota un alto grado de adaptación al nicho gástrico. La adhesión a la mucosa gástrica hace que la toxina se libere justo en el epitelio blanco. Los múltiples flagelos y la morfología espiral de *H. pylori* enfatizan la importancia del movimiento dirigido, el cual está determinado por la detección de quimiotaxinas específicas del hospedero [3].

Hemaglutininas. *H. pylori* es capaz de aglutinar eritrocitos debido a su interacción con glucosaminas de grupos sanguíneos, algunos de los cuales también se expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica una función adherente. La distribución de determinantes en grupos sanguíneos, abre la posibilidad de que la baja afinidad de unión a antígenos de grupos sanguíneos, con la mucosa gástrica sea un factor importante en la distribución topográfica de la colonización de la mucosa [3].

Papel de *vac-A* y *cag-A*. Dentro de las moléculas que son activamente circulantes transportadas para los tejidos, de las más importantes es la toxina vacuolizante (*vac-A*), la cual es la mayor toxina secretada por *H. pylori*. La citotoxina activa es asociada epidemiológicamente con daños en tejidos y úlceras pépticas [12]. Esta toxina induce la formación de vacuolas en las células afectadas. La búsqueda de una respuesta para la incongruencia entre la citotoxicidad y la presencia del gen *vac-A*, llevó el hallazgo del gen *cag-A*, cuya presencia se relaciona con la expresión del gen *vac-A* y por lo tanto con la toxigenicidad. Esta presente solo en cepas aisladas de pacientes sintomáticos. En países desarrollados el 60% de las cepas son *cag-A*; pero en los países en vías de desarrollo la proporción de *cag-A* es mayor. Las cepas al ser más virulentas están asociadas con ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y recientemente se ha demostrado que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces la inducida por cepas *cag-A*. La identificación de estos genes permite hallar las cepas con mayor virulencia y por tanto asociadas con cuadros clínicos más severos [3].

Asociación entre la infección de *H. pylori* y enfermedades gástricas

La presencia de *H. pylori* es asociada siempre con la gastritis crónica activa [4]; afecta difusamente al antro y, en algunos casos, a todo el estómago. Las propiedades biológicas del género *Helicobacter*, especialmente su capacidad de producir ureasa, le permiten adaptarse al ambiente ácido del estómago en el que ninguna otra especie logra

permanecer. De ésta forma induce inflamación sin invasión ya que se implanta en la capa de moco y allí persiste durante toda la vida sin causar síntomas en la mayoría de los casos. La identificación histológica y topográfica correcta de los tipos de gastritis crónica y su clasificación se basa en la toma de biopsias múltiples mediante visión endoscópica [2].

Gastritis. La lesión de la gastritis por *H. pylori* consiste básicamente en destrucción del epitelio columnar y la presencia de una franja de infiltrado de células que afecta la mucosa más profunda, se acompaña de nódulos y linfoides [2].

Desarrollo de cáncer gástrico y *H. pylori*. El cáncer gástrico ocupa el segundo lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial y desafortunadamente en países en vías de desarrollo el diagnóstico de se realiza en estadios avanzados, lo que se asocia con una alta tasa de mortalidad [3].

Enfermedad de úlcera péptica. Una úlcera es una pérdida de sustancia en cualquier de las superficies del cuerpo humano. Se hace referencia a úlcera péptica cuando esa pérdida de sustancia ocurre en aquellas partes del tracto digestivo expuestas a la acción del ácido y de la pepsina secretados por el estómago. *H. pylori* se encuentra asociada a la mayoría de las úlceras, en el caso de la úlcera duodenal se asocia con una gastritis difusa astral no atrófica causada por *H. pylori*. En la úlcera gástrica se observa en la mayoría de los casos una

asociación con gastritis multifocal de carácter atrófico que afecta el antro y cuerpo relacionada también con la infección por *H. pylori* [6].

Pruebas de diagnóstico

Las pruebas que permiten el diagnóstico pueden dividirse en dos grupos: los métodos no invasivos (o no endoscópicos) y métodos invasivos (o endoscópicos).

Métodos no invasivos. No requieren biopsias, incluyen la prueba de detección de urea marcada con C^{13} o C^{14} en el aire espirado (prueba de aliento) y las pruebas serológicas (cuantitativas y cualitativas) [13]. Sin embargo recientemente se ha diseñado una prueba para la detección de antígenos de *Helicobacter* en heces del paciente, cuya correlación es excelente con respecto al hallazgo de la bacteria en la biopsia. Los métodos serológicos permiten la evolución del nivel de anticuerpos en sangre total, en saliva y en orina.

La detección de carbono marcado con un isótopo, se basa en suministrar al paciente una dosis de urea marcada con un isótopo, C^{13} o C^{14} , si el paciente está infectado la bacteria hidroliza la urea en el estómago liberando CO_2 con el isótopo que es detectado en el aliento del paciente [3].

Métodos invasivos. Requieren el análisis de biopsias gástricas, ya sea para la búsqueda microscópica de la bacteria ya fuese en cortes histológicos o en improntas de estas [3], la prueba de la ureasa,

la coloración con Gram, el cultivo y estudio de las biopsias, son incluidos en estos métodos [13].

Histología. La evaluación histológica ha sido tradicionalmente el método de diagnóstico mejor o estándar, para la infección de *H. pylori*. La desventaja de ésta técnica es la necesidad de realizar una endoscopia para obtener tejido de la mucosa gástrica [11]. Es una prueba que tiene la ventaja de informar sobre los cambios en la mucosa. Su sensibilidad es alta, pero su especificidad es algo baja (70%), probablemente debido a la distribución irregular de *H. pylori* [13].

Detección microscópica de la bacteria. La forma curvada característica de *Helicobacter* hace que su observación en un frotis pueda utilizarse como diagnóstico presuntivo. Esta observación puede realizarse en improntas de la biopsia o en cortes histológicos, en ambos casos con tinciones como Gram, hematoxilina-eosina, etc. [3].

Respiración urea. Muestras obtenidas por endoscopia son puestas en un medio que contiene urea, si la ureasa está presente la urea podría romper el dióxido de carbono en amonio, resultando un incremento en el pH de el medio y subsecuentemente cambiando el color, en el determinado indicador. Esta prueba ha dado resultados no confiables [11].

Pruebas serológicas. El fundamento de las pruebas serológicas está dado por la respuesta inmune, tanto local como sistemática que produce la infección por *H. pylori*, fundamentalmente de anticuerpos

IgG e IgA. Los anticuerpos IgG constituyen la respuesta inmune humoral frente a la infección a nivel sistemático, mientras que las inmunoglobulinas de la clase IgA constituyen los anticuerpos en la respuesta a nivel local [13].

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, es altamente sensitiva y específica [14]. Los métodos de PCR han permitido la identificación del genoma de la bacteria en saliva, placa dental y heces, aparte de los tejidos gástricos, por lo que estas pruebas bien podrían considerarse tanto métodos diagnósticos no invasivos o invasivos, según la muestra empleada [3].

Tratamiento

La determinación de un tratamiento óptimo para la infección de *H. pylori* es difícil, porque el organismo vive en un medio ambiente no muy accesible para muchos medicamentos [11]. Si bien se han aceptado ampliamente los regímenes antimicrobianos como tratamiento de *H. pylori* y como métodos normativos, se han hecho investigaciones importantes en la creación de una vacuna terapéutica que evite la infección inicial y también cure a sujetos contagiados de la infección por *H. pylori* [6]. Debido a que también la cavidad oral es un lugar en el que se conserva *H. pylori*, es necesario erradicar la bacteria para prevenir la transmisión o recolonización en los órganos gástricos [4].

Desde que *H. pylori* es considerada como un patógeno responsable de gastritis y otras enfermedades relacionadas, han sido innumerables las investigaciones realizadas acerca de ésta bacteria. Dentro de estas investigaciones, la detección de *H. pylori* en saliva de pacientes con gastritis crónica, ha demostrado tener una mayor eficacia utilizando el método de PCR. Por lo anterior, el propósito de éste trabajo es la detección de *H. pylori* en saliva de pacientes con gastritis crónica mediante PCR.

ANTECEDENTES

-Leen-Jan van Doorn. En el 2001 realizó un estudio en el que detectó los genes de virulencia *cag-A*, *vac-A*, *ice-A*, *bab-A* y *oip-A* de *H. pylori* [15].

-Liviú A. y Col. en el 2003, detectaron los genes de virulencia *vac-A* y *cag-A* de *Helicobacter pylori* por PCR, en 47 niños de entre 1 y 5 años [16]

-Makoto Umeda, *et al*, en el 2003, realizaron un estudio de la Prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral de 57 pacientes con periodontitis utilizando PCR [4].

-Q. Song, *et al*, en el 2000 elaboraron un estudio de las características y modelo de distribución de *H. pylori* en placa dental y saliva de 42 pacientes, detectándolo por medio de PCR anidado [5].

-S Kignel, F *et al*, en el 2005, realizaron un estudio acerca de la Prevalencia de *H. Pylori* en placa dental y saliva de 49 pacientes con síntomas dispépticos [1].

-Santanu Chattopadhyay, *et al*, en el 2004, detectaron *cag-A* y *vac-A* de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias de 90 pacientes por PCR Múltiplex [17].

-Shahjahan Kabir, en el 2004 elaboró un estudio en el que detectó *H. pylori* en heces y saliva por medio de PCR [14].

-Smith S I, *et al*, en el 2004, realizaron la comparación de tres métodos de PCR para detectar *H. pylori*, así como la detección *cag-A* y *vac-A* en muestras de biopsias gástricas [18].

OBJETIVO GENERAL

- Estimar la prevalencia de *Helicobacter pylori* en un grupo de individuos de la FES Iztacala que padecen gastritis crónica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* en los pacientes con gastritis crónica.
- Identificar *H. pylori* en muestras de saliva de pacientes seropositivos mediante PCR anidado.
- Detectar las variantes alélicas del gen *vacA* y el gen *cagA* de *H. pylori* en la saliva de los pacientes por medio de PCR múltiplex.
- Incorporar a las pruebas de diagnóstico clínico, que ofrece el Laboratorio de la CUSI a la población abierta, la detección de los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* y la identificación de la bacteria mediante PCR.

METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

Selección de los pacientes y toma de los productos.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron, en la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 102 pacientes con gastritis crónica y un grupo control de 20 pacientes asintomáticos. Los pacientes incluidos en este trabajo manifestaron nunca haber sido sometidos a estudios endoscópicos y/o de toma de biopsias, y no haber recibido tratamiento con antibióticos o algún medicamento que nos pudiera interferir con los métodos de detección de *H. pylori*, en un tiempo mínimo de 3 meses. Para la obtención del suero a cada paciente en estado de ayuno se le extrajo una muestra de sangre de 3 ml por el método de punción sanguínea en el Laboratorio Clínico.

La saliva de cada paciente fue colectada en tubos estériles después de haber sido estimulada mascando por un minuto un gramo de paraffin. Las muestras fueron guardadas a -20°C para su posterior utilización.

Extracción de DNA de *H. pylori* para PCR.

El DNA de cada muestra de saliva fue extraída por el método descrito por Alam y cols. [19]. Las muestras de 1 ml de saliva fueron centrifugadas a 10 000 x g. por 1 minuto a 4 °C, y el sobrenadante fue descartado. Los pellets fueron lavados con PBS (pH 7.0) y fueron resuspendidos en agua estéril. Los tubos con las suspensiones celulares fueron inmersos en agua hirviendo por 10 minutos e inmediatamente transferidos a hielo. Al término los tubos fueron centrifugados a 10 000 x g. por 1 minuto a 4 °C, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20 °C hasta su uso.

Detección de IgG contra *Helicobacter pylori*.

La detección sérica de IgG contra *H. pylori* fue realizada mediante el kit inmunoenzimático de ImmunoCombII *Helicobacter pylori* IgG (ORGENICS, código 60425002).

Detección de *H. pylori* por PCR anidado.

La detección de *H. pylori* por PCR anidado fue realizado por el método previamente descrito [20]. Para la primera ronda de detección de *H. pylori* se utilizaron los primers EHC-U (5'-CCCTCACGCCATCAGTCCCAAAA-3') y EHC-L (5'-AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAAAC-3') homólogos a un fragmento de

860-pb del DNA genómico de *H. pylori* (80076-8492 pb), en donde el tamaño de los amplicones obtenidos fueron de 417 pb. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μ l; 1 μ l de cada primer EHC-U (25 pmol) y EHC-L (25 pmol) (los primers fueron de Sigma-Genosys), 2.5 μ l de solución buffer para PCR 10x, 10.5 μ l de H₂O libre de nucleasa, 10 μ l de DNA de templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads).

La amplificación del DNA fue realizado en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguida de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión final a 75°C durante 10 minutos.

Para la segunda ronda de amplificación y basados en la secuencia del fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori*, se utilizaron los primers ET-5U (5'-GGCAAATCATAAGTCCGCAGAA-3') y ET-5L (5'-TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3') complementarios a un fragmento interno de los amplicones obtenidos con EHC-U y EHC-L, en donde el tamaño de los amplicones esperados fueron de 230pb (80198-80427 pb) [21].

La amplificación de la segunda ronda fue similar a la primera, excepto que 0.2 µl del producto de la primera ronda fue utilizado como DNA templado y únicamente 25 ciclos de amplificación fueron utilizados. Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizó el DNA extraído de *H. pylori*. ATCC 43629. Como control negativo se utilizó una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el DNA templado.

Detección de los genes de virulencia *vacA* y *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex

Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers VA1-F y VA1-R (25 pmol, cuadro 1), VAG-F y VAG-R (25 pmol) y *cag5c*-F y *cag3c*-R (10 pmol), respectivamente [22].

| Regiones del DNA amplificadas | Nombre del Primer | Secuencia del primer (5' a 3') | Tamaños de los amplicones (pb) |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2 | VAI-F | ATGGAAATACAACAAACACA C | 259/286 |
| | VAI-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |
| <i>vacA</i> m1/ <i>vacA</i> m2 | VAG-F | CAATCTGTCCAATCAAGCG AG | 567/642 |
| | VAG-R | GCGTCAAATAATTCCAAG G | |
| <i>cagA</i> | <i>cag5c</i> -F | GTTGATAACGCTGTCGCTT C | 350 |
| | <i>cag3c</i> -R | GGGTTGTATGATATTTTCCA TAA | |

Cuadro I. Primers utilizados para la amplificación de los alelos de *vacA* y del gene *cagA*.

El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μ l; 1 μ l de cada primer, 16 μ l de H₂O libre de nucleasa, 3 μ l de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación de DNA fue realizado bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 10 minutos.

Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa.

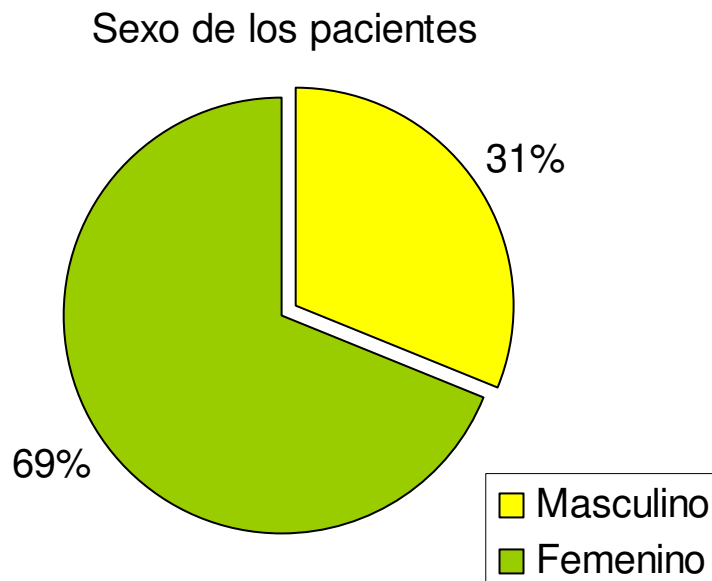
Después de la amplificación del DNA, 10 μ l de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

Análisis de los datos. Para estimar las diferencias estadísticas de los genotipos de *H. pylori* detectados en la saliva de los pacientes con gastritis con relación a los niveles séricos de IgG se utilizó un análisis de varianza.

RESULTADOS

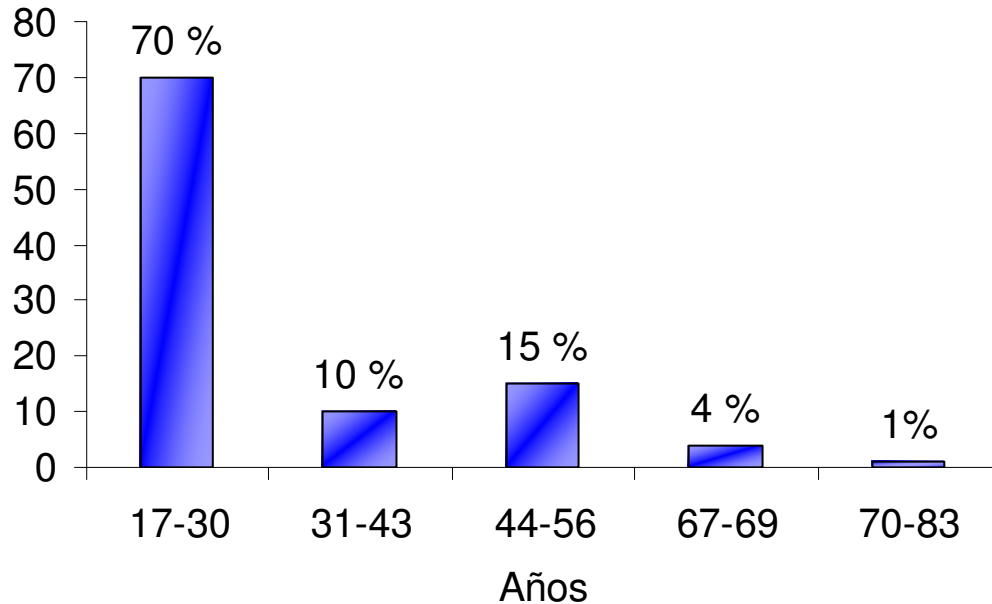
Pacientes estudiados

El 69% (n=70) de los pacientes estudiados correspondió al sexo femenino mientras que el 31% (n=32) al sexo masculino (gráfica 1). La edad del 70% (n=72) de los pacientes estudiados se encontró comprendida en el rango de edad de 17 a 30 años, seguido del 15% (n=15) en el rango de 44 a 56 años, del 10% (n=10) entre 31 a 43 años, del 4% (n=4) en el rango de 67 a 69 años y finalmente el 1% (n=1) en el rango de 70 a 83 años (gráfica 2).



Gráfica 1. Porcentaje de sexo de los pacientes estudiados.

Edades de los pacientes



Gráfica 2. Porcentaje de edades de los pacientes estudiados.

El 43.4% (n=33) de los pacientes seropositivos fueron estudiantes, 17.1% (n=13) amas de casa y empleados (en cada caso), 11.8% (n=9) profesionistas, 6.5% (n=5) obreros y 3.9% (n=3) personas dedicadas al comercio (cuadro 1). El 84.2% (n=64) acostumbraba comer en la calle, principalmente alimentos ricos en grasas e irritantes ácidos como: tacos, tortas, quesadillas, aguas frescas, refrescos, etc. El 88% declaró estresarse mucho, el 74% fueron fumadores y el 65% tenía el hábito de consumir alcohol.

| Ocupación | Porcentaje |
|--------------------------------|------------|
| Estudiantes | 43.4% |
| Amas de casa y empleados | 17.1% |
| Profesionistas | 11.8% |
| Obreros | 6.5% |
| Personas dedicadas al comercio | 3.9% |

Cuadro 1. Ocupaciones de los pacientes seropositivos estudiados.

Detección de IgG contra *H. pylori* en los adultos con gastritis y en el grupo control.

El 74% (n=76) de los pacientes con gastritis presentó anticuerpos contra *H. pylori*, dentro de los cuales el 47.3% (n=36, X=25.5 años) presentó niveles bajos de IgG (≤ 20 u/ml), el 32.8% (n=25, X=35.7 años) niveles medios (40-80 u/ml) y el 19.7% (n=15, X=39.1 años) niveles elevados (>120 u/ml). No se detectaron anticuerpos contra *H. pylori* en ningún individuo del grupo control.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado en las muestras de saliva de los pacientes.

Con el propósito de detectar *H. pylori* en las muestras de saliva se utilizó un método de PCR anidado. El 58.8% (n=60) de las muestras de saliva del total de pacientes (n=102) se detectó *H. pylori*

por PCR. En la figura 1 se aprecia que el tamaño de los amplicones obtenidos en la primera ronda de amplificación de PCR fue de 417 pb y el tamaño de los obtenidos en la segunda ronda fue de 230 pb (figura 2).

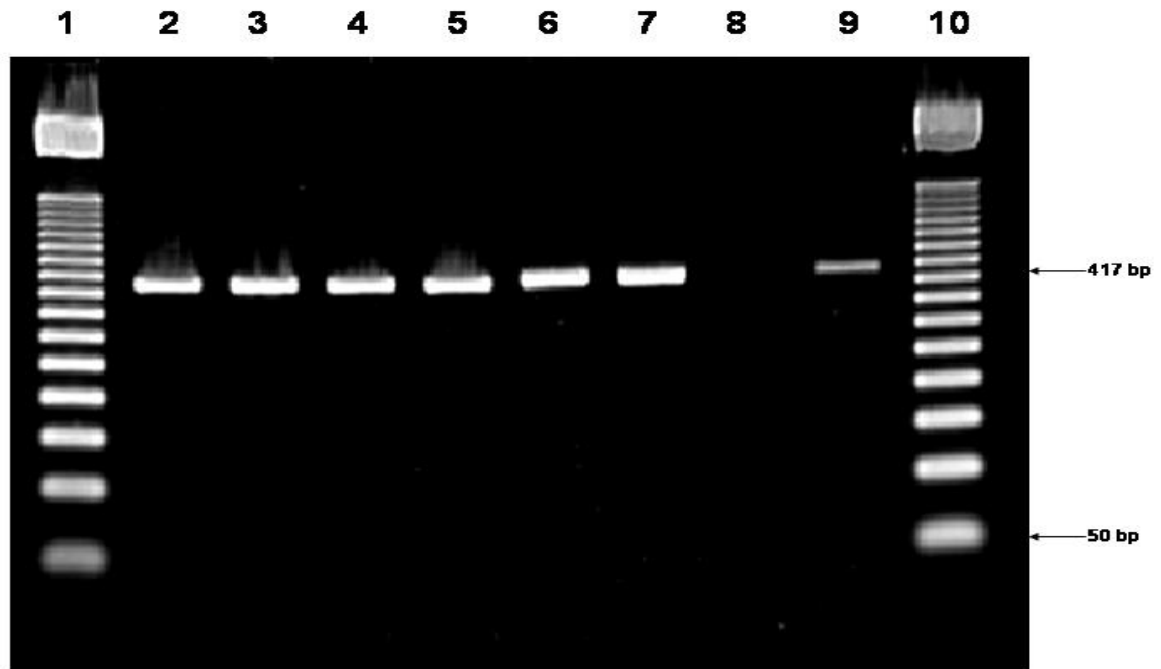


Figura 1. Detección por PCR de *H. pylori* en las muestras de saliva de los pacientes. Línea 1 y 10, MWM 50-pb DNA ladder; Línea 2-6,9, *H. pylori* detectado en muestras de saliva; Línea 7, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 8, Control negativo (sin DNA templado).

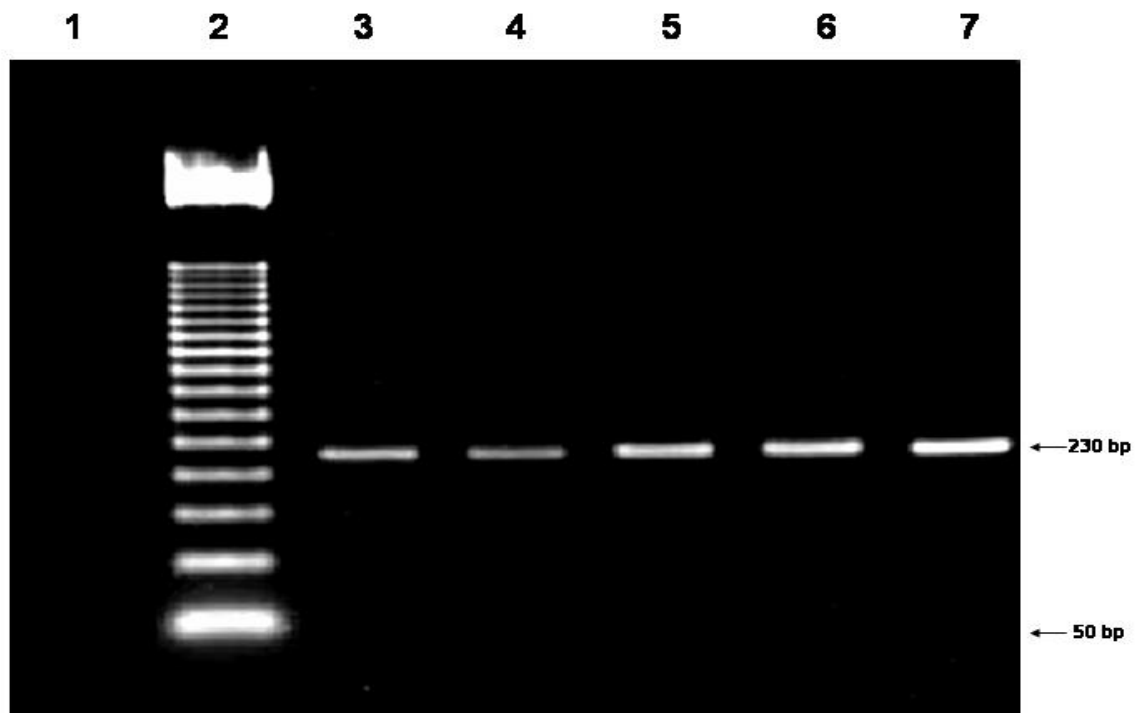


Figura 2. Detección de *H. pylori* en las muestras de saliva mediante la amplificación de DNA por PCR anidado. Línea 1, Control negativo (sin DNA templado); Línea 2, MWM 50-pb DNA ladder; Línea 3-6, *H. pylori* detectado en muestras de saliva; Línea 7, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo).

No se identificó *H. pylori* en ninguna de las muestras de saliva del grupo control. En el 78.9% (n =60) del total de pacientes adultos seropositivos (n=76) se detectó *H. pylori* en la saliva por PCR anidado, dentro de los cuales se identificó *H. pylori* en el 35.5% (n=27) de los pacientes con niveles séricos de IgG bajos, 27.6% (n=21) de los pacientes con niveles medios y en el 15.7% (n=12) de los pacientes con niveles altos (Cuadro II).

| Niveles séricos de IgG | PCR positivo | PCR negativo |
|------------------------|--------------|--------------|
| Bajo (≥ 20 u/ml) | 27 (35.5) | 9 (11.8) |
| Medio (40-80 u/ml) | 21 (27.6) | 4 (5.2) |
| Alto (>120 u/ml) | 12 (15.7) | 3 (3.9) |
| Total | 60 (78.8) | 16 (20.9) |

Cuadro II. Prevalencia de *H. pylori* en la saliva de los pacientes adultos con niveles séricos de IgG.

Amplificación por PCR múltiplex de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori* en las muestras de saliva de adultos.

Utilizando el método de PCR múltiplex caracterizamos las 60 muestras de saliva PCR positivas para *H. pylori*. El 45% (n=27) de las muestras de saliva presentó variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* (cuadro III, figura 3).

El 11.6% (n=7) mostró la asociación de dos genotipos. El genotipo que presentó la frecuencia más alta fue *vacA* m2 con 10% (n=6), seguido de *vacA* s1 con 8.3% (n=5). Cuatro cepas presentaron la asociación *vacA* s2 y *cagA*.

| Saliva de adultos | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| GENOTIPOS | NÚMERO DE MUESTRAS (n = 60) |
| <i>vacA</i> m2 | 6/10.0 |
| <i>vacA</i> s1 | 5/8.3 |
| <i>vacA</i> s2/ <i>cagA</i> | 4/6.6 |
| <i>vacA</i> s2 | 4/6.6 |
| <i>vacA</i> m1 | 4/6.6 |
| <i>vacA</i> s1/ <i>cagA</i> | 1/1.6 |
| <i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2 | 1/1.6 |
| <i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1 | 1/1.6 |
| <i>cagA</i> | 1/1.6 |
| Total | 27/45 |

Cuadro III. Presencia de los alelos de *vacA* y del gene *cagA* en las muestras de saliva de adultos.

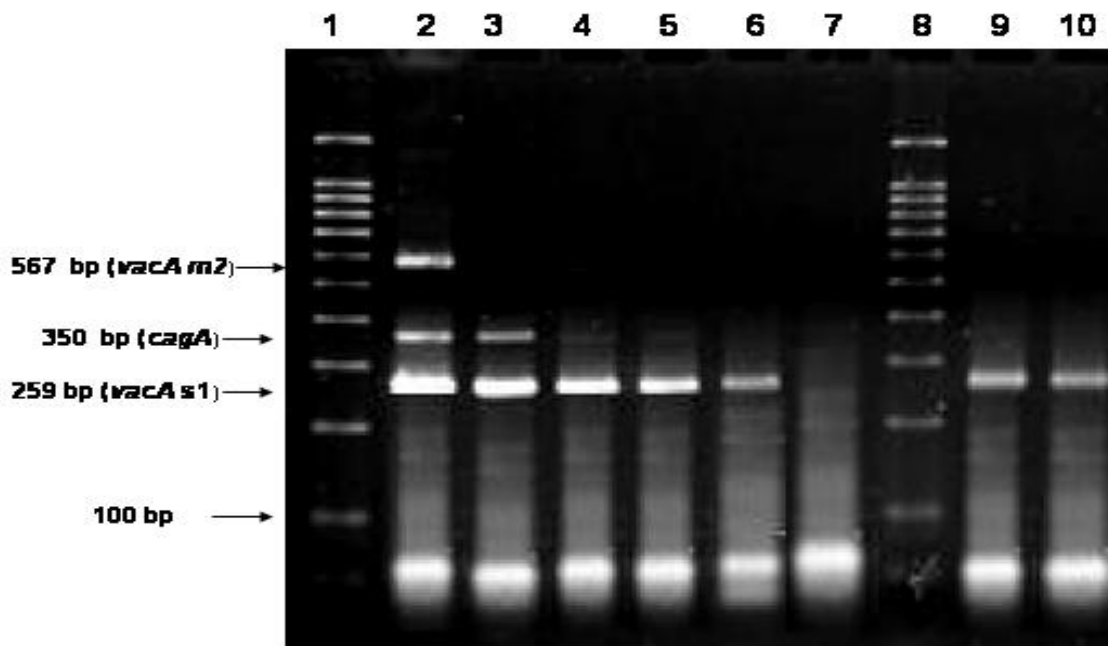


Figura 3. Amplificación por PCR múltiplex de los alelos de *vacA* y del gene *cagA* en las muestras de saliva de adultos. Línea 1 y 8 MWM 100-bp ladder; Línea 2, *vacA* s1, *cagA* y *vacA* m2 de *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 3, *vacA* s1 y *cagA* (saliva); Línea 4,5,6,9-10 *vacA* s1 (saliva); Línea 7, Control negativo (sin DNA templado).

Relación de los niveles séricos de IgG con los genotipos detectados en las muestras de saliva de los pacientes adultos.

De las 27 (45%) muestras de saliva de los pacientes, en el que se detectaron variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA*, 37% (n=10) se obtuvo de pacientes con niveles séricos bajos de IgG, 40% (n=11) con niveles medios y 22.2% (n=6) con niveles altos (cuadro IV).

| Niveles séricos de de IgG | Genotipos detectados | No. de muestras (n = 27) |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| Bajo (≥ 20 u/ml) | <i>vacA s2/cagA</i> | 3/11.1 |
| | <i>vacA s2</i> | 2/7.4 |
| | <i>vacA m1</i> | 2/7.4 |
| | <i>vacA s1</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA m2</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA s1/cagA</i> | 1/3.7 |
| Medio (40-80 u/ml) | <i>vacA s1</i> | 3/11.1 |
| | <i>vacA m2</i> | 3/11.1 |
| | <i>vacA s2</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA m1</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA s1/vacA s2</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA s1/vacAm1</i> | 1/3.7 |
| | <i>cagA</i> | 1/3.7 |
| Alto (>120 u/ml) | <i>vacA m2</i> | 2/7.4 |
| | <i>vacA s1</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA s2</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA m1</i> | 1/3.7 |
| | <i>vacA s2/cagA</i> | 1/3.7 |
| Total | | 27/100 |

Cuadro IV. Relación de los niveles séricos de IgG con respecto a los genotipos detectados en las muestras de saliva de los adultos.

La frecuencia más alta de genotipos detectados en los pacientes con niveles de IgG bajos fue para *vacA s2/cagA* con el 11.1% (n=3), para los pacientes con niveles medios la prevalencia más alta fue para *vacA s1* con el 11.1% (n=3), y para los pacientes con niveles altos la frecuencia mayor fue para *vacA m2* con el 7.4% (n=2). Todas las variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* se encontraron en cada nivel sérico de los pacientes adultos, sin embargo la frecuencia de aparición de estos genotipos entre los tres niveles fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Seroprevalencia de *H. pylori* en los pacientes estudiados

Existen numerosos estudios epidemiológicos sobre la seroprevalencia de *H. pylori* en diferentes países; sin embargo no se habían relacionado los niveles séricos de IgG con la presencia de *H. pylori* y de los genes *cagA* y *vacA* en la cavidad oral de pacientes sintomáticos. En nuestro estudio la seroprevalencia total de *H. pylori* en los pacientes analizados fue del 74% (n=74), la cual es similar a lo reportado en otros países en vías de desarrollo [23,24,25,26], y a la reportada en nuestro país en un amplio estudio seroepidemiológico de infección por *H. pylori* realizado en el periodo de 1987 a 1988, en el que de las 11,605 muestras de suero obtenidas de pacientes (1-90 años) pertenecientes a distintas zonas geográficas y diferente nivel socioeconómico de 32 estados de México, la seroprevalencia por *H. pylori* fue del 66% (n=7720) [27]. Si bien el porcentaje de seroprevalencia encontrado por nosotros coincide con los reportados en países subdesarrollados, éste porcentaje es elevado con respecto al descrito en países desarrollados [28, 29,30].

La edad del 70% (n=72) de los pacientes infectados por *H. pylori* se encontró en el rango de 17 a 30 años. En poblaciones de adultos la seroprevalencia por *H. pylori* varía del 47 al 76% [30,32], y en los países subdesarrollados el porcentaje de infección por *H. pylori* a la edad de de 20 años alcanza hasta el 80% [26,33]. El porcentaje de edad de nuestros pacientes seropositivos es parecido al detectado en

un estudio seroepidemiológico realizado en 5861 estudiantes adolescentes (11-21 años) de escuelas públicas pertenecientes a 33 municipios del estado de Morelos, México, en donde la seroprevalencia total de *H. pylori* fue del 47.6%; 40.6% en preadolescentes (11–14 años), 48.6% en adolescentes (15–17 años) y 59.8% en adultos jóvenes (18–24 años) [34].

Nosotros detectamos que la edad promedio del 47.3% de los pacientes con niveles séricos bajos de IgG (≤ 20 u/ml) fue de 25.5 años (n=36), la edad promedio del 32.8% con niveles medios (40-80 u/ml) fue de 35.7 años (n=25) y la edad promedio del 19.7% con niveles elevados (>120 u/ml) fue de 39.1 años (n=15). Se ha descrito que los títulos de IgG contra *H. pylori* en pacientes infectados se incrementan significativamente con respecto a la edad [35]. En nuestro país se han detectado títulos importantes de IgG contra *H. pylori* en niños menores a los 5 años de edad, los cuales continúan en aumento hasta estabilizarse a la edad de 20 años [28]. Estos datos sugieren que en México las infecciones por *H. pylori* ocurren durante los primeros años de vida y que las infecciones nuevas en adultos son poco frecuentes.

El 84.2% (n=64) de nuestros pacientes seropositivos acostumbraban comer en la calle, dentro de los cuales el 43.4% fueron estudiantes (n=33), 17.1% (n=13) amas de casa y empleados (en cada caso), 11.8% (n=9) profesionistas, 6.5% (n=5) obreros y 3.9% (n=3) personas dedicadas al comercio. Se ha descrito que los mecanismos de transmisión más comunes de *H. pylori* son la vías

fecal-oral y oral-oral [35] y que las bajas condiciones sanitarias y el bajo nivel socioeconómico, principalmente en los países subdesarrollados, han sido asociados con el incremento de la prevalencia de infección por *H. pylori*. [36,37].

Detección de *H. pylori* por PCR anidado en la saliva de los pacientes adultos seropositivos.

Con el propósito de detectar *H. pylori* en las muestras de saliva, nosotros utilizamos los primers EHC-U/ECHC-L que nos permitió amplificar un fragmento de 860 pb del DNA de *H. pylori*. Se ha descrito que los primers EHC-U/ECHC-L han sido más sensibles y más específicos en detectar como un mínimo 5 células de *H. pylori* en la saliva o placa dental, que aquellos primers utilizados para amplificar el gen de la ureasa o el gen 16SRNAr [38]. En este estudio detectamos por un método de PCR anidado *H. pylori* en el 78.8% (n=60) de las muestras de saliva de los pacientes seropositivos (n=76) (cuadro II). Varios autores han reportado la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y han propuesto, que ésta podría representar el origen de la reinfección en el estómago después de la terapia, así como también la ruta de transmisión a otros sujetos [39,40].

La prevalencia de *H. pylori* detectada en la saliva de nuestros pacientes, contrasta con la reportada en un estudio realizado en la Universidad de Ulm, Alemania, en 42 pacientes, en donde la prevalencia de *H. pylori* en la saliva fue del 52% [21] y a la descrita por Umeda y cols en la Universidad Dental y el Hospital Médico de Tokio,

en el cual *H. pylori* fue detectado en la cavidad oral del 35.1% de 57 pacientes estudiados [40]. Las diferencias de prevalencia entre nosotros y estos autores, puede deberse al hecho, de que en México, como en otros países subdesarrollados, el porcentaje de infección por *H. pylori* es mucho más elevado que el de los países industrializados [41,37], en cuyo caso, la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral también podría ser más elevada.

Amplificación de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex en las muestras de saliva

En este trabajo detectamos variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* en 27 (45%) de las 60 muestras de saliva PCR positivas (tabla III), en donde, el alelo de *vacA* m2 se presentó en 6 muestras (10%), s1 en 5 (8.3%), s2 y m1 en 4 muestras (6.6%, en cada caso).

Nuestros porcentajes son menores a los encontrados en un estudio realizado en el Centro Médico de Tennessee, en el cual se compararon los genotipos de las citotoxinas de *H. pylori* en el estómago y la saliva de 31 pacientes con gastritis y úlcera péptica [42]. Estos autores detectaron *vacA* m2 y s1 en 17 muestras de saliva (77%, en cada caso), m1 en 5 muestras de saliva (23%) (no se detectó s2) y *cagA* en 5 (23%).

Nosotros identificamos que las asociaciones de *vacA* s1/m1, s1/s2, y s1/*cagA* estuvieron presentes en una muestra de saliva (1.6% en cada caso) y *vacA* s2/*cagA* se encontró en 4 muestras (6.6%). Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* que presentan la combinación

de los alelos de *vacA* s1/m2 o s1/m1 son responsables de los altos y medios niveles de producción de la citotoxina [43], mientras que la asociación de los genotipos *vacA* s1/*cagA* (identificados en uno de nuestros pacientes) se ha asociado con la gastritis severa [44].

La elevada prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos citotóxicos detectados en la cavidad oral de nuestros pacientes Mexicanos, demuestra que probablemente estas cepas podrían encontrarse también en el estómago y ser responsables de los problemas gástricos o, quizá, como se ha propuesto recientemente, más de una cepa de *H. pylori* podría existir en el estómago y en la saliva del mismo paciente [38].

Relación de los niveles séricos de IgG con los genotipos detectados en las muestras de saliva de los pacientes.

En este trabajo describimos que cada uno de los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* cuantificado en nuestros pacientes adultos, las variantes alélicas de *vacA*, s1, s2, m1,m2 y el gen *cagA* estuvieron presentes (cuadro IV), sin embargo la frecuencia de aparición de estos genotipos fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$).

La detección de anticuerpos contra *H. pylori* se ha realizado mediante ensayos de ELISA o Western Inminobloting, en donde la célula bacteriana ha sido utilizada como antígeno [45,46] o mediante la detección sérica de anticuerpos contra los alelos de *vacA* y el gen *cagA* en pacientes infectados con *H. pylori* [47] . Entre los métodos

serológicos de detección de *H. pylori*, en los cuales la bacteria actúa como antígeno, se ha descrito la presencia de reacciones cruzadas entre bacterias Gram-negativas como *H. pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* y *Haemophilus influenzae*. Nosotros en éste estudio logramos correlacionar la presencia sérica de IgG con la identificación de *H. pylori* en la saliva de nuestros pacientes por PCR anidado.

La elevada prevalencia de las variantes alélicas de *vacA* (s1, s2, m1, m2) y del gen *cagA* identificados en la saliva de los pacientes (cuadro IV), podría ser un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades gástricas más severas, corroborando lo descrito por Miehlke y cols. [48], en su estudio realizado en 34 pacientes con cáncer gástrico y en 35 sujetos asintomáticos. Estos autores encontraron una mayor asociación de *vacA* s1 y m1 (24/34, 70.6%) y del gen *cagA* (30/34, 88.2%) en los pacientes con cáncer gástrico, con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos mostraron que la cavidad oral podría ser reservorio y un importante mecanismo de transmisión de *H. pylori* de individuo-individuo. Por otro lado los genotipos *vacA* m2 y *vacA* s1 predominaron en la saliva de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- S Kignel, F de Almeida Pina, EA André, MP Alves Mayer, EG Birman. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Diseases* 2005; **11**: 17-21.
- 2.- Berenguer J. (2002). Gastroenterología y Hepatología. 3° Edición. Ediciones Harcourt, S. A. EL SEVIER. Madrid, España. Pp 182-203.
- 3.- Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev. Biomed* 2000; **11**:187-205.
- 4.- Makoto Umeda, Hiroaki Kobayashi, Yasuo Takeuchi, Joichiro Hayashi, Yoko Morotome-Hayashi, Kasuko Yano, Akira Aoki, Toshifumi Ohkusa, and Isao Ishikawa. High Prevalence of *Helicobacter pylori* Detected by PCR in the Oral Cavities of Periodontitis Patients. *J Periodontol* 2003; **74**: 1.
- 5.- Q. Song, T. Lange, A. Spahr, G. Adler, G. Bode. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol* 2000; **49**: 349-353.
- 6.- Wolfe M. (2001). Terapéutica de los trastornos digestivos. Mc Graw Hill Interamericana. México, D. F. Pp 90-101.

7.- Belkind-Gerson J, Basurto G, Newton O, Ávila-Figueroa C, Del Río C, García-Gaytán E, Reyes-León A, Torres J. Incidencia de infección por *Helicobacter pylori* en una cohorte de lactantes en el estado de Morelos. *Salud Pública Méx.* 2001; **43**:122-126.

8.- Pearce Mark S, Steele James G, Campbell David I, Thomas Julian E. Tooth Loss and *Helicobacter pylori* Seropositivity: the Newcastle Thousand Families Cohort Study at Age 49-51 Years. *Helicobacter* 2005; **10**: 90-94.

9.- IMSS, 2003. Unidad de Medicina Gastrointestinal Clínica, Región Norte, México D. F. IMSS (103).

10.- Harry, L. Mobley, G. Méndez S. 2001. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM Press. U. S. A.

11.- Hardin Frederick, Wright Richard. *Helicobacter pylori*: Review and Update. *Hospital Physician* 2002; 23-31.

12.- Aguilar GR, Ayala G, Fierros-Zárate G. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pública Méx.* 2001; **43**:237-247.

13.- Padrón Pérez N, Fernández Vallin-Cárdenas E. *Helicobacter pylori* y enfermedad péptica ulcerosa. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1998; **14** (6):619-27.

14.- Shahjahan Kabir. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Feces and Saliva by Polymerase Chain Reaction: a Review. *Helicobacter*. 2004; **9** (2): 115-123.

15.- Leen-Jan van Doorn. Detection of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes. *Rev. Mol. Diagn.* 2001; **1**(3):290-298.

16.- Liviu A. Sicinschi, Pelayo Correa, Luis E. Bravo, Barbara G. Schneider. Detection and typing of *Helicobacter pylori* cag-A/vac-A genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *Journal of Microbiological Methods*. 2003; **52**:197-207.

17.- Santanu Chattopadhyay, Rajashree Patra, T. Ramamurthy, Abhijit Chowdhury, Amal Santra, G. K. Ohali, S. K. Bhattacharya, Douglas E. Berg, G. Balakrish Fair, Asis K. Mukhopadhyay. Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; **42**(6):2821-2824.

18.- Smith S I, Oyedeji K S, Arigbabu A O, Cantet F, Megraud F, Ojo, O O, Uwaifo A O, Otegbayo J A, Ola S O, Coker A O. Comparison of three PCR methods for detection of *Journal of Gastroenterology*. 2004;**10** (13): 1958-1960.

19.- Alam S, Brailsford SR, Whiley RA, Beighton D. PCR based methods for genotyping viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37: 2772–2776.

20.- Li C, Musich PR, Ha T, Ferguson DA Jr, Patel NR, Chi DS, Thomas E. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by novel PCR assay. *J. Clin. Pathol.* 1995;48: 662–666.

21.- Song QT, Lange A, Spahr, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol.* 2000;49; 349-353.

22.- Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy T, Chowdhury A, Santra A, Dhali GK, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:2821-2824.

23.- Graham DY, Adam E, Reddy GT. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. *Dig. Dis. Sci.* 1991;36:1084–1088.

24.- Ramanampamonjy RM, Randria MJ, Razafimahefa SH, Ratsimandisa R, Rajaonarivelo P, Rajaona HR. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Malagasy population. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2007; 100(1): 57-60.

25.- Oliveira AMR, Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. *Am. J. Gastroenterol.* 1994;89:2201–2204.

26.- Goodman KJ, Correa P, Tenaglia HJ. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 1996;144:290–299.

27.- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A Community-Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 1998;178:1089–1094.

28.- Staat MA, Kruszon-Moran D, McQuillan GM, Kaslow RA. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. *J. Infect. Dis.* 1996; 174:1120–1123.

29.- Lindkvist P, Asrat D, Nilsson I. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: comparison of a high and a low prevalence country. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996; 28:181–184.

30.- Hornemann F, Nilius M, Malfertheiner P, Bartmann P. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in German infants and children. *Helicobacter.* 1997;2:176–179.

31.- Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 1991; 302:1302-1305.

32.- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991;325: 1127-1131.

33.- Holcombe C, Omotara BA, Eldridge J, Jones DM. *H. pylori*, the most common bacterial infection in Africa: a random serological study. *Am. J. Gastroenterol.* 1992;87:28–30.

34.- Camargo MC, Lazcano PE, Torres J, Velasco ME, Quiterio M, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* seroprevalence in Mexican adolescents. *Helicobacter*. 2004;9:106-114.

35.- Mitchell HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol. Immunol.* 1999;241:11-30.

36.- Souto FJ, Fontes CJ, Rocha GA, de Oliveira AM, Mendes EN, Queiroz DM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 93:171–174.

37.- O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-México border. *Am. J. Epidemiol.* 2003;158:816-824.

38.- Song QT, Haller, B, Schmid RM, Adler, G Bode G. *Helicobacter pylori* in dental plaque. A comparison of different PCR primers sets. *Dig Dis. Sci.* 1999; 44:479-484.

39.- Li CF, Ha T ., Ferguson DA. Jr, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G, Thomas E. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig. Dis. Sci.* 1996; 41: 2142–2149.

40.- Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J. Periodontol.* 2003;74:129–134.

41.- Mitchell A, Silva TM, Barrett LJ, Lima AA, Guerrant RL. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:1326–1328.

42.- Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA Jr, Litchfield P, Thomas E. Comparison of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig. Dis. Sci.* 2002;8:1850-1856.

43.- Gzyl A, Berg DE, Dzierzanowska D. Epidemiology of *cagA/vacA* genes in *H. Pylori* isolated from children and adults in Poland. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997;48:333-343.

44.- Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J. Clin. Pathol.* 1998;51:55-61.

45.- Hoek FJ, Noach A, Rauws EAJ, Tytgat GNJ. Evaluation of the performance of commercial test kits for detection of *Helicobacter pylori* antibodies in serum. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30:1525–1528.

46.- Newell DJ, Stacey AR. The serology of *Campylobacter pylori* infections, p. 74–82. In B. J. Rathbone and R. V. Headley (ed.), *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 1989.

47.- Donati M, Moreno S, Storni E, Tucci A, Poli Loris.Mazzoni, C, Varoli O, Sambri V, Farencena A, Cevenin R. Detection of Serum Antibodies to *cagA* and *vacA* and of Serum Neutralizing Activity for Vacuolating Cytotoxin in Patients with *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997;4: 478-482.

48.- Miehke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 Genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int. J. Cancer.* 2000;87,:322–327