



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“CORRELACIÓN DEL GEN *vacA* CON LOS NIVELES
SÉRICOS DE IgG ANTI-*Helicobacter pylori* EN PACIENTES CON
INFECCIÓN GASTRODUODENAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

LAURA CHÁVEZ TORRES

**DIRECTORA DE TESIS:
M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**



TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2009



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

Para poder realizar ésta tesis de la mejor manera posible fue necesario el apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

A mi madre, por que siempre fue una magnifica persona, por que en el tiempo que Dios le permitió estar con migo siempre me dio su apoyo incondicional y su recuerdo me ha dado la fuerza para continuar y es la inspiración para alcanzar mis metas.

A mi padre nunca terminaré de agradecerle por todo su apoyo, comprensión y consejos, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa, pero sobre todo le agradezco el gran ser humano que es.

A mis hermanos Juan, Diego y Vero les agradezco por su apoyo y comprensión.

A Gilberto, por que es una persona maravillosa que ha estado con migo en cada momento para apoyarme y hacerme ver mis errores y sobre todo por formar parte de mi vida.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, a Carlos por su alegría, entusiasmo y dedicación a todo lo que hace, a Miguel por su gran sentido del humor y a Eli por ser una gran amiga. Les doy gracias por todo su apoyo y por que fuimos un excelente equipo de trabajo.

A mi amiga Dany por ser una persona tan noble y siempre dispuesta a apoyarte en cada momento.

A Pamela, Saraí y Lupe por que en algún momento de la carrera compartimos tantas aventuras y experiencias.

A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles.

A la Biol. Susana y a la Biol. Patricia por compartir sus conocimientos con nosotros y por apoyarnos durante el tiempo que estuvimos en el laboratorio.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al M. en C. Eric Monroy Pérez por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia, por que en cada momento del desarrollo de este trabajo estuvo presente con absoluta disposición.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------|----|
| I. Introducción..... | 8 |
| II. Antecedentes..... | 15 |
| III. Objetivos..... | 18 |
| IV. Materiales y Métodos..... | 19 |
| V. Resultados..... | 25 |
| VI. Discusión..... | 30 |
| VII. Conclusiones..... | 41 |
| VIII: Bibliografía..... | 42 |

I. INTRODUCCI ÓN

En 1983 los médicos australianos Robin Warren y Barry Marshall cultivaron una bacteria procedente del estómago de un paciente con úlcera y gastritis. Esta bacteria espiral, que inicialmente recibió el nombre de *Campilobacter pyloridis* es conocida actualmente como *Helicobacter pylori*^{1,2}. Su secuencia genética se estableció hasta 1997³.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa curvada o espiral, que mide aproximadamente de 2 a 3 μm , posee seis flagelos unipolares que le dan gran movilidad, es un microorganismo microaerofílico (10% de CO_2)⁴ que se encuentra de forma predominante debajo de la mucosa gástrica del estómago y del duodeno⁵.

Está bacteria tiene gran importancia médica debido a su implicación en la patología gastroduodenal⁶. Ha sido reconocida como el agente causal más importante de úlcera duodenal⁷ y úlcera gástrica,⁸ y tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer gástrico⁹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a esta bacteria como carcinogénica Tipo I¹⁰. El cáncer gástrico ocupa el segundo lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial¹¹ y desafortunadamente en países en vías

de desarrollo el diagnóstico se realiza generalmente en estadios avanzados, lo que se asocia con una alta tasa de mortalidad¹².

Hoy sabemos que la infección por *H. pylori* es la enfermedad bacteriana crónica más extendida del mundo¹³. Se estima que el 50 % de la población mundial está infectada por esta bacteria,¹⁴ con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo donde las tasas de infección alcanzan hasta el 95%,¹⁵ y se presentan durante la infancia entre un 70 y 80%,¹⁶ mientras que en los países desarrollados varía del 19 al 57%,¹⁷ concentrándose en la edad adulta con prevalencias del 60%¹⁶. En México, la prevalencia de la infección por *H. pylori* es de 66%¹⁸.

Se ha postulado que la infección con *Helicobacter* se adquiere temprano en la vida¹⁹. Se han propuesto por lo menos tres opciones de infección: transmisión oro-oral, gastro-oral y feco-oral²⁰. Recientemente la vía de transmisión más aceptada es la de persona a persona (oro-oral),²¹ puesto que se ha hallado *Helicobacter* en la placa dental,²² o bien la identificación de su genoma en saliva.²⁴ La transmisión oro-gástrica se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de endoscopios.²⁵ La bacteria se ha aislado en la materia fecal; por lo que se plantea así la hipótesis de la transmisión feco-oral de la infección²⁶. Se ha propuesto que factores como la

edad, el bajo nivel socioeconómico y la higiene deficiente juegan un rol importante en la infección^{27, 28}. A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, no todas las personas desarrollan la enfermedad. Al parecer el tipo de cepa bacteriana que coloniza la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad^{29,30}.

Se ha reportado que la patogenia de *H. pylori* se debe a factores de virulencia como: la producción de ureasa. El jugo gástrico normal posee un pH < 4, el cual confiere un carácter bactericida y por tanto capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos, sin embargo *H. pylori* tiene la capacidad para sobrevivir en ese ambiente ácido, la ureasa (codificada por 7 genes del cromosoma *ureA* a *ureG*) le permite la adaptación al pH del estómago, mediante la hidrólisis de la urea, cuyos productos (amonio y carbamato) se descomponen para producir amonio y ácido carbónico, el amonio es un agente neutralizante de ácido hidrociorhídrico del estómago³¹ lo que le permite a la bacteria rodearse de un medio alcalino protegiéndose de la secreción ácida gástrica, este proceso permite que *H. pylori* se mueva rápidamente y atraviese la mucosa gástrica para llegar al epitelio gástrico³². El potencial de virulencia de esta enzima se refleja en la fuerte respuesta de inmunoglobulinas séricas generada

contra ella, detectada en pacientes con gastritis activa debido a *H. pylori*³³.

Un factor de virulencia importante es una proteína de membrana externa denominada Proteína Asociada a la Citotoxina (*cagA*), la cual es codificada por el gen *cagA*,³⁴ aproximadamente el 50-70 % de las cepas de *H. pylori* poseen este gen^{35,36}, el cual es un marcador genético para una isla de patogenicidad (*cag* PAI) constituida por 31 genes³⁷. Las cepas de *H. pylori* que presentan el gen *cagA* han sido asociadas con ulceración péptica y con cáncer gástrico^{38,39}. En los países desarrollados el 60% de las cepas son *cagA+*, pero en los países subdesarrollados la proporción de *cagA+* se estima que es mayor⁴⁰. Las cepas *cagA+* al ser más virulentas están asociadas con la ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y se ha descrito que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces más que la inducida por cepas *cagA*.⁴¹

La producción de una citotoxina vacuolizante (*vacA*) es, sin lugar a dudas otro factor de virulencia importante de *H. pylori* en el desarrollo de las enfermedades gástricas, causa degeneración vacuolar de las células gástricas epiteliales y ulceración de la mucosa gástrica⁴². Está codificada por el gen *vacA*, este se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori* en dos

regiones,⁴³ la región *s* (la secuencia de la señal) que existe con los tipos alélicos *s1* o *s2* y la región *m* (región media) presente como los tipos alélicos *m1* o *m2*⁴⁴. Las cepas de *Helicobacter pylori* que presentan las variante alélicas *s1/m1* producen altos niveles de la citotoxina.⁴⁵

Recientemente se ha demostrado que algunos factores de adherencia bacteriana contribuyen a la patogenicidad de *H. pylori*. Así, la proteína de membrana externa BabA2, codificada por el gen *babA2* de *H. pylori*, favorece la adherencia con un epítotope del antígeno de grupo sanguíneo Lewis B (LeB) expresado en las células gástricas humanas. La adherencia de *H. pylori* vía BabA2 actúa como un mecanismo eficiente en la liberación de VacA y CagA, asociándose con la patogénesis, tal como atrofia o metaplasia intestinal⁴⁶.

La identificación de los genes *vacA* y *cagA* permite diferenciar las cepas con mayor virulencia asociadas con cuadros clínicos más severos.⁴⁰

El diagnóstico clínico de la infección por *H. pylori* se basa en diferentes métodos que varían en su grado de agresividad, eficacia y disponibilidad en términos de costo-beneficio.^{47,48} Los primeros informes sobre el hallazgo de *H. pylori* se realizaron analizando biopsias gástricas, lo que llevó a definir una serie de métodos

diagnósticos basados en el análisis de tejidos, o sea cuyo prerrequisito era la gastroscopía y por ende la biopsia, de ahí que esos métodos fueron denominados “invasivos” (como son los cortes histológicos o improntas de las biopsias o bien el cultivo y las pruebas de ureasa); en contra posición con aquellos otros desarrollados más tarde, que no requieren biopsia y que se denominan “no invasivos”. Dentro de estos últimos los dos más utilizados son la serología y la prueba de carbono marcado en el aliento de pacientes. Sin embargo, recientemente se ha diseñado una prueba para la detección de antígenos de *Helicobacter*, cuya correlación es excelente con respecto al hallazgo de la bacteria en la biopsia⁴⁹, de tal manera que con esta técnica se logra el diagnóstico mediante la determinación de la respuesta del huésped a la infección por medio de anticuerpos anti *H. pylori* en el suero del paciente^{47,48}. Esta técnica es de primera atención puesto que puede ser crítica para la fiabilidad del diagnóstico⁵⁰.

La infección por *H. pylori* induce a una respuesta inmune local y sistémica. La respuesta inmune a *H. pylori* al nivel de la mucosa es predominantemente de tipo IgA⁵¹, mientras que la sistémica es esencialmente a inmunoglobulinas de la clase IgG⁵². La detección de la respuesta sistémica del tipo IgA no ha sido un hallazgo importante y los títulos de anticuerpos a un conjunto de antígenos

de células completas de *H. pylori* se han demostrado más altos para la clase IgG.^{52,53}

Se han desarrollado varios métodos serológicos para la detección de *H. pylori*⁵⁴. Las pruebas serológicas constituyen un medio sencillo y poco invasivo para la detección de esta infección. Existen diferentes métodos aplicables al diagnóstico serológico, siendo el método de ELISA el más sensible y el más utilizado⁵⁵. Por otro lado, las pruebas 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 como métodos diagnósticos no invasivos o invasivos, según la muestra empleada^{55,60}.

II. ANTECEDENTES

- Eugenia M. Quintana y cols. en el 2002 hicieron un estudio sobre el valor diagnóstico de anticuerpos anti-*H. pylori* utilizando un método de ELISA comercial y dos preparados en el laboratorio, y obtuvieron que el 83% de los pacientes presentaron infección por *H. pylori*. En la determinación de IgG anti-*H. pylori*, el método de ELISA comercial presentó la sensibilidad diagnóstica más alta (76%).⁹²
- En 1997 Manuela Donati y cols. detectaron anticuerpos séricos para vacA y cagA, donde los anticuerpos séricos IgG para vacA estuvieron presentes en el 69% de los pacientes.⁹⁶
- En el 2006, Garza Yado y col. realizaron un estudio sobre la prevalencia de seropositividad a anticuerpos IgG e IgM contra *Helicobacter pylori* en el personal médico residente del Hospital Universitario de Puebla, donde obtuvo que la prevalencia de seropositividad de anticuerpos IgG e IgM fue del 24.6 y 33.3%, respectivamente, mientras que la prevalencia de seropositividad combinada de IgG e IgM fue del 43.9%.⁶¹

- Cuevas Acuña y cols. en el 2006, estimaron la frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera crónica del Hospital Universitario de Puebla y obtuvieron que el tipo de úlcera crónica más frecuente fue la persistente en 56.7%. La frecuencia de positividad de anticuerpos IgG contra *Helicobacter pylori* fue del 60.0%, para IgM del 33.3% y para antígeno en heces del 60.0%. La combinada IgG, IgM, antígeno en heces, prueba rápida de ureasa y estudio histológico fue del 83%.⁵¹

- Paniagua Contreras y cols, en el 2007, establecieron la prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis, obtuvieron que el 74% de pacientes fue positivo para anticuerpos IgG contra *H. pylori* y la bacteria fue detectada por PCR anidado en el 87% de los pacientes. Los genotipos *vacA* y *cagA* fueron detectados en el 45% (n = 27) de los pacientes positivos para *H. pylori*; 10% *vacA* m2 (n = 6); 8.3% *vacA* s1 (n = 5).⁵⁹

- L. Lobo Gatti y cols, en el 2003, elaboraron un estudio sobre *Helicobacter pylori* y los genes *vacA* y *cagA* en niños de Brasil con gastritis crónica, los resultados indicaron que la genotipificación de

cepas de *H. pylori*, indican que no existe una relación de gastritis crónica infantil en pacientes con *vacA* s1.⁹⁷

- En el 2004 Camargo M. Constanza y cols, determinaron la seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en los adolescentes mexicanos, donde la seroprevalencia de *H. pylori* fue de 47.6% en preadolescentes y 48.6% en adolescentes.⁹⁵

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Correlación de los niveles séricos de IgG anti-*Helicobacter pylori* con la variantes alélicas del genotipo *vacA*.

Objetivos particulares

- Identificación de *Helicobacter pylori* en el estómago de pacientes con gastritis crónica mediante PCR anidado.
- Detectación de los alelos de *vacA* de *H. pylori* en los cultivos gástricos de los pacientes por medio de PCR multiplex.
- Cuantificación de los niveles séricos de IgG anti-*H. pylori* en los pacientes con infección gastroduodenal por el método de ELISA.
- Correlacionar los niveles séricos de IgG, con la variantes alélicas del genotipo *vacA*, a si como con el diagnostico endoscópico de *H. pylori* con la patología gastroduodenal.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes y toma de productos.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron pacientes con diagnóstico de infección gastroduodenal, en el departamento de Endoscopia del Hospital General Regional 72 del IMSS, ubicado en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México. A cada paciente se le tomó una biopsia gástrica que fue colocada en un tubo eppendorf con medio o caldo de Brucella Broth enriquecido con suero de sangre de caballo y para la obtención del suero, a cada paciente en estado de ayuno se le extrajo una muestra de sangre de 5 ml por el método de punción sanguínea, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Análisis Clínicos en la CUSI-Iztacala, donde las biopsias gástricas se maceraron en el mismo tubo con un palillo para posteriormente ser inoculadas en agar casman con sangre de caballo y suplemento DENT y después se incubaron a -20 °C por cinco días para su utilización posterior. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 rpm para separar el suero, éste con ayuda de una micropipeta se colocó en un tubo eppendorf y se mantuvo en refrigeración a -20° C.

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

Se tomó una asada (asa calibrada, 10 μ L) del cultivo en agar casman siguiendo una trayectoria recta a lo largo del diámetro de la caja de Petri. El inóculo se depositó en un tubo de ensayo de 16x150 mm, estéril, con tapón de rosca, que contenía 2 ml de agua desionizada estéril. Se suspendieron las bacterias en el agua por agitación en un Vórtex durante 20 segundos y los tubos se hirvieron (100°C) durante 20 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo (0°C) por 10 minutos. Se tomó 1 ml de cada muestra y se depositó en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante, que contenía el DNA bacteriano, se separó con una micropipeta de 1000 μ L y se depositó en otro tubo eppendorf nuevo y estéril, el cual se etiquetó y se almacenó a -20 °C hasta su utilización para la reacción de la PCR.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado.

La detección de *H. pylori* por PCR anidado se llevó a cabo por un método descrito previamente.²⁹ Para la primera ronda de detección de *H. pylori* se utilizaron los primers EHC-U (25 pmol) y EHC-L (25 pmol). El tamaño de los amplicones esperados fue de 417 pb. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μ L (1 μ l de cada

primer EHC-U y EHC-L + 2.5 μL de solución buffer para PCR 10x + 10.5 μL de H_2O libre de nucleasa). Al término se depositaron 15 μL de la mezcla reactiva en un tubo Puretaq (1.5 mmol de MgCl_2 , 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mmol de dNTPs) y se adicionaron 10 μL del DNA de templado. La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95 °C por 5 minutos, después 40 ciclos de 94° C por 45 seg., 59° C por 45 seg., 72° C por 30 seg. Finalmente se prolongó la extensión a 75° C durante 10 minutos. Para la segunda ronda de amplificación se utilizaron los primers; ET-5U (25 pmol) y ET-5L (25 pmol) complementarios a un fragmento interno de los amplicones EHC-U y EHC-L. El tamaño de los amplicones esperados fue de 230pb. La amplificación de la segunda ronda (PCR anidado) fue similar a la primera excepto que 0.2 μL del producto de la primera ronda fue utilizado como DNA templado y con una ejecución de 25 ciclos para la amplificación. Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizó el DNA extraído de la cepa ATCC 43629 de *H. pylori*. Como control negativo se utilizó una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el DNA templado.

Detección del gen de virulencia *vacA* de *H. pylori* por PCR multiplex.

Para la detección de *vacA* se utilizaron los primers, descritos por Chattopadhyay S y colaboradores: ³⁰ VA1-F y VA1-R (25 pmol), VAG-F y VAG-R (25 pmol) cuyas secuencias se encuentran en el *cuadro1*. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L; 1 μ l de cada primer + 16 μ L de H₂O libre de nucleasa. Posteriormente 22 μ L fueron depositados en un tubo Puretaq (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mmol de dNTPs) + 3 μ L de DNA templado. La amplificación del DNA se realizó en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión de 72°C por 10 minutos.

Cuadro 1. Primers utilizados para la amplificación de los alelos del gen *vacA*.

| Regiones del ADN amplificadas | Nombre del primer | Secuencia del primer (5'a 3') | Tamaño de los amplicones (pb) |
|---------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> s2 | VAI-F | ATGGAAATACAACAAACACAC | 259/286 |
| | VAI-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |
| <i>vacA</i> m1 / <i>vacA</i> m2 | VAG-F | CAATCTGTCCAATCAAGCGAG | 567/642 |
| | VAG-R | GCGTCAAATAATTCCAAGG | |

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

Después de la amplificación del DNA, 10 μ L de cada una de las muestras fueron analizadas por electroforésis en geles de agarosa

al 2 %, bajo las siguientes condiciones: 94 miliampers, 120 volts, por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt (bromuro de etidio) y se fotografiaron bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

Detección de Anticuerpos IgG contra *Helicobacter pylori*.

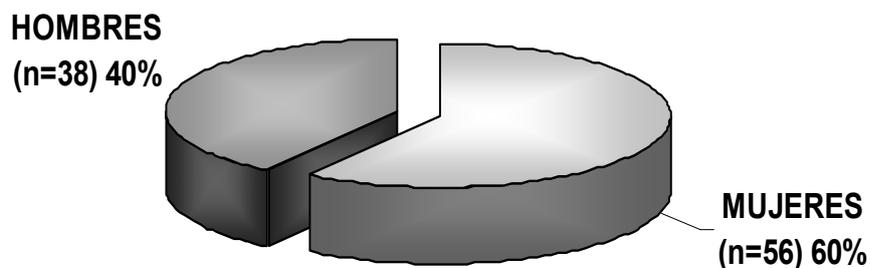
La detección de los anticuerpos contra *H. pylori* se realizó mediante el método de ELISA. Este método nos permitió detectar cuantitativamente los niveles séricos de IgG contra *H. pylori*. Para este método se realizó una dilución 1:10, es decir, en un tubo eppendorf se colocaron 10 μ L de suero y 1 ml de Diluyente 2 del kit de reactivos, agitándose. En una microplaca, el primer pocillo que se designo como el blanco se le agregaron 100 μ L de sustrato y 100 μ L de la solución stop, en el segundo pocillo que fue el patrón, se colocaron 100 μ L del calibrador 2 (10 AU/ml), y en los siguientes pocillos se colocaron 100 μ L de cada una de las muestras problema (diluidas), los pocillos se incubaron 45 minutos a 37 grados centigrados. Al término de los 45 min, los pocillos se lavaron 4 veces con 300 μ L c/tampón 10x, dejándolo reposar 30 seg, en cada lavado, se tiró el sobrenadante de los lavados y se le agregaron 100 μ L de conjugado a todos los pocillos excepto al blanco y se incubaron 45 minutos a 37 grados, posteriormente se tiró el

conjugado y se lavaron 4 veces con 300 μL c/tampón 10x, se dejó reposar 30 segundos en cada lavado, se le agregó 100 μL de sustrato en todas las muestras y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente, sin tirar el sustrato se agregaron 100 μL de solución stop, y permanecieron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente se leyeron a 405 nm.

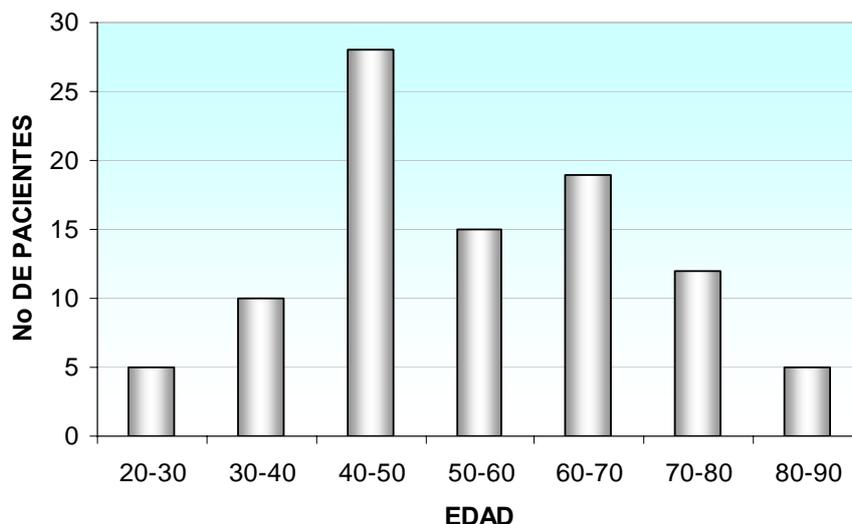
V. RESULTADOS

Pacientes analizados

Se analizaron los sueros y cultivos gástricos de 94 pacientes con gastritis crónica, dentro de los cuales el 60% (n = 56) fueron mujeres, mientras que el 40% (n = 38) hombres. La edad de los pacientes se encontró comprendida en el intervalo de 22 a los 84 años (gráfica 2). Se aprecia que la mayor prevalencia se detectó en los pacientes arriba de los 40 años.



Gráfica 1. Porcentaje de hombres y mujeres con gastritis crónica.

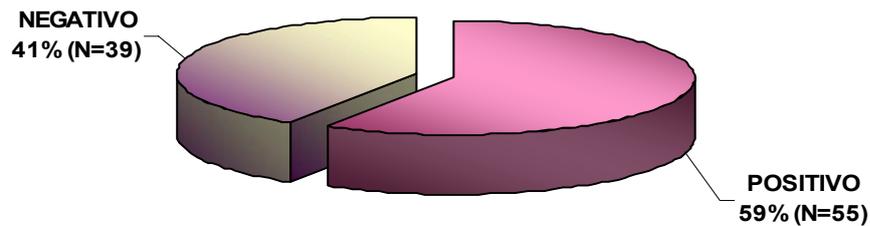


Gráfica 2. Distribución de los pacientes con gastritis crónica por edad.

Identificación de *Helicobacter pylori* en el cultivo de las

biopsias gástricas de los pacientes por PCR

A partir de los cultivos gástricos de los 94 pacientes con gastritis, la bacteria *Helicobacter pylori* fue identificada por PCR en el 59% (n = 55) de los cultivos gástricos (gráfica 3, figura 1).



Gráfica 3. Porcentaje de pacientes infectados por *Helicobacter pylori*.

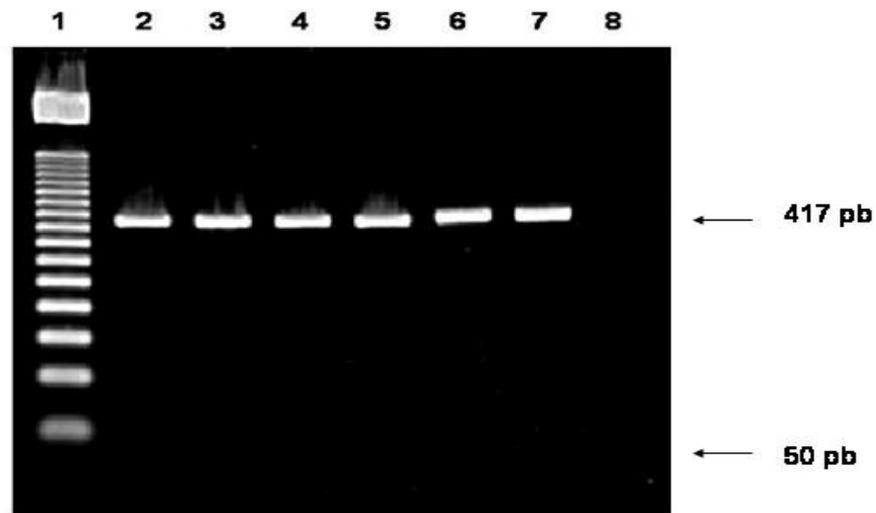


Figura 1. Detección por PCR de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con gastritis crónica. Línea 1, MWM 50-pb DNA ladder; Línea 2- 4, *H. pylori* aislado de biopsias; Línea 5, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 6 y 7, *H. pylori* aislado de biopsias; Línea 8, Control negativo (sin DNA templado).

Identificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* en las cepas de *H. pylori* aisladas de los cultivos gástricos de los pacientes.

A partir de las 55 (n = 59%) cepas de *H. pylori* identificadas por PCR en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes, el genotipo *vacA* se detectó en el 100% (n = 55) (figura 2). En la tabla 1 se aprecia que la frecuencia más elevada del genotipo identificado en las cepas de *H. pylori* fue para la asociación *vacA* s1 / *vacA* m1 con el 49.1% (n = 27) seguida de *vacA* s1 / *vacA* m2 con el 27.3% (n =15).

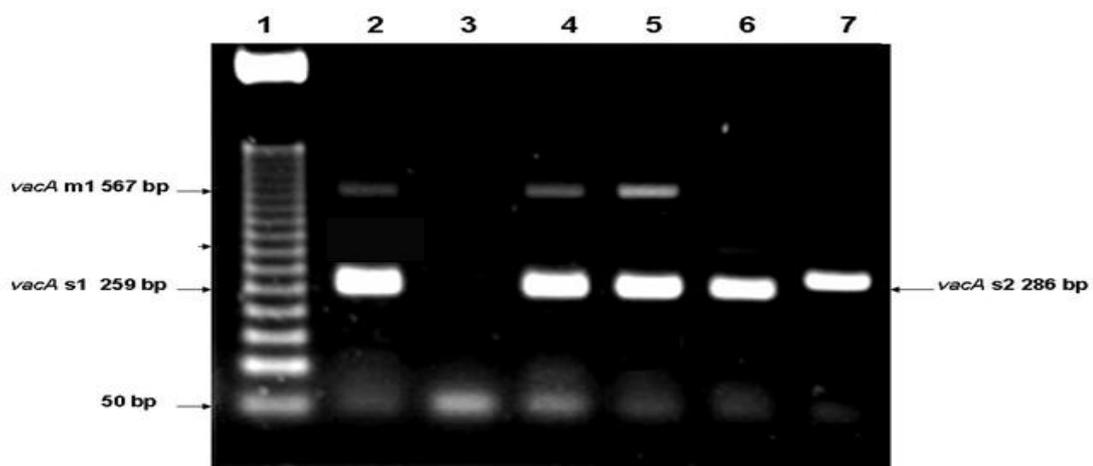


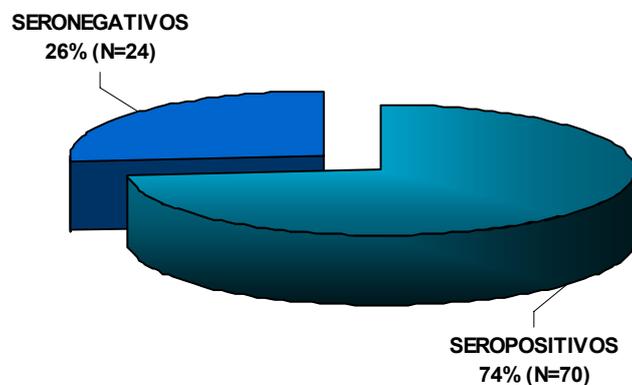
Figura 2. Amplificación por PCR multiplex del alelo de *vacA* en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes. Línea 1; MWM 50-bp ladder; Línea 2; *vacA* s1 y m1. Línea 3; Control negativo (sin ADN templado). Línea 4 y 5; *vacA* s1 y *vacA* m1. Línea 6; *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 7; *vacA* s2.

| Genotipos detectados | No. % |
|---------------------------------|-----------|
| <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 | 27 (49.1) |
| <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 | 15 (27.3) |
| <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m1 | 7 (12.7) |
| <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2 | 6 (10.9) |
| Total | 55 (100) |

Tabla 1. Frecuencia de los genotipos de *vacA* identificados en las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con gastritis.

Detección de los niveles séricos de IgG-Anti *Helicobacter pylori* en los pacientes con gastritis crónica.

En la gráfica 4 se observa que a partir de los 94 pacientes estudiados, el 74% (n = 70) fueron “seropositivos” para *H. pylori*.



Gráfica 4. Porcentaje de pacientes seropositivos para *Helicobacter pylori*.

Asociación de los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* con las variantes alélicas de *vacA*.

En la tabla 2 se aprecia que la frecuencia de asociación más alta de los alelos de *vacA* de *H. pylori* identificados en los cultivos gástricos de los pacientes con niveles séricos de IgG entre 15-60 AU/ml fue para *vacA* s1 / *vacA* m1 con el 16.7% (n = 8), con los niveles séricos entre 61 – 99 AU/ml fue para la asociación *vacA* s1/*vacA* m2 con el 2.1% (n = 1), y para los pacientes con niveles de IgG por arriba de 100 AU/ml las frecuencias más elevadas fueron para *vacA* s1 / *vacA* m1 con el 33.3% (n = 16) y *vacA* s1 / *vacA* m2 con el 16.7% (n = 8). La asociación total predominante fue *vacA* s1/*vacA* m1 con el 50% (n = 24).

| Niveles séricos de IgG (AU/ml) | Genotipos detectados | No de muestras (n = 48) No % |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 15 - 60 | <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 | 8 (16.7) |
| | <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 | 3 (6.3) |
| | <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2 | 1 (2.1) |
| 61 - 99 | <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 | 1 (2.1) |
| > 100 | <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 | 16 (33.3) |
| | <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 | 8 (16.7) |
| | <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m1 | 6 (12.5) |
| | <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2 | 5 (10.3) |
| Total | | 48 (100) |

Tabla 2. Asociación de los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* con las variantes alélicas del gen *vacA*.

VI. DISCUSIÓN

Pacientes analizados

En este estudio nosotros detectamos los niveles séricos de IgG contra *H. pylori* por el método de ELISA y analizamos los cultivos gástricos para identificación de la bacteria por PCR en 94 pacientes (56 mujeres y 38 hombres) (gráfica 1), con rango de edad de 22 a los 84 años (gráfica 2), que acudieron al Hospital General Regional No. 72 del IMSS, ubicado en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México, a realizarse estudios endoscópicos por presentar signos y síntomas de gastritis crónica. La infección por *H. pylori* es la enfermedad bacteriana crónica más extendida del mundo.¹³ Ha sido reconocida como el agente causal más importante de úlcera duodenal⁷ y úlcera gástrica,⁸ y tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer gástrico.⁹ Se estima que el 50 % de la población mundial está infectada por esta bacteria,¹⁴ con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo donde las tasas de infección alcanzan hasta el 95%¹⁵. En la actualidad, los factores de riesgo para el desarrollo de la gastritis son: el tabaquismo, el consumo frecuente de bebidas alcohólicas, el consumo de antiinflamatorios no esteroideos, la personalidad tipo A (elevado nivel de estrés), tener parientes directos con historia de

enfermedad ulcerosa y la infección por *H. pylori*⁶³. Estos factores de riesgo se relacionan con aspectos como el bajo nivel socioeconómico, cultural y educativo, las condiciones sanitarias insuficientes, el hacinamiento, falta de agua potable, la desnutrición, el consumo de alimentos crudos, así como la edad (a mayor edad, mayor probabilidad de infección).⁶⁴ La frecuencia de edad de nuestros pacientes es muy parecida a la detectada en un estudio realizado en 81 pacientes con síntomas de gastritis, en el cual se identificó por PCR los marcadores de virulencia de *H. pylori* en biopsias gástricas, y dentro de los cuales el 59% de los enfermos fueron mujeres y el 41% hombres⁵⁸. En otro estudio en el cual se estimó la frecuencia de infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica, se determinó que la mayoría de los individuos fueron mujeres con el 83.3%⁵⁹, por el contrario en un estudio serológico realizado en 48 pacientes con gastritis se encontró que la mayoría fueron hombres con el 56%⁶⁰, al igual que en un estudio de seroprevalencia de IgG e IgM contra *H. pylori*, en donde de los 57 pacientes estudiados, el 54.4% fueron hombres⁶¹. A pesar de estos resultados no se ha demostrado que exista influencia del sexo y tampoco se han identificado evidencias claras a favor de una relación étnica o racial.⁶²

La edad de nuestros pacientes con el padecimiento de gastritis crónica se encontró comprendida entre los 22 a los 84 años (Gráfica 2). Resultados similares fueron reportados por Trujillo en el 2009, en donde la edad de los pacientes con gastritis crónica se encontró entre los 20 y 70 años⁵⁸. Paniagua y col. en el 2007 reportaron que la edad en el 70% de los pacientes estudiados se encontró comprendida en el intervalo de 17 a 30 años, seguido del 15% en el intervalo de 44 a 56 años⁶⁵. Estas cifras demuestran que la infección por *Helicobacter pylori* se adquiere durante las edades tempranas y se desarrolla durante edades adultas. Se ha reportado que en países desarrollados la infección se encuentra en el 10 % en las personas de 20 años de edad y aumenta gradualmente con la edad hasta encontrarse entre el 50 y 60% a los 60 años, mientras que en países en desarrollo las tasas de infección alcanzan el 95 %.⁶⁶ En un estudio seroepidemiológico realizado en 1997, en el que se analizaron los sueros de 11,605 pacientes mexicanos cuya edad se encontró entre 1 y 90 años, se detectó que el 20 % de los niños de 1 año de edad fueron seropositivos y que esta seropositividad aumento hasta un 50% en los niños de 10 años de edad, esto sugiere que la infección por este microorganismo en nuestro país se adquiere a edades tempranas⁶⁷. En países subdesarrollados como el nuestro se considera que la infección por *H. pylori* es adquirida

durante la infancia y que entre las edades de 20 a 40 años la mitad de la población mundial se encuentra infectada.⁶⁸ Se han estudiado muchos factores, pero todos tienen como denominador común el bajo nivel económico, hacinamiento, la vivienda insalubre y el agua contaminada. De hecho, se ha insistido en que la infección por *H. pylori* es un mejor indicador de las carencias mismas.⁶⁹

Identificación de *Helicobacter pylori* en el cultivo de las biopsias gástricas de los pacientes por PCR

En este estudio describimos que a partir de los 94 biopsias de los pacientes analizados, la bacteria *Helicobacter pylori* fue identificada por PCR en el 59% (n = 55) de los casos (Gráfica3). Nuestro porcentaje es similar al obtenido en el 2007 por Paniagua y col., en el cual detectaron por PCR anidado a *H. pylori* en muestras de saliva de pacientes con gastritis. Estos autores detectaron a *H. pylori* en el 58.8% de las muestras de saliva de los pacientes enfermos⁶⁵. En otro estudio realizado por López y col. en el 2009 sobre la caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas, obtuvieron que la prevalencia de infección por *H. pylori* fue del 58.9%⁷⁰. En la Universidad de Sao Paulo, Brasil, se identificó por PCR a *H. pylori* en el 67.7% de los pacientes con gastritis⁷¹. La prevalencia de

infección en nuestro estudio es más elevada que las cifras reportadas en países desarrollados como Australia, donde las tasas de infección alcanzan el 21%, y al de Estados Unidos, Alemania y Francia en donde la prevalencia no supera el 30%^{72,73,74}. La elevada prevalencia de *H. pylori* encontrada en nuestros pacientes puede deberse a que en México, al igual que en otros países subdesarrollados, el porcentaje de infección por *H. pylori* es más elevado que el de los países industrializados.^{75,76} Se ha descrito que la prevalencia por *H. pylori* es variable, dependiendo de la región geográfica. Así, en los países industrializados es de 30 a 50% y en los países en desarrollo es de 50 a 90% en la población adulta, con una prevalencia en niños hasta de 20%.^{77, 78}

Identificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* en las cepas de *H. pylori* aisladas de los cultivos gástricos de los pacientes.

H. pylori posee varios factores de virulencia involucrados en la patogenia de la enfermedad, dentro de los cuales se encuentra el gen *vacA*, que codifica para la citotoxina vacuolizante VacA, responsable de la formación de vacuolas en las células epiteliales

gástricas, induciendo la apoptosis celular, ocasionando respuesta inflamatoria y destrucción epitelial.⁷⁹ Diversos estudios han demostrado que la expresión del gen *vacA* de las cepas se relaciona más con enfermedad ulcerosa.⁸⁰ En este estudio reportamos que a partir de las 55 (n = 59%) cepas de *H. pylori* aisladas de los cultivos gástricos (figura 2), el genotipo *vacA* se detectó en el 100% (n = 55) de las cepas. Nuestro porcentaje es semejante al reportado por otros autores^{58,81}. Estos resultados confirman lo descrito por Atherton en 1995, quien mencionó que el gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y además varía en dos regiones diferentes,⁸² una de 0.5 kb que corresponde a la región de una secuencia de señal, denominada *vacA s*, y otra región de 0.73 kb que corresponde a la región media, conocida como *vacA m*.⁸³ Respecto a la región de la señal, se conocen dos tipos alélicos *s1* y *s2* y la región media presente como los tipos alélicos *m1* y *m2*.⁸⁴ En nuestro trabajo reportamos que la frecuencia de asociación más elevada fue para *vacA s1 / vacA m1* con el 49.1% (n = 27), seguida de *vacA s1 / vacA m2* con el 27.3% (n = 15) (tabla1). López en el 2009 encontró en un estudio de caracterización del gen *vacA* en cepas de *H. pylori*, que el 52% de las cepas fueron *vacA s1/m1*, el 42% *vacA s2/m2*, y el 4% *s1/m2*,⁷⁰. En otro trabajo realizado en 1999 en México, en el que se

analizaron a 26 pacientes infectados por *H. pylori*, se describió que el 70% de las cepas fueron *vacA s1/m1*.⁸⁵ De hecho la mayoría de los estudios muestran que los genotipos predominantes son *vacA s1/m1* y *vacA s1/m2*. Román y col. en el 2007, en su estudio en pacientes con patología gastroduodenal en el estado de Guerrero, reportaron que el 32.2% de las cepas de *H. pylori* aisladas fueron portadoras de las variantes alélicas de *vacA s1/m1* y el 46.3% de *s1/m2*.⁸⁶ Edmundo en el 2007 reportó que las cepas de *H. pylori* con la asociación *s1/m1*, y en menor grado *s1/m2*, se asocian a una mayor toxicidad⁸⁷. En 1995, Atherton y col. también observaron que las cepas de *H. pylori* presentaban diferente actividad citotóxica, describiendo que las cepas con la asociación *s1/m1* fueron las que presentaban mayor actividad citotóxica; las cepas con genotipo *s1/m2* presentaban una actividad media; mientras las cepas con el genotipo *s2/m2* no presentaban actividad citotóxica. Reportaron además que las cepas *s1/m1* se identificaban con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica y gastritis; mientras que las cepas *s2/m2* se detectaban en mayor número de pacientes asintomáticos.⁴³ Esto demuestra que los genotipos de *H. pylori* detectados tienen que ver con la gravedad de la enfermedad de los pacientes. En un trabajo realizado por Stephan y col. en el 2000, de acuerdo a sus resultados, la asociación de los alelos de

vacA de *H. pylori* s1/m1 fue significativamente más frecuente en pacientes con cáncer gástrico.⁸⁸ En otros estudios también se ha demostrado que las cepas *vacA* s1/m1 están asociadas con patologías graves, como el carcinoma gástrico.⁸⁹ La detección de cepas de *H. pylori* poseedoras de estos determinantes virulencia, puede ayudar a identificar a los pacientes que corren mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico en nuestra población, así como determinar la gravedad de la gastritis.

Detección de los niveles séricos de IgG-Anti *Helicobacter pylori* en los pacientes con gastritis crónica.

Se ha demostrado la gran utilidad de la serología para la identificación indirecta de *H. pylori*.⁹⁰ La infección por *H. pylori* induce una respuesta de anticuerpos, por lo general de IgG, los cuales se mantienen durante la infección. Los niveles de IgG pueden medirse por el método de ELISA, la cual es una prueba con elevada sensibilidad y especificidad.⁹¹ En nuestro estudio detectamos que el 74% de los pacientes fueron seropositivos para *H. pylori* (Gráfica 4). Este porcentaje es similar al reportado en un estudio realizado en el 2007, donde encontraron que también el

74% de los pacientes estudiados tuvieron anticuerpos contra *H. pylori*⁶⁵. En otro trabajo realizado por Eugenia y col, en el 2002 describieron que el 83% de sus pacientes fueron seropositivos⁹². Nuestros resultados son similares a los reportados en otros países subdesarrollados como el nuestro, y son más elevados con respecto a los reportados en países desarrollados^{93, 94} En México en el año de 1997 se realizó un estudio seroepidemiológico, en el que se analizaron los sueros de 11,605 pacientes cuya edad se encontró en el intervalo de 1 a 90 años. Los resultados mostraron que la seroprevalencia de anticuerpos anti *H. pylori* fue del 66%⁶⁷. Jorge A. Zapatier y col. en su estudio concluyeron que la serología es una herramienta valiosa para las poblaciones en desarrollo donde la prevalencia de *H. pylori* es elevada y las condiciones socioeconómicas con frecuencia no permiten la realización de métodos sofisticados ni la evaluación de un gran porcentaje de la población. Mencionan que los resultados, al ser presentados cuantitativamente, permiten la adaptación a un punto de corte con la cual la captación de pacientes infectados se incrementaría.⁹⁰ Por el contrario Eugenia M. Quintana-Guzmán y col. describieron que la aplicación de la serología presenta pocas ventajas al diagnóstico, mencionan que posiblemente sea útil para el seguimiento de tratamiento a largo plazo. Pero la interpretación de los resultados

obtenidos mediante procedimientos serológicos debe ser cautelosa y siempre respaldada por la historia clínica del paciente. Recomiendan realizar un estudio de biopsia gástrica para un adecuado diagnóstico de la presencia de la bacteria en la mucosa gástrica, y no hacerlo utilizando únicamente el estudio serológico.⁹²

Por lo que es importante correlacionar la presencia de *H. pylori* en la biopsias gástricas de los pacientes enfermos con los niveles séricos de IgG anti-*H. pylori*. En este estudio describimos que en los pacientes con los niveles séricos mayores a 100 AU/ml, la presencia de *H. pylori* fue detectada en el 72.8% (n = 35), y la asociación de las variantes alelicas s1/m1 de la bacteria fue del 16.7%, seguida de s1/m2 con el 16.7% (Tabla 2). Existen numerosos estudios epidemiológicos sobre la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* en individuos de diferentes países; sin embargo, no se han relacionado los niveles séricos de IgG con la presencia de *H. pylori*⁶⁵. Este estudio refleja que probablemente en este grupo de pacientes el periodo de tiempo de la enfermedad sea de varios años, además de que podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de patologías más severas si no reciben el tratamiento médico adecuado, sobre todo si consideramos la importante carga genética bacteriana detectada (*vacA* s1/m1) y la elevada cantidad de anticuerpos contra *H. pylori*.

VII. CONCLUSIONES

- Este estudio más de la mitad de los pacientes con gastritis crónica se encontraron infectados por *Helicobacter pylori*.
- Todas las cepas de *H. pylori* presentaron el genotipo citotóxico *vacA*.
- La asociación de las variantes alélicas de *vacA* s1/m1 fue detectado en la mitad de las cepas de *H. pylori* aisladas de los cultivos gástricos de los pacientes enfermos.
- La mayoría de los pacientes analizados presentaron anticuerpos IgG contra *Helicobacter pylori*.
- Los elevados títulos de anticuerpos contra *H. pylori* y la elevada carga genética detectada en las cepas recuperadas de los pacientes enfermos, mostró lo agudo de las infecciones, por lo que fue necesario la prescripción del tratamiento médico más oportuno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Warren JR, Marschall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*;1(8336):1273-5.
 2. Rollason TP. 1986. Campylobacter like organismo in the human stomach. A review. *Acta Gastroenterol Belg*;49(1):63-9
 3. López PG, Alcántara RF, 2002. Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y las enfermedades atópicas. *Rev Alergia Mex*;49:157-62.
 4. Dobois A, Berg DE, Incecik ET, Fiala N, Heman Ackah LM, 1996. Transient and persistent infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun*; 64: 2885-2886.
 5. McGuigan JE, 1996. *Helicobacter pylori*: the versatile pathogen. *Dig Dis*;14(5): 289-363.
 6. Grimley C, Holder R, Loft D, Morris A, Nwokolo C, 1999. *Helicobacter pylori*-associated antibodies in patients with duodenal ulcer, gastric and oesophageal denocarcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 11: 503-9.
-

-
7. Velhuyzen S, Sherman Ph, 1994. *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer and non ulcer dyspepsia: a systematic overview. *Can Med Assoc J*; 150: 177-85.
 8. Labenz J, Borsch G, 1994. Evidence for the essential role of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut*; 35: 19-22
 9. Correa P., 1995. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Sur Phatol*;19 (supp1 I): 573- 43.
 10. Mitchell A. Silva TM, Barret 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.
 11. Parkin DM, Pisani P, Fearly J., 1993. Estimates of Worlwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*; 54:594-606.
 12. Rugge M, Sonogo F, Panozzo M, *et al.*, 1994. Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis. *Cancer*; 73:1127-33.
 13. Marshall BJ., 1994. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*; 89: S116-S128.
-

-
14. Kuipers E, Thijs JC, Festen H., 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther*; (Suppl 2):59-69.
 15. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al., 1997. The Complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*; 388:539-47.
 16. Cave DR. 1997. Epidemiology and transmisión of *Helicobacter pylori* infection. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology*;113: S9.S13.
 17. O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS. 2003. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-México border. *Am J Epidemiol*;158:816-824.
 18. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. 1998. A Community-Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis*; 178: 1089–1094.
 19. Taylor DN, Parsonnet J., 1995. Epidemiology and natural history of *H pylori* infections, In M. J. Blaser, P. F. Smith, J. Ravdin, H.
-

Greenberg and R.L Guerrant (ed.), Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press; p. 551-564.

20. Axon ATR., 1997. Transmission of *Helicobacter pylori*. Yale J Biol Med; 70:1-6.
 21. Cave DR., 1996. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. Am J Med;100(5A):s12-s17.
 22. Kraiden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, et al. 1989. Examination of human stomach, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol; 27:1397-8.
 23. Ferguson Da LIC, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E., 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J Clin Pathol; 31:2802-4.
 24. Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, Zaatari FA., 1993. Detection of *H pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol; 31:783-7.
 25. Akamatsu T, Tabata K, Hironga M, Kawakami H, Uyeda M., 1996. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. Am J Infect Control; 24:396-401.
-

-
26. Mapston NP, Lynch DAF, Axon AT, et al., 1992. The detection of *Helicobacter pylori* in faeces by the polymerase chain reaction. *J Pathol*,168:104.
 27. Morris Brown L., 2000. *Helicobacter pylori*. Epidemiological routes of transmisión. *Epidemiol Rev*;22;283-297.
 28. Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ., 2003. Comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res*.;31;431-439.
 29. Mazari.Hiriart M, López Vidal Y, Castillo-Rojas G, Ponce de León S., 2001. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Arch Med Res*;32: 458-467.
 30. Blaser JM., 1991. *Helicobacter pylori*. *Prince and prac inf dis. Update*;9: 3-9.
 31. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S., 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*; 59:2470-5.
 32. Koneman EW, Allen SD, Schreckenberger PC, Winn WC., 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Mycrobiology*, Lippincott Willian and Wilkins, fifth edicion: 335-39.
-

-
33. Laheij RJF, Straatman H, Jansen JBMJ, Verbeek ALM., 1998. Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology kits: a Review. J Clin Microbiol; 36:2803-9.
 34. Hacker J, Blum-Oelher G, Muhidorfer I., 1997. Pathogenicity island of virulent bacterial structure, function and impact on microbiol evolution. Mol Microbiol; 23: 1089-1097.
 35. Ching C, Wong BC, Kwok E, Ong L, Covacci A, Lam SK. 1996. Prevalence of *cagA* bearing *Helicobacter pylori* Straits detected by the anticagA assay in patients with peptic ulcer disease and in control. Am J Gastroenterol; 91: 949-953.
 36. Tummuru MK, Cover TL, Blazer MJ., 1999. Cloning and expresión of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to citotoxin production. Infect Immun; 61: 1799-1809.
 37. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A., 1996. *cagA* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Nat Acad Sci (Wash); 93: 14648–14653.
-

-
38. Gusmão VR, Mendes EN, Queiroz DM., 2000. *vacA* Genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol*; 38: 2853–2857.
 39. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira NA, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MMDA, Nogueira AMMF., 1998. *cagA* positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer*. 78: 135–139.
 40. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ., 1994. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* in the gastric antrum: association of bacterial density with duodenal ulcer status and infection with *cagA* positive bacterial strains, and negative association with serum IgG levels. *Am J Gastroenterol*; 89:1322.
 41. Blaser MJ., 1996. Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 10 (suppl, 1):73-7.
 42. Covicacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R., 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*; 284: 1328-33.
-

-
43. Atherton JC, Cao P, Peek. RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL., 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem; 270: 17771–17777.
 44. Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint WGV., 2000. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy. J Clin Microbiol; 38: 13–17
 45. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG., 2003. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. J Microbiol Methods; 52; 197–207.
 46. Geis G, Surebaum S, Forsthoff B, Leying H., 1993. Ultrastructure and biochemical Studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol; 38: 371-377
 47. Sanz J, López-Brea M. Diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En Lopez-Brea M. *Helicobacter pylori*. Microbiología, clínica y tratamiento. s.ed; Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1995. p. 153-174.
-

-
48. Christie J, McNulty C, Shepherd N, Valori R., 1996. Is saliva serology useful for diagnosis of *Helicobacter pylori*? *Gut*; 39: 27-30.
 49. Cutler AF, Haustad S, Ma C, *et al.*, 1995. Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infections. *Gastroenterology*; 109:136-41.
 50. Hoek, F. J., A. Noach, E. A. J. Rauws, and G. N. J. Tytgat. 1992. Evaluation of the performance of commercial test kits for detection of *Helicobacter pylori* antibodies in serum. *J. Clin. Microbiol.* 30:1525–1528.
 51. Hayashi S, Sugiyama T, Misano K, Awakawa T, Kurokawa I, Yachi A, *et al.*, 1996. Quantitative detection of secretory immunoglobulin A to *Helicobacter pylori* in gastric juice : antibody capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal*; 10: 74-7.
 52. Rathbone B, Wyatt J, Worsley B. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in nonulcer dyspepsia. *Gut* 1986; 27: 642-7.
 53. Perez-Perez G, Dworkin B, Chodos J, Blaser M., 1988. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med*; 109:11-7.
-

-
54. Simor A, Lin E, Saibil F, Cohen L, Louie M, Pearen S, *et al.*, 1996. Evaluation of enzyme immunoassay for detection of salivary antibody to *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol; 34: 550-3.
55. Newell D., 1991. The principles and practices of the serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Lab Medica International; VIII (6): 7-11.
56. Nilsson HO, Aleljung P, Nilsson I, Tyszhiewicz T, Wadstrom T., 1996. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. J Microbiol Meth; 27:73-9.
57. Notarnicola N, Russo F, Cavallini A, *et al.* 1996. PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA faeces from patient with gastroduodenal pathology. Med Sci Res; 24:785-7.
58. Trujillo
González. 2009. "Identificación de los marcadores de virulencia de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas por PCR convencional". Tesis de licenciatura. México. p. 39-48.
59. Cuevas A, *et al.*, 2006. Frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con urticaria crónica del Hospital Universitario de Puebla. Revista Alergia México;53(5):174-8
-

-
60. Jorge A Zapatier, *et al.*, 2007. Valoración de la serología como método diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la población local de la ciudad de Guayaquil, *Acta Gastroenterol Latinoam*;37:104-109
 61. María de los Ángeles G. Yado, *et al.*, 2006. Prevalencia de seropositividad a anticuerpos IgG e IgM contra *Helicobacter pylori* en el personal médico residente del Hospital Universitario de Puebla. *Revista Alergia México*;53(2):69-72
 62. Bardhan PK., 1997. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin infect Dis*; 25:973-978.
 63. Peterson WL, 1991. *Helicobacter pilory* and peptic ulcer disease. *England J Med*;324:1045-8.
 64. López PG, Alcántara RF., 2002. Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y las enfermedades atópicas. *Rev Alergia Mex*; 49:157-62.
 65. Paniagua C. *et al.*, 2007. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis. *Revista medica del Hospital General de México SS*. Vol. 70, Núm. 3 Jul.-Sep. pp 107 – 114.
-

-
66. Kuipers E, Thijs JC, Festen H., 1998. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;(Suppl 2):59-69.
67. Torres J., *et al.* 1998. Seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis*: 1089-1094.
68. Sipponen P., 1997. *Helicobacter pylori* gastritis-epidemiology. *J Gastroenterol* Apr;32(2):273-7.
69. Cave DR. 1997. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. How Is *Helicobacter pylori* Transmitted?. *Gastroenterology*. 113: S9-S14.
70. A. M. López., *et al.*, 2009. Caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes residentes en Tolima, Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 41: 4-10.
71. Ramos MLK, Darini E, Carales CF, Merano de CC, Aparicio-Troquez SMC, Heraldo CCL, 2005. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsias: correlation with histological findings proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med. J.* 23(3): 113-118.
-

-
72. Megraud F. *et al.*, 1989. Seroepidemiology of *Campilobacter pylori* infection in various populations. *J. Clin. Microbiol.* 27:1870-1873.
 73. Everhart JE, *et al.*, 2000. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the Unites States. *J Infec Dis.* 181: 1359-63.
 74. Breuer T. *et al.*, 1996. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 8: 47-52.
 75. Mitchell A, Silva TM, Barrett LJ, Lima AA, Guerrant RL., 2003. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J Clin Microbiol*; 41: 1326–1328.
 76. O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS., 2000. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-México border. *Am J Epidemiol.* 2003; 158: 816-824.
 77. Brown LM., 2004. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*;22:283-97.
-

-
78. Alfredo Rodríguez Magallán, Juan de Dios Venegas Sandoval, 2009. *Helicobacter pylori*: agresor común de la mucosa gástrica. Med Int Mex; 25(4):295-9.
79. Suer BS, Michetti PO., 2002 *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med; 347:173.
80. Garza GE, Bosques PJ, Pérez PJ, *et al.*, 2004. Association of gastric cancer HLADQAI and infection with *Helicobacter pylori* Cag A and Vac A + in a Mexican population. J Gastroenterol; 39:1462-64.
81. Sisinschi, L.A., Correa, P., Bravo, L.E. Schneider, B.G. 2003. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Methods* .52;197-207.
82. Atherton JC, Cao P, Peek. RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL., 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem; 270: 17771–17777.
83. Blaser MJ, Atherton JC., 2004. *Helicobacter pylori* persistence:biology and disease. J Clin Invest; 113: 321-33
84. Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R,
-

-
- Scherpenisse J, Quint WGV., 2000. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy. J Clin Microbiol; 38: 13–17.
85. Morales-Espinoza, Castillo-Rojas, Gonzalez-Valencia, Ponce de León, Cravioto, López-Vidal. 1999. Colonization of mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strain with different *vacA* and *cagA* genotypes. J. Clin. Microbiol. 37:3001-3004.
86. Román-Román A, *et al.*, 2007. Genotipos *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con patologías gastroduodenales. Unidad especializada de Gastroenterología Endoscopía, Chilpancingo, Guerrero.
87. Edmundo Aravena T., 2007. *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. VII curso de ciencias básicas. Instituto Chilemo-Japonés de Enfermedades Digestivas. Hospital Clínico San Borja-Arriarán. Gastr Latinoam; Vol 18 No 2: 129- 132.
88. Stephan Miehlike, Christian Kirsch, Karin Agha-Amiri, Thomas G Uther, Norbert Lehn, Peter Malfertheirner, Manfred Stolte, Gerhard Ehninger, and Ekkehard Bayerd Orffer, 2000. The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 genotype *cagA* is associated with gastric
-

-
- carcinoma in Germany. Publication of the International Union Against Cancer. *Int. J. Cancer*: 87, 322–327.
89. Castillo-Rojas G, Mazari-Miriart M, López-Vidal Y., 2004. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México*; 538-48.
90. Jorge A Zapatier, Néstor A Gómez, Paola E Vargas, Susana V Maya, 2007. Valoración de la serología como método diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la población local de la ciudad de Guayaquil. *Acta Gastroenterol Latinoam*;37:104-109.
91. María de los Ángeles Garza Yado, Aída Inés López García, David Paz Martínez, José Arturo Galindo García, María Tula Cuevas Acuña, Sergio Papaqui Tapia, Oswaldo Arana Muñoz, María Susana , Pérez Fernández, 2006. Prevalencia de seropositividad a anticuerpos IgG e IgM contra *Helicobacter pylori* en el personal médico residente del Hospital Universitario de Puebla. *Revista Alergia México*; 53(2):69-72
92. Eugenia M. Quintana-Guzmán, Pilar Salas-Chaves, Rosario Achí-Araya, Henry Davidovich-Rose, Karl Schosinsky-Neveermann, 2002. *Valor diagnóstico de anticuerpos anti Helicobacter pylori en*
-

pacientes referidos al Servicio de Endoscopia Digestiva del Hospital San Vicente de Paul, Costa Rica. Rev Biomed; 13:15-23.

93. Graham DY, Adam E, Reddy GT, 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Dig Dis Sci; 36:1084–1088.
 94. Goodman KJ, Correa P, Tengana´ HJ, 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. Am J Epidemiol; 144: 290–299.
 95. Camargo M. Constanza, Lazcano-Ponce Eduardo, Torres Javier, Velasco-Mondragón Eduardo, Quiterio Manuel and Correa Pelayo, 2004. Determinants of *Helicobacter pylori* Seroprevalence in Mexican Adolescents. Vol. 9, No. 2. pp 106–114.
 96. Manuela Donati, *et al.*, 1997. Detection of Serum Antibodies to CagA and VacA and of Serum Neutralizing Activity for Vacuolating Cytotoxin in Patients with *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol. 4. No. 4. p. 478-482.
 97. L. Lobo Gatti, F. Agostinho Jn, R. de Lábio, F. Balbo Piason, L. Carlos da Silva, V. Fagundez de Queiroz, C.A. Peres, D. Barbieri, M. de Arruda Cardoso Smith, S.L. Marques Payão, 2003.
-

Helicobacter pylori and cagA and vacA gene status in children from
Brazil with chronic gastritis. Clin Exp Med (2003) 3:166–172.
