



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para
amplificación del gen de la fracción ribosomal 16S y prueba piloto
para la identificación de *Helicobacter pylori* en niños de 3 y 6 años”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA:

Brisna Joana Tovar Ayona

ASESORA:

M. en C. Maritere Domínguez Rojas

CO-ASESORA:

Dra. en C. Virginia Sánchez Monroy



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificación del gen de la fracción ribosomal 16S y prueba piloto para la identificación de *Helicobacter pylori* en niños de 3 y 6 años

Que presenta la pasante: Brisna Joana Tovar Ayona

Con número de cuenta: 308237366 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de septiembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
2do. SUPLENTE	QFB. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Agradecimientos y créditos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este momento.

Gracias

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me dio la oportunidad de formarme dentro de sus aulas como una profesional de ética y responsabilidad con mi país.

Gracias.

A la Maestra Maritere Domínguez Rojas de manera particular porque ha sido más que una profesora, ha sido consejera tanto para temas académicos como personales y por su confianza en mí para realizar con usted este trabajo.

Gracias

A la Dra. en C. Virginia Sánchez Monroy por su confianza al recibirme en su laboratorio, por estar siempre dispuesta a ayudarme a mejorar mi trabajo, guiarme con su experiencia y proporcionarme todo el instrumental, reactivos y equipos que necesité para realizar las actividades de este trabajo y sin su apoyo no habría sido posible.

Gracias

A la Dra. en C. Sandra Díaz Barriga por permitirme trabajar con usted en el proyecto que dirige.

Gracias

A las profesoras de Genética y Citogenética por sus enseñanzas que me llevaré como egresada de la Facultad y me servirán para toda la vida.

Gracias

A mis profesoras y profesores de la sección de Microbiología por sus clases que me sirvieron de base para este trabajo.

Gracias

A tí mamá por tu esfuerzo, por ser mi amiga, darme tu amor incondicional, por tu confianza, paciencia y apoyo para que siempre consiga lo que me propongo sin importar nada, eres mi ejemplo.

Gracias, te amo.

Agradecimientos y créditos

*A mis abuelos Hermilo y Virginia quienes han sido unos padres amorosos y por ser un gran apoyo para mi mamá y para mí.
Gracias infinitas.*

*A Daniel porque fuiste el tío, hermano y amigo que me dio una de las lecciones más importantes de mi vida.
Gracias.*

*A Ivonne porque a lo largo de mi vida no has sido mi tía sino mi hermana.
Gracias*

*A Mario porque desde que te conozco eres mi mejor amigo, mi confidente y además de brindarme tu comprensión, tu apoyo incondicional y material me has demostrado tu amor siempre.
Gracias*

*A mis muchachas Pris, Ale, Dani, Mitzi y Fer porque esos momentos en los laboratorios, aulas o de dispersión están llenos de anécdotas que recordaré toda la vida y por compartir esta etapa tan importante conmigo.
Gracias*

*A mis amigos Mari, Adrián, Alberto y Emmanuel porque los momentos con ustedes son los más divertidos siempre.
Gracias*

CRÉDITOS

*La presente investigación se realizó gracias al apoyo del Departamento de Biología Molecular de los Laboratorios Multidisciplinarios de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, bajo la dirección de:
Dra. en C. Virginia Sánchez Monroy.*

CRÉDITOS

Brisna Joana Tovar Ayona agradece la beca para la realización de esta tesis al proyecto: “Implementación de Actividades teórico-prácticas para lograr las competencias necesarias del área genómica en las carreras de Bioquímica Diagnóstica y Licenciatura en Farmacia” PAPIME 202912, proyecto en el cual la M. en C. Maritere Domínguez Rojas es colaboradora.

1. ÍNDICE GENERAL

0. AGRADECIMIENTO Y CRÉDITOS.....	3
1. ÍNDICE GENERAL.....	7
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
2.1. FIGURAS.....	8
2.2. TABLAS.....	8
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	10
4. ANTECEDENTES.....	11
4.1. Nicho ecológico de <i>Helicobacter pylori</i>	11
4.2. Epidemiología.....	12
4.3. Características generales de <i>Helicobacter pylori</i>	13
4.3.1. Metabolismo y fisiología.....	14
4.3.2. Factores de patogenicidad.....	15
4.3.3. Características del genoma de <i>Helicobacter pylori</i>	17
4.3.3.1. Características del gen 16S.....	18
4.4. Evaluación de prevalencia en México.....	19
4.5. Diagnóstico de <i>H. pylori</i>	20
4.5.1. Diagnóstico en niños.....	22
4.5.2. Diagnóstico mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	23
4.5.3. Utilización de la información del genoma completo en estudios clínicos.....	24
5. JUSTIFICACIÓN.....	26
6. OBJETIVOS.....	27
7. DELIMITACIÓN DE LA POBLACIÓN.....	28
7.1. Población de estudio.....	28
7.2. Criterios de inclusión.....	28
7.3. Criterios de exclusión.....	28
7.4. Criterios de eliminación.....	28
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
9. RESULTADOS.....	36
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	61
11. CONCLUSIONES.....	67
12. REFERENCIAS.....	68

2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

2.1. FIGURAS

Figura 1. <i>Población por género</i>	37
Figura 2. <i>Estatus nutricional basado en el IMC</i>	38
Figura 3. <i>Mascota con la que convive el paciente</i>	40
Figura 4. <i>Fuente de agua para beber</i>	37
Figura 5. <i>Antecedentes familiares</i>	42
Figura 6. <i>Antecedentes personales</i>	43
Figura 7. <i>Concentración óptima de MgCl₂</i>	44
Figura 8. <i>Estandarización de TM para la cepa tipo H. pylori ATCC 43504</i>	45
Figura 9. <i>Amplificación del fracción ribosomal 16S de H. pylori en muestras clínicas</i>	46
Figura 10. <i>Resultados PCR para la detección de H. pylori</i>	47
Figura 11. <i>Electroferograma de la secuencia obtenida mediante Bioedit v7.2.5</i>	57
Figura 12. <i>Secuencia en formato FASTA obtenida mediante el programa Bioedit v7.2.5</i>	57
Figura 13. <i>Datos de la secuencia de consulta generada con la herramienta de alineamiento BLAST</i> ...	58
Figura 14. <i>Secuencias con alineamiento significativo</i>	58
Figura 15. <i>Gráfico del alineamiento de las secuencias con semejanza significativa</i>	59
Figura 16. <i>Alineamiento entre la secuencia seleccionada y la secuencia consultada</i>	60

2.2. TABLAS

Tabla 1. <i>Cebadores para la fracción ribosomal 16S de H. pylori</i>	30
Tabla 2. <i>Condiciones de PCR para el establecimiento de la concentración óptima de MgCl₂</i>	30
Tabla 3. <i>Programa del termociclador para la PCR</i>	32
Tabla 4. <i>Condiciones de la reacción de secuenciación</i>	33

2. Índice de Figuras y Tablas

Tabla 5. <i>Ciclaje del termociclador</i>	34
Tabla 6a. <i>Generalidades de la población</i>	36
Tabla 6b. <i>Aspectos socioeconómicos</i>	38
Tabla 6c. <i>Antecedentes personales y familiares de patologías gástricas</i>	41
Tabla 7. <i>Resultados de la cuantificación de DNA para la cepa tipo de H. Pylori ATCC 43504</i>	43
Tabla 8. <i>Condiciones de PCR para establecer temperatura de alineamiento óptima</i>	44
Tabla 9. <i>Resultados de la PCR en las muestras</i>	46
Tabla 10. <i>Datos Globales de las muestras positivas a la infección mediante PCR</i>	48

3. Índice de Abreviaturas

3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Adenina	KDa	Kilodaltones
ATCC	American Type Culture Collection	MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
C	Citosina	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
cag	Isla de patogenicidad cag	NLM	Biblioteca Nacional de Medicina (inglés)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	Pb	Pares de bases
dNTPs	Didesoxinucleotidos	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético	pH	Potencial de hidrógeno
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	SDS	Dodecilsulfato Sódico
G	Guanina	rDNA	DNA ribosomal (Genes codificantes del rRNA)
Gn	Garrafón	RNA	Ácido Ribonucleico
Hv	Hervida	rRNA	RNA ribosomal
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>	T	Timina
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer	TBE	Buffer Tris/Borato/EDTA
IBP	Inhibidores de la Bomba de Protones	TM	(T _m) Temperatura de alineamiento
IgA/G	Inmunoglobulina A/B	Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
IMC	índice de Masa Corporal	UBT	Prueba del aliento con Urea

4. ANTECEDENTES

4.1. NICHOS ECOLÓGICOS DE *Helicobacter pylori*

Los humanos estamos colonizados por miles de microorganismos en los que se incluyen las bacterias, arqueas, protozoarios, hongos, levaduras y virus, no obstante las bacterias son las más abundantes y mejor estudiadas [Abreu & Peek, 2014]. En específico, el tracto gastrointestinal está colonizado por una microbiota amplia y compleja, sin embargo, el estómago es un nicho muy particular pues diversas pruebas ya sean bioquímicas, cultivos, histológicas o serológicas detectan que el microorganismo dominante es *Helicobacter pylori*. Esta predominancia es consistente con su adaptación, la cual lo ha habilitado para su permanencia en el estómago. Blaser y Falkow (2013) mencionan una hipótesis sobre la desaparición de la microbiota. En general, aparentemente la microbiota y su hospedero evolucionaron su equilibrio juntos y de manera ordenada. Nuestra compleja microbiota comensal de protección facilita nutrientes, promueve el desarrollo de los tejidos y la integridad, y estimula los múltiples aspectos de la inmunidad.

Sin embargo, dado que la salud humana y la longevidad han mejorado en los países desarrollados, nuevas enfermedades han surgido sin una explicación obvia. La desaparición de la microbiota explica el auge y caída de varias enfermedades comunes en los países desarrollados, a partir del siglo XIX y su aceleración en el siglo XX, se han producido cambios dramáticos en la ecología incluyendo el agua más limpia, familias más pequeñas, un aumento en el número de cesáreas, menor tasa de lactancia materna y en particular más de 60 años de uso generalizado de antibióticos para tratar enfermedades en niños pequeños [Blaser & Falkow, 2013].

A medida que la representación de determinadas especies disminuye en una generación, el potencial de transmisión vertical a la siguiente generación puede disminuir de manera gradual. La transmisión horizontal disminuida resultante de los cambios en la ecología humana hace que sea más difícil para superar las pérdidas en transmisión vertical, esto, entonces se manifiesta como un fenómeno de cohorte de nacimiento. Las alteraciones en la macroecología humana han afectado progresivamente la composición de nuestra microbiota indígena, que a su vez ha

afectado la fisiología humana, y en última instancia el riesgo de enfermedades [Blaser & Falkow, 2013].

H. pylori es un antiguo miembro de la microbiota humana. Sorpresivamente ha ido desapareciendo en los individuos de países desarrollados durante el siglo XX con alteraciones secundarias en la fisiología de la secreción gástrica, hormonal e inmunitaria. Estas alteraciones han sido asociadas con una elevada incidencia de enfermedades importantes como el cáncer gástrico. La pérdida de la colonización y respuesta que se induce en el hospedero afecta la regulación de las hormonas gástricas, incluyendo la gastrina y somatostatina, como tal, el estado de *H. pylori* afecta el pH gástrico y su regulación. En el modelo de la relación hospedero-parásito sugiere que hay varias posibles relaciones fisiológicas que pueden ocurrir. Diversos estudios proponen que los humanos ya habrían sido hospederos de *Helicobacter* hace aproximadamente 60, 000 años [Linz, et al. 2007]. El efecto mencionado a continuación podría ilustrar el concepto en el cual la pérdida de un microorganismo nativo tendrá consecuencias para el anfitrión.

Como *H. pylori* está desapareciendo de las poblaciones de humanos, lo que refleja tanto la disminución de la transmisión como el incremento del tratamiento con antibióticos, padecimientos como la úlcera péptica idiopática y el cáncer gástrico han disminuido su velocidad de aparición, lo que es claramente saludable. Sin embargo, el reflujo esofágico, el esófago de Barrett y el adenocarcinoma están incrementando lo que es claramente perjudicial, todo lo anterior da una idea de los problemas generados por la desaparición de *H. pylori* de la microbiota gástrica [Blaser & Falkow, 2013].

4.2. EPIDEMIOLOGÍA

Epidemiológicamente la prevalencia mundial de la infección por dicho microorganismo varía notablemente entre diferentes naciones, e incluso entre grupos poblacionales dentro de un mismo país. La infección ocurre en los primeros años de vida, por la exposición a un miembro de la familia infectado [Perry, et al, 2006]. Debido a que la infección aguda no es detectada, está relacionado con el nivel socioeconómico de los habitantes de un país, de modo que su incidencia se encuentra entre un 30 y 90% en los países en desarrollo para niños menores de 10 años [Jara-

Romero, et al, 2013], cantidad muy por encima de lo reportado en países industrializados con un valor de 10 a 50% [Ramírez - Ramos, 2009].

Varios estudios han demostrado que la mayoría de las personas adquieren a *H. pylori* durante la infancia en el ambiente familiar, persona- persona es la transmisión más común, también están implicadas la vía fecal-oral y la oral-oral. Así mismo están asociadas con condiciones de hacinamiento y falta de higiene [Perri, et al, 2006].

Como ya se mencionó la infección por *H. pylori* se adquiere usualmente en la infancia y persiste como gastritis crónica durante la edad adulta si la bacteria no es erradicada. En 1994, la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificaron a esta bacteria como carcinógeno humano clase I [IARC, 1994]. Establece que la infección por este microorganismo puede ser asintomática y en algunas personas la infección da lugar a úlceras gástricas y duodenales. También aclara que puede tratarse con diferentes combinaciones de diversos fármacos, con esta erradicación se asegura resolver la gastritis y previene la recurrencia de ulcera péptica.

Diferentes estudios en los que se ha evaluado la prevalencia de infección por *H. pylori* se relacionaron con las estimaciones de incidencia o mortalidad por cáncer gástrico. La seropositividad previa a la infección y el cáncer gástrico posterior fue demostrada en estudios en los cuales en paciente jóvenes la relación era muy fuerte. Posteriormente la relación entre la infección y el linfoma gástrico, fue investigada en pacientes con linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica, el 98% presentaba evidencia histológica de infección. En dos estudios de tratamiento, 5 ó 6 pacientes mostraron regresión tumoral luego de la erradicación de *H. pylori* por lo que ahí fue el punto en el que quedó completamente clara la relación de este patógeno y el cáncer gástrico y linfoma [IARC, 1994].

4.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Helicobacter pylori*

Este microorganismo es una bacteria Gramnegativa, curva, generalmente móvil, presenta cinco o seis flagelos unipolares. Las morfologías descritas incluyen espiral, bacilos curvos, bacilo, alas de gaviota, forma de U, además de una forma cocoide. Esta última se observa bajo condiciones de estrés o por envejecimiento de la célula [Percival & Williams, 2014; Monstein,

Tiveljung & Jonasson, 1998; Monstein, de la Court & Jonasson, 2001; Andersen, & Rasmussen, 2009]. Es una bacteria ureasa y oxidasa positiva, presenta un resultado negativo para las pruebas de hidrólisis de acetato de indoxilo e hipuratos. Causa infecciones en los seres humanos, como se abordó previamente se asocia con gastritis crónica e incluso cáncer. El riesgo a este padecimiento ha provocado la realización de diversos estudios alrededor del mundo en los que se ha buscado entender los principales factores de virulencia [Paniagua y cols. 2009].

4.3.1. METABOLISMO Y FISIOLOGÍA

La bacteria presenta fisiología mixta tanto aerófila como anaerófila que se combinan para producir su característica fisiología microaerófila. Se cree que parte su naturaleza microaerófila se debe a las enzimas sensibles a oxígeno de las vías metabólicas centrales y no se tiene muy clara la base bioquímica de su requerimiento de CO₂, tiene una marcada deficiencia de enzimas anapleróticas. El organismo tiene un sistema de transporte de solutos y un ciclo de los ácidos tricarbónicos incompleto que contribuyen a los complejos requisitos nutricionales. Tiene estricta dependencia de arginina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina y fenilalanina para su crecimiento [Percival & Williams, 2014].

La cadena respiratoria es marcadamente simple, con una única oxidasa terminal y una fumarato reductasa como la única reductasa para la respiración anaerobia. La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) aparentemente es el donador de electrones por preferencia y no como en las demás bacterias que es la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). El característico ciclo de los ácidos tricarbónicos incompleto está dirigido a la síntesis de succinato en las reacciones reductivas de los ácidos dicarbónicos y en alfa-cetoglutarato en las reacciones oxidativas de la vía, ambas están ligadas a la presencia de la alfa-cetoglutarato oxidasa [Percival & Williams, 2014].

H. pylori no posee una derivación de gamma-aminobutarato por la ausencia de gamma-aminobutarato transferasa y de la succínico semialdehído deshidrogenasa. Un análisis genómico demostró que ni la glucosa o el malato son las principales fuentes de piruvato para esta bacteria, cuyo papel lo tiene el lactato, L-arginina, L-serina y D-aminoácidos. También se ha observado

que la vía de Entner- Doudoroff y la de las pentosas fosfato son activadas en vez de las vías glucolíticas [Percival & Williams, 2014, Doig et al 2009].

Con respecto a la ureasa es una importante característica de la fisiología de *H. pylori*, cataliza la hidrólisis de urea para generar ácido carbónico y dos moléculas de amoníaco induciendo un equilibrio ácido base debido a su propiedad de buffer. En un ambiente rico en amoníaco este puede ser asimilado por la bacteria mediante la conversión de glutamato a glutamina y la deficiencia de glutamato sintasa sugiere que el alfa-cetoglutarato es transformado a glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa [Percival & Williams, 2014].

4.3.2. FACTORES DE PATOGENICIDAD

H. pylori ha evolucionado numerosas estrategias que le hacen posible su supervivencia. Para ello, el microorganismo requiere interactuar mediante recursos especializados con las condiciones extremas y ácidas presentes en la luz del estómago y en la mucosa gástrica del hospedero que le permitan evadir los mecanismos de defensa y establecerse en el tejido [Clyne, et al, 2007; Delahay & Rugge, 2012].

Una de las características fundamentales de este patógeno es su adaptación a las condiciones ácidas propias del estómago, esto lo consigue gracias a que posee a la enzima ureasa la cual exhibe una elevada afinidad por su sustrato. El mecanismo de esta enzima es el de hidrolizar cantidades limitadas de urea disponibles en el estómago y generar amoníaco y CO₂, que incrementa el pH del medio circundante a la bacteria. La enzima es un hexámero que contiene níquel, está compuesta por dos diferentes subunidades estructurales la UreA y la UreB, y las subunidades de unión a níquel que son UreE, UreF, UreG y UreH. Su localización es principalmente citoplasmática, pero también se encuentra en la superficie de la bacteria. Se ha propuesto que la función de esta última es la de crear una nube de amoníaco alrededor de la célula bacteriana que la protege. Por otra parte la citoplasmática está reconocida como factor de elevada relevancia para la supervivencia del microorganismo; su expresión es mediada por el pH exterior, induce la expresión del gen ureI que codifica para un canal de urea dependiente de protones, este gen fomenta la permeabilidad de la membrana bacteriana a urea en por lo menos 300 veces cuando el pH es ácido [Clyne, et al, 2007; Israel & Peek, 2012].

4. Antecedentes

Para realizar la colonización de la mucosa gástrica, *H. pylori* depende de su fuerte motilidad para persistir en la viscosidad de la capa mucosa observándose que las cepas mutantes no móviles son incapaces de establecerse y persistir. La motilidad es conferida por la presencia de 5 ó 6 flagelos polares conformados por dos subunidades: una mayor FlaA y una menor FlaB. Adicionalmente, se ha observado que *H. pylori* presenta una enzima capaz de romper los oligómeros de mucina lo que probablemente le permita el libre movimiento entre en la capa de moco [Clyne, et al, 2007; Israel & Peek, 2001; Windle et al, 2000].

Aun cuando la mayoría de las cepas de *H. pylori* que colonizan se encuentran libres entre la mucosa, cerca del 20% se une a las células del epitelio. Estas propiedades de adherencia tienen aparente relevancia en la obtención de nutrientes del hospedero y/o para resistir el desprendimiento de la mucosa reconociéndose la adhesión como específica entre *H. pylori* y el epitelio gástrico. En este proceso se involucran varios ligandos entre los que se encuentran BabA, SabA, antígeno de Lewis^{x/y/a/b}, AlpA/AlpB, OipA y HopZ. Las cepas de *H. pylori* pueden tener dos alelos babA y babB; de estos sólo la proteína codificada por el gen babA es funcional uniéndose al antígeno de Lewis B pues facilita la colonización de la bacteria, se asocia con un incremento de la inflamación gástrica y el aumento del riesgo para la úlcera duodenal y adenocarcinoma [Suarez, Reyes y Herreros, 2011; Clyne, et al, 2007; Paniagua, 2009]. La proteína de membrana SabA permite a la bacteria unirse al antígeno siálico de Lewis, el cual se incrementa como resultado de la respuesta inflamatoria en el tejido gástrico, neutrófilos, eritrocitos y a la proteína de la matriz extracelular laminina; su expresión es regulada inversamente por la capacidad del estómago para secretar ácido [Clyne, et al 2007; Suarez, Reyes y Herreros, 2011]. El antígeno de Lewis^{x/y/a/b} es un lipopolisacárido sintetizado por la bacteria para evitar la respuesta inmune ya que este antígeno es sintetizado por el epitelio gástrico confiriéndole así camuflaje por su bajo potencial antigénico [Suarez, Reyes y Herreros, 2011]. Otras adhesinas involucradas son las proteínas de membrana AlpA/AlpB, OipA y HopZ, estudios han demostrado la relevancia de estas proteínas en el potencial de adhesión al inactivarlo y observar la disminución en la capacidad de adherirse de *H. pylori* [Clyne et al, 2007; Suarez, Reyes y Herreros, 2011; Israel & Peek, 2012].

Se han descrito factores que relacionan la enfermedad desarrollada con la variación de cepa y de estas variaciones dependerá el desarrollo de úlcera o cáncer. El gen cagA codifica

para la proteína mejor caracterizada, con un peso molecular aproximado de 125 a 140 KDa, que es translocado en las células del epitelio gástrico por un sistema de secreción codificado por la isla de patogenicidad cag (cag PAI). En las células del epitelio, CagA es fosforilada en los residuos de tirosina por las cinasas Src de la célula hospedera y estimula las vías de señalización, que a su vez causa el alargamiento de la célula y la activación de proto-oncogenes [Paniagua y cols. 2009; Israel & Peek, 2012].

El gen de la toxina vacuolizante vacA es polimórfico, los principales alelos de la región señal son S1 y S2, mientras que los alelos de la región intermedia son m1 y m2. VacA corresponde a un producto de 87 KDa una vez madura. La proteína madura se ensambla en estructuras oligoméricas compuestas de 12-14 subunidades que bajo condiciones ácidas o alcalinas estas estructuras se desensamblan pero sin perder la capacidad de ensamblaje después de que el pH es neutralizado. Es una toxina que se une a varios receptores epiteliales y genera poros hexaméricos que más tarde son endocitados y convertidos en vacuolas [Yahiro, et al. 2003].

4.3.3. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE *H. pylori*

H. pylori fue la primera bacteria de la que se tuvieron las secuencias completas de dos cepas diferentes, aisladas que permitieron así la primera comparación cruzada entre cepas. Estas fueron la 26695 y J99. A la fecha, se tienen secuenciados 268 genomas. El estudio del material ha revelado una marcada macrodiversidad de su secuencia, es decir, la presencia de una variación de hasta el 10% en la secuencia nucleotídica entre genomas de diferentes cepas de *H. pylori*, así como diferente composición y arreglo génico [Doig. et al. 1999]. Asimismo existe mosaicismos, con una diversidad alélica que se encuentra entre las más altas observadas para cualquier otra especie bacteriana, debida a la alta tasa de recombinación [Schauer, 2006].

El tamaño del genoma de *H. pylori* varía de 1.54-1.67 megabases, con un promedio de 39% de G+C (Guanina y Citosina). Cada cepa codifica en su genoma un diferente número de genes, que varía de 1485-1749 marcos de lectura abiertos, de estos aproximadamente el 91% son genes centrales y el resto específicos de cepa o compartidos por al menos dos cepas [Kawai. et al., 2011]. Los genes específicos de cepa probablemente permiten la adaptación de la bacteria

a diferentes nichos ambientales, los cuales comprenden hospederos genéticamente distintos [Dorer. et al., 2009].

4.3.3.1. CARACTERÍSTICAS DEL GEN 16S

En microbiología clínica la identificación molecular basada en la fracción 16S del rDNA se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, este es el caso de *H. pylori* [Tiveljung, et al. 1998]. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de DNA extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse extrayéndolo a partir de una muestra clínica. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos. Teniendo en cuenta su potencialidad, a medida que los recursos técnicos aumenten y el precio se haga más competitivo, la identificación bacteriana será basada en la secuenciación de regiones altamente conservadas [Moncayo et al, 2002].

Para elegir la región genómica que se quiere amplificar en el caso de la PCR para *H. pylori* se debió seleccionar un segmento que fuera característico de este microorganismo. Su detección mediante el gen del rRNA, aproximadamente el 50% de las pruebas para diagnosticar microorganismos por técnicas moleculares se basan en la identificación por los genes ribosomales por ejemplo el rDNA, esto debido a que representa una mezcla versátil de segmentos altamente conservados y que van de moderadamente a altamente variables los cuales ya son conocidas para los microorganismos patógenos tanto de interés humano como veterinario [Sachse, 2003]. La fracción 16S del DNA ribosomal (rDNA) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Fue establecido como cronometro molecular, ya que se encuentra en todas las bacterias, mientras que su secuencia es tan específica de género que, incluso permite la diferenciación inequívoca de este género bacteriano del género *Campylobacter* con el que está relacionado muy estrechamente [Liu. et al. 2008]. El análisis de esta fracción se ha continuado utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. [Cavalier- Smith, 2002].

La secuencia de la fracción ribosomal 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos consenso, se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos, o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca, o sólo raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos consenso pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel de especie, género e incluso familia [Guillemin & Salama, 2002; Zhonming & Schauer, 2006].

4.4. EVALUACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *H. pylori* EN MÉXICO

Los estudios que se han realizado para determinar la prevalencia de *H. pylori* en México, han sido de carácter serológico. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Paniagua y colaboradores en el año 2009. En el que determinaron la frecuencia de los factores de virulencia descritos con anterioridad en una población del Estado de México, México. El ensayo se realizó con pacientes diagnosticados con gastritis crónica. Encontraron una prevalencia del 66% para en las muestras de biopsia gástrica, y de esta cantidad el 44% resultaron cepas virulentas por lo que indica que pueden generar cualquiera de las afecciones.

Otro trabajo efectuado en una comunidad Menonita del estado de Durango, fue el realizado por Alvarado-Esquivel (2013), en su estudio analizó si el estilo de vida sencillo de esta comunidad agrícola, así como algunas características conductuales estaban asociadas con la seropositividad a *H. pylori*. Los resultados que obtuvo arrojaron una gran cantidad de información, por ejemplo, que la seropositividad incrementaba con la edad. Cabe mencionar la relación de la seropositividad con la baja frecuencia a comer fuera de casa y con el consumo de carne de cualquier origen. Aunque el autor puntualiza que no está muy claro cómo es que los participantes del estudio adquirieron la infección, sin embargo, encuentra una probable explicación en el hábito de compartir el plato con otros integrantes de la familia. Una peculiaridad de este estudio es que encontró diferencias en la seroprevalencia en cuanto a características obstétricas, ya que estableció que era mayor en mujeres con historia de abortos y

partos que en mujeres que carecían de un historial así, no obstante, destaca que hasta la fecha no se ha descrito ningún mecanismo de patogenicidad relacionado a la infección de *H. pylori*.

Las investigaciones desarrolladas en poblaciones infantiles han arrojado entre otras cosas una relación directa de la infección por *H. pylori* con manifestaciones extragástricas como una baja velocidad en el crecimiento y la deficiencia de hierro o incluso anemia ferropénica. El estudio realizado en 2013 por Mendoza y colaboradores, a 675 niños en edad escolar, de edades entre 6-13 años, utilizando anticuerpos contra la célula completa de *H. pylori*, antígenos CagA usando una ELISA antigénospecífica, la prueba del aliento con C-urea (UBT), así como la evaluación del estado nutricional mediante la determinación de hemoglobina y ferritina sérica. Se evidenció ya fuera por ELISA o por UBT que 1 de cada 3 niños presentaban o presentaron infección por este patógeno, de estos, el 26% mostró infección activa y el 11% una infección previa; asimismo el 70% de los casos positivos portaban o portaron cepas de *H. pylori* positivas al factor de patogenicidad CagA. Un dato importante de la investigación es que la deficiencia de hierro en niños con talla baja para su edad está asociada con una infección activa. Además de que una infección previa fue detectada sólo con la prueba de CagA en los niños.

4.5. DIAGNÓSTICO DE *Helicobacter pylori*

En 2004 se celebró el III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*, al cual asistieron un grupo de especialistas como gastroenterólogos, endoscopistas, anatomo-patólogos, epidemiólogos e infectólogos. En dicho evento se discutieron los aspectos más importantes sobre la epidemiología, el diagnóstico y el tratamiento de la infección por *H. pylori*. Todo lo anterior con la finalidad de realizar un consenso que diera al médico una guía para tomar decisiones.

En México, la infección es muy frecuente y la mayoría de los individuos portadores de la bacteria no presentan datos clínicos sugerentes de alguna enfermedad. Ya que realizar el diagnóstico a la población abierta implicaría costos elevados, por lo tanto la búsqueda debe ser intencionada y orientada hacia las entidades clínicas que sin duda se han asociado a la presencia de *H. pylori*. En esta situación se encuentran los enfermos de úlcera péptica (duodenal o gástrica), gastritis atrófica y metaplasia intestinal. Se pueden agregar dos condiciones que son

muy frecuentes en la práctica clínica y corresponden a las personas que utilizan inhibidores de la bomba de protones (IBP) y los que emplean antiinflamatorios no esteroideos [Abdo y cols, 2007].

Desde su descubrimiento en 1983 como agente causal de múltiples padecimientos, se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico. Tradicionalmente se han denominado invasivos y no invasivos, para los que requieren una toma de biopsia y los que no la necesitan respectivamente [Tu, et al. 1999]. Los métodos invasivos son la biopsia utilizada para el cultivo, la prueba rápida de ureasa, el examen histológico y la reacción en cadena de la polimerasa. Dentro los no invasivos están la prueba de aliento, la demostración de antígenos de *H. pylori* en materia fecal y las pruebas serológicas que se basan en el descubrimiento específico de anticuerpos anti-*H. pylori* [Alonso, et al, 2013].

Pese a la variedad de alternativas diagnósticas, para elegir la prueba más útil debe tomarse en cuenta el escenario clínico (necesidad o no de un estudio endoscópico), la certeza diagnóstica de cada prueba y el costo. Un aspecto importante a considerar es la frecuencia de la enfermedad en la población general. Este aspecto incurre sobre los valores de predicción positiva o negativa de los métodos empleados. Por estas consideraciones se establece que: si por el cuadro clínico requiere de un estudio endoscópico debe realizarse una prueba rápida de urea-ureasa. El estudio histológico estaría indicado si la prueba inicial es negativa y el índice de sospecha es elevado. En caso de no efectuarse la endoscopia debe realizarse una prueba en aire espirado con urea marcada [Abdo y cols, 2007].

El cultivo es el método de mayor especificidad en el diagnóstico de *H. pylori*. Sin embargo, la sensibilidad varía mucho de 60 a 98%. Su crecimiento es lento, y las primeras colonias suelen aparecer entre el quinto y séptimo día. La identificación de *H. pylori* se hace por su actividad enzimática de ureasa, oxidas y catalasa [Alonso, et al, 2013].

La serología es útil en el estudio de poblaciones seleccionadas. Sin embargo, no puede diferenciar la infección activa de una exposición previa al patógeno. El rendimiento de estas pruebas puede comprometerse por el método diagnóstico considerado como referencia (prueba de oro), la clase de anticuerpo, el tipo de antígeno y la técnica serológica utilizada, así como por la población de estudio [Alonso, et al, 2013].

En cuanto a la histología, no solo permite el diagnóstico de la infección, sino que además proporciona información sobre los cambios morfológicos de la mucosa gástrica evaluando la densidad de *H. pylori*. La técnica más utilizada es la tinción de hematoxilina-eosina, su principal ventaja es que hace posible el diagnóstico y determinar el grado de la lesión histológica, sin incrementar el costo y el tiempo al procesamiento habitual de las biopsias [Alonso, et al, 2013].

4.5.1. DIAGNÓSTICO EN NIÑOS

La gama de pruebas que pueden emplearse para diagnosticar la infección por *H. pylori* es amplia, no obstante, puede no estar definido que prueba debe particularmente ser utilizada en niños donde los resultados pueden no ser comparables con los obtenidos en pacientes adultos [Guarner, Kalach, Elitsury y Koletzko, 2010]. Ya que el diagnóstico en esta población es complejo se han utilizado en diversos estudios pruebas serológicas, prueba del aliento con urea marcada o antígeno en heces.

La mayoría de los estudios publicados emplean la prueba del aliento con urea (por sus siglas en inglés de Urea Breath Test UBT). Es un método exacto no invasivo para evaluar la infección por *H. pylori* en adultos. Se basa en el análisis de la actividad enzimática de la ureasa característica del metabolismo de *H. pylori* en presencia de urea marcada con isótopos de carbono (^{13}C no radioactivo y ^{14}C radioactivo). Si la bacteria se encuentra en el estómago, la urea es hidrolizada en amoníaco y dióxido de carbono (CO_2); el CO_2 marcado con el isótopo difunde hacia la sangre y es eliminado por los pulmones con la exhalación [Gisbert & Pajares, 2000; Leal, Flores, Fuentes-Pananá, Cedillo-Rivera, y Torres, 2011]. La primera vez que se reportó en un estudio para diagnosticar *H. pylori* fue por Graham y colaboradores en 1987; en esa publicación establece el método como estándar de oro de las pruebas no invasivas en la detección de este microorganismo. La prueba tiene una sensibilidad y especificidad de entre el 90 al 100% en ambos parámetros. Sin embargo, pueden observarse falsos negativos derivados del consumo de antibióticos o IBP durante los días previos al estudio, asimismo se pueden dar falsos positivos por la presencia de otras bacterias ureasa⁺ en el estómago, pese a ello la relevancia clínica de este hecho parece ser muy limitada [Leal, et al, 2011; Gisbert & Pajares, 2000].

4. Antecedentes

La serología se ha elegido para identificar una serie de antígenos específicos de *H. pylori* en los que se incluyen los ya conocidos CagA, VacA, UreB, entre otros. La mayoría de los estudios se basan en inmunoensayos enzimáticos y en la detección de anticuerpos tipo IgG. En un estudio realizado en México, Mendoza-Ibarra y colaboradores, demostraron que la sensibilidad y especificidad de su método desarrollado por ELISA, fue del 80 y del 85%, respectivamente. Se adiciona la determinación de IgA para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba [Lim, Yeoh, Ho & Lim, 2005; Monteiro, Sarrasqueta, et al, 2001; Mendoza-Ibarra et al, 2007]. Así pues estas pruebas deben ser complementadas con otras para alcanzar una sensibilidad y especificidad que se necesitan para que el resultado sea lo más real posible, considerando que no permite discriminar la infección activa de la inactiva, no es útil para determinar el éxito terapéutico e incluso los falsos positivos pueden presentarse tras la erradicación exitosa [Malfertheiner, Megraud & O'Morain, 2007; Hirschl & Rotter, 1996].

En cuanto a la capacidad de detectar antígenos de *H. pylori* en materia fecal, se han desarrollado métodos inicialmente con anticuerpos policlonales y recientemente con monoclonales, los cuales se adquieren mediante kits comerciales. En la publicación de Nares-Cisneros y colaboradores, presentaron la utilidad de una metodología basada en anticuerpos monoclonales, demostrando que es útil para diagnosticar la infección en niños de todas las edades, además para screening poblacionales en países en desarrollo. No obstante, la sensibilidad se ve afectada con el uso de IBP y/o antibióticos, la sensibilidad y especificidad son del 96 y 97% respectivamente estos valores solo aplican siempre y cuando se empleen anticuerpos monoclonales [Kanna, Maradey-Romero & Fass, 2013].

Es evidente que es necesaria una prueba no invasiva y a la vez de alta sensibilidad y especificidad que no solo cumpla estas características sino que además permita cubrir las necesidades de entregar un diagnóstico certero y rápido para el comienzo de la terapia.

4.5.2. DIAGNÓSTICO DE *H. pylori* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Debido a que hasta el momento no existe una prueba de referencia absoluta para el diagnóstico de *H. pylori*, pese a que la histología y el cultivo microbiológico siguen siendo las

más empleadas esta técnica llega a tener sus problemas, dadas las características particulares del microorganismo la posibilidad de aislarlo se reduce considerablemente [Roblejo, et al. 2003]. Por lo anterior es que la reacción en Cadena de la Polimerasa ofrece ventaja sobre los demás métodos diagnósticos ya que detecta la secuencia específica del DNA de *H. pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsia gástrica [Moncayo, et al. 2002]; no obstante, es posible realizar la metodología empleando placa dental y mucosa oral [Sayed, Anand, Kmath, Patil, Preethanath & Anil, 2014; Salmanian, Siavoshi, Akbari, Afshari, Malekzadeh, 2008].

La primera descripción de *H. pylori* en la cavidad oral fue reportada en 1989, cuando la bacteria fue cultivada a partir de placa dental de 1 de 29 pacientes con enfermedad gástrica asociada con la bacteria. Algunos reportes han indicado que la cavidad oral puede servir como reservorio y una fuente de reinfección, además del hecho que facilita la infección oral-oral [Sayed, et al. 2011].

4.5.3. UTILIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE HELICOBACTER EN ESTUDIOS CLÍNICOS.

Conocer la secuencia de un segmento de DNA, representa una gran ventaja para su caracterización, ya que a través de la secuencia, es posible determinar regiones donde inicia la transcripción, así como zonas de inicio de la traducción, deducir la secuencia de aminoácidos para la síntesis de una proteína y la formación de estructuras secundarias [Cerezo y Madrid, 1995].

El análisis del genoma completo empleando la tecnología de la secuenciación proporciona una visión extensa del genoma de *H. pylori* para comprender su evolución y patogenicidad. Desde que se publicó por primera vez el genoma completo de la cepa 26695, las secuencias de más de 20 de ellas se determinaron por el método de Sanger. Esta acumulación de datos con respecto al genoma completo permite un análisis amplio de la secuencia del genoma de este patógeno [Suzuki, et al. 2012].

Saunders y colaboradores (2005), detectaron mediante este análisis, la transferencia horizontal de genes, con la comparación integral gen por gen empleando las cepas J99 y 26695. El resultado indicó que una amplia gama de genes que codifican factores de virulencia y

específicos de las cepas fueron adquiridos por transferencia y que genes metabólicos del núcleo como *ftsK*, *xerD* y *polA* también se intercambiaron.

De igual forma el análisis del genoma completo es valioso para la investigación de factores genéticos relacionados con diferencias en la virulencia entre cepas. El estudio efectuado por McClain et al en 2009 evidenció semejanzas entre cepas obtenida a partir de un paciente con cáncer gástrico y otra de un paciente con úlcera gástrica, encontrando que estaban relacionadas muy íntimamente con cepas encontradas en el este de Asia y cepas europeas respectivamente. En ese ensayo también determinaron que la cepa obtenida de cáncer gástrico presentaba genes específicos de la cepa que eran candidatos para ser asociados con este padecimiento; mientras que las cepas del este de Asia son conocidas por su fuerte capacidad carcinogénica.

El presente trabajo muestra la estandarización de una prueba diagnóstica específica para *H. pylori* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa o PCR pues diversos estudios han demostrado que esta técnica de Biología Molecular tiene una especificidad entre 95 a 100% y una sensibilidad entre 85 y 95 % [Moncayo et al, 2002]. También por lo fácil de tomar la muestra y contribuir a un diagnóstico oportuno y certero ya que como se mencionó previamente la cronicidad de esta infección genera daños muchas veces irreversibles para el paciente.

5. JUSTIFICACIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* en niños en países en vías de desarrollo está muy estudiada debido a que esta condición se ha relacionado con secuelas como déficit de hierro, anemia, talla baja o crecimiento lento, esto aunado a los efectos ya conocidos de la presencia de este microorganismo en el estómago. Además de su vinculación con aspectos como estatus socioeconómico bajo, hacinamiento, grado de estudios y la crianza.

A la fecha en México ya se tiene conocimiento de la prevalencia por grupos etarios desde el primer año de edad y hasta los 90 años. Así como también se sabe esta infección se adquiere antes de los 10 años con la posibilidad de transcurrir la vida del individuo infectado sin desarrollar síntomas hasta la 2ª o 3ª décadas de la vida.

Para realizar el diagnóstico en niños se tiene la indicación de realizar principalmente la prueba del aliento con urea, complementada por pruebas inmunológicas llevadas a cabo con suero o heces. Sin embargo, en un sentido práctico, se requiere de varios días para procesar una serie de muestras y generar resultados.

En el presente trabajo la utilización de la PCR demuestra la conveniencia de emplearla como método diagnóstico al no ser invasiva porque emplea una muestra fácil de tomar, es altamente sensible, específica y se consiguen resultados certeros en tan sólo unas pocas horas para una serie de muestras, permitiendo así optimizar tiempo y recursos en su aplicación práctica en la población infantil.

6. OBJETIVOS:

General:

Establecer las condiciones óptimas para detectar mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa al gen de la fracción ribosomal 16S con la finalidad de que la prueba pueda ser aplicada en estudios posteriores para la identificación de *Helicobacter pylori*.

Específicos:

- ∞ Establecer las condiciones adecuadas de MgCl₂ para la PCR utilizando diferentes concentraciones de esta sal con la finalidad de optimizar dicha reacción de forma particular para la fracción 16S de *H. pylori*.
- ∞ Determinar la temperatura de alineamiento idónea mediante la aplicación de la fórmula de la T_m y manejando además un gradiente de 3 diferentes temperaturas con el propósito de establecer el perfil térmico para la reacción.
- ∞ Amplificar el gen de la fracción ribosomal 16S empleando como muestra el DNA de infantes aplicando las condiciones determinadas previamente para comprobar el alcance de la reacción en base a estas.
- ∞ Realizar la electroforesis en gel de agarosa empleando los productos de PCR evidenciando así las bandas correspondientes al fragmento amplificado de la *H. pylori* con la finalidad de verificar su utilidad diagnóstica.

7. Delimitación de la Población

7. DELIMITACIÓN DE LA POBLACIÓN

7.1.Población de estudio

Se consideró a un grupo de 41 niños de entre 3 y 6 años del Centro de Desarrollo Infantil “Niños Héroes de Chapultepec”.

7.2.Criterios de inclusión

Niños cuyos padres aceptaron participar en el estudio, firmaron el consentimiento informado y proporcionaron las muestras de mucosa de la mejilla para extracción de DNA y fueran sometidas a PCR punto final para el gen de β -globina cuya amplificación de dicho gen fue positiva.

7.3.Criterios de exclusión

Niños cuyos padres no aceptaron participar en el estudio.

7.4.Criterios de eliminación

Muestras de DNA en las que no se logró la amplificación del gen de β -globina, lo que indica que el material se encuentra degradado y no es posible amplificarlo.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

☞ MUESTRAS NIÑOS

Se recibieron 41 muestras de DNA a las que previamente se les evaluó:

- I. Cuantificación y relación de pureza en espectrofotómetro NanoDrop 1000 serie 1371.
- II. Prueba de integridad de DNA en gel de agarosa al 2%
- III. Prueba de calidad del DNA mediante la amplificación del gen de β -globina humana y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2%

☞ MUESTRA DE *HELICOBACTER PYLORI*

Para la estandarización se utilizó una cepa tipo ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* donada por el cepario del Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional. A partir de un cultivo de 96 horas de incubación, a dicha cepa se le realizó la extracción de DNA como se describe a continuación:

Se colocó la cepa tipo ATCC 43504 de *H. pylori* tomada a partir de un cultivo reciente en tubo Eppendorf con capacidad de 2 ml, que contenía 700 μ l de Buffer de extracción (EDTA 0.02 M, Tris 0.01 M, SDS 0.5%). A continuación se mezcló perfectamente manualmente, por inversión durante 5 minutos.

Enseguida se le adicionó un volumen de proteinasa K a una concentración final de 50 μ g/ml, se mezcló perfectamente por inversión y se incubó a una temperatura de 70°C durante 20 minutos.

Se le adicionó un volumen de fenol ultrapuro (Gibco BRL), se mezcló manualmente por inversión durante 5 minutos, y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos.

A continuación se recuperó la fase acuosa en otro tubo Eppendorf y precipitó el DNA con NaCl (Sigma) al 0.2 M y se adicionó un volumen de isopropanol (JT Baker), se mezcló por inversión hasta la aparición de la hebra de DNA y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se procedió a decantar cuidadosamente el sobrenadante.

Por último, se lavó 3 veces con 500 μ l de etanol al 70%, centrifugó a 10,000 rpm, y se dejó secar cubriendo con gasa.

8. Material y Métodos

Previo a la utilización del DNA, se hidrató con un volumen de 250µl de agua estéril inyectable y se almaceno a -4°C.

∞ CUANTIFICACIÓN Y PUREZA

Se realizó la cuantificación y relación de pureza del DNA empleando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 serie 1371 (Thermo Scientific).

∞ CEBADORES

La amplificación se realizó mediante PCR punto final, se utilizaron los cebadores previamente publicados por Roblejo & colaboradores (2005). Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Tabla 1. Cebadores para la fracción ribosomal 16S de H. pylori

Sentido	Antisentido	Tamaño del producto
5'- CCC TCA CGC CAT CAG TCC CAA AAA-3'	5'- AAG AAG TCA AAA ACG CCC CAA AAC-3'	537 pb

∞ ESTANDARIZACION DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE MAGNESIO (MgCl₂) PARA LA PCR DE LA CEPA TIPO H. PYLORI ATCC 43504

Para establecer la concentración de MgCl₂ óptima en la reacción de PCR se realizó una curva de magnesio con las concentraciones 2.0 mM; 3.0 mM; 4.0 mM, y 5.0 mM, respetando las condiciones siguientes:

Tabla 2. Condiciones de PCR para el establecimiento de la concentración óptima de MgCl₂

Reactivo	Volumen (µL) para 25 µL	Concentración final
Buffer de PCR (Invitrogen®) 10X	2.5	1X
dNTP's 2Mm	2.5	0.2mM
MgCl ₂ (Invitrogen®) 50mM	1.0; 1.5; 2.0; 2.5	1 mM, 1.5mM, 2 mM y 2.5 mM
Cebador sentido 10 µL	2.5	1 µM

Cebador antisentido 10 µL	2.5	1 µM
Agua inyectable	Cbp	---
Taq. DNA polimerasa platinum 5U/ µL	0.05	0.01U/ µL

∞ ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (TM) PARA LA REACCIÓN DE PCR DE LA CEPA TIPO H. PYLORI ATCC 43504

Para estandarizar la temperatura de alineamiento óptima en el ciclaje de la PCR se llevó a cabo el cálculo de las temperaturas de cada uno de los cebadores mediante la fórmula [Wallace, Shaffer, Murphy, Bonner, Hirose & Itakura, 1979]:

$$TM = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Sustituyendo se obtiene:

CEBADOR SENTIDO

$$TM = 2(11) + 4(13)$$

$$TM = 54^{\circ}C$$

CEBADOR ANTISENTIDO

$$TM = 2(14) + 4(10)$$

$$TM = 54^{\circ}C$$

De acuerdo a los cálculos anteriores se realizó una curva de TM a las temperaturas 52°C, 54°C y 56°C. Las condiciones del ciclaje se ajustaron a la concentración de MgCl₂ óptima, obtenida previamente.

∞ PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR

Tanto la reacción para las condiciones de MgCl₂ como para la Tm adecuada se llevaron a cabo en el equipo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Los ciclos programados quedaron así:

Tabla 3. Programa del termociclador para la PCR

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	Repeticiones
Desnaturalización	94	5.0	1
Desnaturalización	94	0.5	30
Alineamiento	52/54/56	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión	72	7.0	1

☞ PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez estandarizados los procedimientos se realizó la evaluación con la PCR de las 41 muestras del estudio piloto.

Se debe señalar que para las muestras que resultaron negativas tras la amplificación, se procedió a reamplificar los productos de PCR con la finalidad de obtener más cantidad de materia el cual pudiera ser apreciado en el gel de agarosa como positivo.

☞ ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (ESTANDARIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO)

Todos los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa (Agarosa ultrapura Invitrogen®) al 2% teñidos con bromuro de etidio, usando como solución tampón TBE al 0.5X (TBE 10X Invitrogen®), se empleó una cámara de electroforesis modelo Horizon 58 de la marca Whatman®; fue sometido a un voltaje de 90 a 100 V en un tiempo aproximado de 20 minutos usando la fuente de poder Modelo 250 de Life Technologies®.

El revelado del gel se realizó con un transiluminador de luz ultravioleta a 234 nm DNR Bio-Imaging Systems y el software KODAK Molecular Imaging Software (KODAK MI Software®).

∞ SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Empleando una de las muestras positivas en la población de estudio, como verificación de que el producto de PCR fuera específico de la bacteria *Helicobacter pylori*, se efectuó la secuenciación por método de Sanger como se describe a continuación:

Inicialmente, se realizó al limpieza del producto de PCR elegido, empleando el reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix®), la función de este reactivo se basa en la acción de dos enzimas hidrolíticas, la hexonucleasa I cuya actividad es la de degradar los iniciadores residuales y una fosfatasa alcalina de camarón que hidroliza los dNTP's excedentes.

Para comenzar se colocaron 5 μL del producto en un tubo de polipropileno para 200 μL de capacidad, se le adicionó 2 μL de reactivo ExoSAP-IT, esta mezcla se incubó en el termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems®) a 37°C durante 15 min, posteriormente se incubó a 80°C para inhibir la actividad enzimática.

En segundo lugar, se preparó la mezcla de reacción de secuenciación, esta reacción se basa en el método de Sanger. Al producto de PCR una vez limpio se le adicionó BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems®), este contiene análogos dideoxirribonucleótidos marcados con fluoróforos que se incorporan a la hebra de DNA que se está sintetizando, actuando como terminadores y generando fragmentos de DNA de diferentes longitudes, marcados con colores diferentes entre sí en el extremo 3'. Además, la mezcla contiene elementos propios de la PCR a la que se sometería. En la tabla 4 se describen las condiciones de cada uno de los componentes:

Tabla 4. Condiciones de la reacción de secuenciación.

Reactivo	Cantidad (μL)
BigDye® Terminator (mezcla de reacción) (Applied Biosystems®)	1 μl
Amortiguador BigDye®	2 μl
Iniciador sentido (10 μM)	1 μl
Agua bidestilada	2 μl

Producto de PCR sometido a limpieza con ExoSAP-IT	2 μ l
---------------------------------------------------	-----------

A continuación se muestra el ciclaje para la reacción:

Tabla 5. Ciclaje del termociclador

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN	REPETICIONES
Desnaturalización	96	1 min	1
Desnaturalización	96	30 s	25
Alineamiento	50	15s	
Extensión	60	3 min	

Para someter el producto de la reacción es necesario llevar a cabo una limpieza con el fin de eliminar el excedente de terminadores marcados por no haberse incorporado a las cadenas de DNA recién sintetizadas, pues pueden provocar interferencias, así como la presencia de moléculas de bajo peso molecular además de las sales presentes en el producto. Para realizar la depuración del producto se efectuaron los pasos que a continuación se describen:

Antes de proceder con la limpieza, se hidrató una columna CENTRI-SEPTM (Life technologiesTM®) con 1ml de agua bidestilada, homogeneizando la mezcla por pipeteo sin dejar burbujas.

Se dejó reposar la mezcla contenida en las columnas por 10 minutos.

Se quitaron las tapas superior e inferior de las columnas con el fin de drenar el agua durante 10 minutos.

Se colocaron las columnas en tubos colectores limpios y se procedió a centrifugarlas a 2800rpm durante 5 minutos, lo anterior para retirar el agua excedente.

Se colocaron las columnas en tubos de polipropileno de 1.5ml estériles previamente marcados.

8. Material y Métodos

Se adicionó todo el producto de la reacción de secuencia (17-18µl) en el centro de la columna y posteriormente, se centrifugó la columna a 2800 rpm por 4 minutos. Se retiró la columna y se conservó el producto de reacción de secuencia en el tubo de 1.5 ml.

Después, se procedió a eliminar el excedente de agua empleando una centrifuga de vacío (LABCONCO®) por 20 minutos.

El botón obtenido se resuspendió en 20 µL de formamida y se colocó en una placa de 96 pozos.

Un requisito para introducir las muestras en el secuenciador, es que debe estar desnaturalizada la cadena de DNA, esto se consiguió incubando el producto a 96°C durante 5 minutos y se preservó en hielo hasta su uso.

Posteriormente, se colocó en el secuenciador automatizado 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Finalmente, se obtuvo la secuencia en crudo del equipo y empleando el programa Bioedit® v7.2.5 se generó la secuencia del fragmento en formato FASTA. Se trata de un programa de edición y análisis de secuencias que dentro de sus funciones está la de migrar el resultado al formato FASTA permitiendo su visualización en txt y así facilitar el análisis con otros programas.

Para analizar la secuencia generada se introdujo en BLAST® desarrollado por NLM es una herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos que mediante métodos estadísticos compara la secuencia de DNA o proteica de interés con una base de datos de secuencias, generando así un gráfico correspondiente a la comparación de la secuencia con otras que tienen un significativo grado de similitud [Madden, 2002].

9. RESULTADOS

∞ CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.

Las tablas a continuación muestran las características nutricionales, socioeconómicas y los antecedentes personales y familiares de cada paciente. Asimismo se aprecian gráficos con los datos más relevantes de cada tabla.

La población estudiada estuvo compuesta por 7 pacientes de 3 años (4 mujeres y 3 hombres), 15 pacientes de 4 años (8 mujeres, 7 hombres), 15 pacientes de 5 años (8 mujeres, 7 hombres) y 4 pacientes de 6 años (3 mujeres y 1 hombre).

Con respecto a la somatometría para indicar el IMC en niños la OMS establece que debe hacerse de acuerdo a las curvas de percentiles para IMC en niños y niñas. Para interpretar el valor de interpolación de los datos se considera que el porcentaje de IMC concuerda con que por cada 100 niños ese porcentaje tiene peso bajo, normopeso, sobrepeso u obesidad, además que para considerar realmente sano a un niño este debe encontrarse en la curva que corresponde a 50 percentiles [OMS, 2014].

Tabla 6a. Generalidades de la población

# Ctrl	Edad	Sexo	Somatometría			
			Peso (Kg)	Talla (m)	ICM	Percentiles
1s	3	F	12	0.9	14.8	25
2s	3	M	12	0.88	15.49	48
3s	3	F	12	0.92	14.17	5
4s	3	F	15	1.02	14.41	10
5s	3	M	12.5	0.91	15.09	17
6s	3	M	13.5	0.97	14.34	5
7s	3	F	15	0.94	16.97	75
8s	4	F	16.5	1.1	13.63	4
9s	4	F	15	1.05	13.6	3
10s	4	F	16.5	0.96	17.9	94
11s	4	M	18	1.08	15.43	46
12s	4	F	19	1.06	16.9	85
13s	4	M	18.5	1	18.5	97
14s	4	F	16	1	16	73

9. Resultados

15s	4	F	23	1.08	19.7	97
16s	4	F	15.5	1	15.5	56
17s	4	M	16	1.04	14.79	23
18s	4	M	15.5	0.98	16.13	65
19s	4	F	17.5	1.1	14.46	22
20s	4	M	19.5	1.11	15.82	53
21s	4	M	19	1.12	15.14	30
22s	4	M	16	1.02	15.37	41
23s	5	M	15.5	0.92	18.31	96
24s	5	F	24	1.02	23.06	99
25s	5	F	18	1.09	15.15	50
26s	5	F	16.5	1.04	15.25	53
27s	5	F	17	1.14	13.08	2
28s	5	M	16.5	1.1	13.63	3
29s	5	M	16.4	1.1	13.58	3
30s	5	M	16	1.02	15.37	45
31s	5	F	20	1.1	16.52	80
32s	5	F	18.5	1.14	14.23	20
33s	5	M	26.5	1.14	20.39	98
34s	5	M	19.2	1.12	15.3	50
35s	5	M	16.9	1.09	14.22	13
36s	5	F	20	1.05	18.14	90
37s	5	F	22	1.1	18.18	92
38s	6	F	17	1.05	15.41	52
39s	6	M	20	1.15	15.12	60
40s	6	F	16	1.09	13.46	5
41s	6	F	18	1.1	14.87	40

En las gráficas siguientes se observa la prevalencia en cuanto a género e IMC.

■ Mujeres ■ Hombres

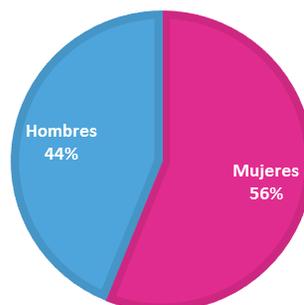


Figura 1. Población por género

9. Resultados

La gráfica que se muestra a continuación refleja el estatus nutricional general, se observa que el 22% de los participantes están debajo de su peso normal, 65% se encuentra dentro del peso normal, 10% ya presenta sobrepeso y el 3% obesidad.

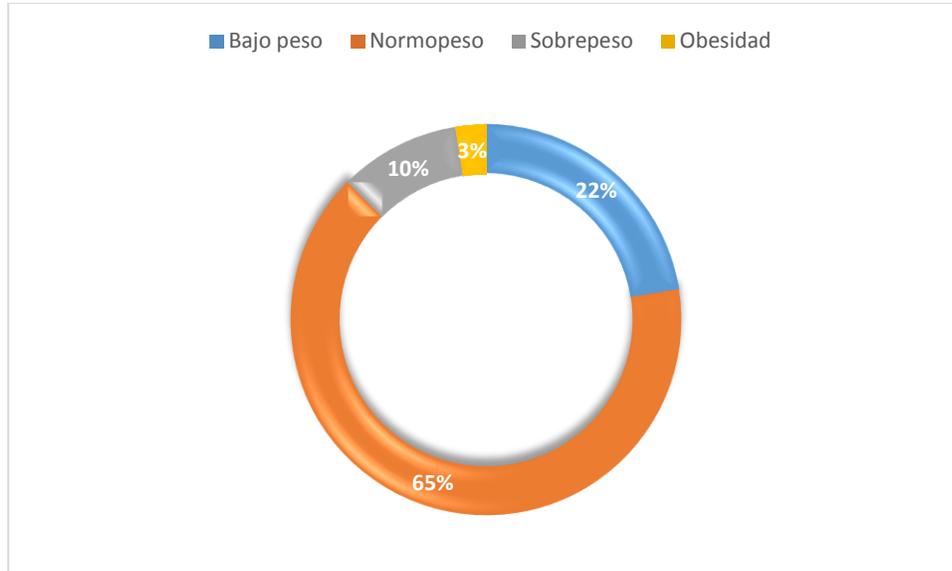


Figura 2. Estatus nutricional basado en el IMC

Dentro de los aspectos socioeconómicos se consideraron la fuente del agua que bebe el participante, si cuenta con drenaje y el tipo de mascota con la que tiene contacto.

Tabla 6b. Aspectos socioeconómicos

# Ctrl	Agua para beber	Drenaje	Mascota	#Ctrl	Agua para beber	Drenaje	Mascota
1s	Gn	Si	No	22s	Gn	Si	No
2s	Gn	Si	No	23s	Gn	Si	Perro
3s	Gn	Si	No	24s	Gn	Si	No
4s	Gn	Si	No	25s	Gn	Si	No
5s	Gn	Si	Perro	26s	Gn	Si	Otro
6s	Gn	Si	No	27s	Gn	Si	Otro
7s	Gn	Si	No	28s	Hv	Si	Gato, Perro

9. Resultados

8s	Gn	Si	No	29s	Hv	Si	No
9s	Hv	Si	No	30s	Gn	Si	No
10s	Gn	Si	Gato	31s	Gn	Si	No
11s	Gn	Si	No	32s	Gn	Si	Gato
12s	Gn	Si	Gato	33s	Gn	Si	No
13s	Gn	Si	Gato	34s	Gn	Si	No
14s	Gn	Si	No	35s	Gn	Si	No
15s	Gn	Si	No	36s	Gn	Si	No
16s	Gn	Si	Gato	37s	Gn	Si	Perro
17s	Gn	Si	No	38s	Gn	Si	No
18s	Gn	Si	No	39s	Gn	Si	No
19s	Gn	Si	No	40s	Gn	Si	No
20s	Gn	Si	No	41s	Gn	Si	No
21s	Gn	Si	Gato, Perro				

La figura 3 muestra el tipo de mascota con las que tienen contacto cada uno de los participantes, en este caso el que no tuvieran mascota fue la condición que prevaleció entre la población, seguido del grupo que tenía gatos con el 12%, los que tenían perro 7%, el 5% del grupo de aquellos que tenían ambas mascotas y así como los que tenían otro tipo de mascota (reptiles, roedores o peces).

9. Resultados

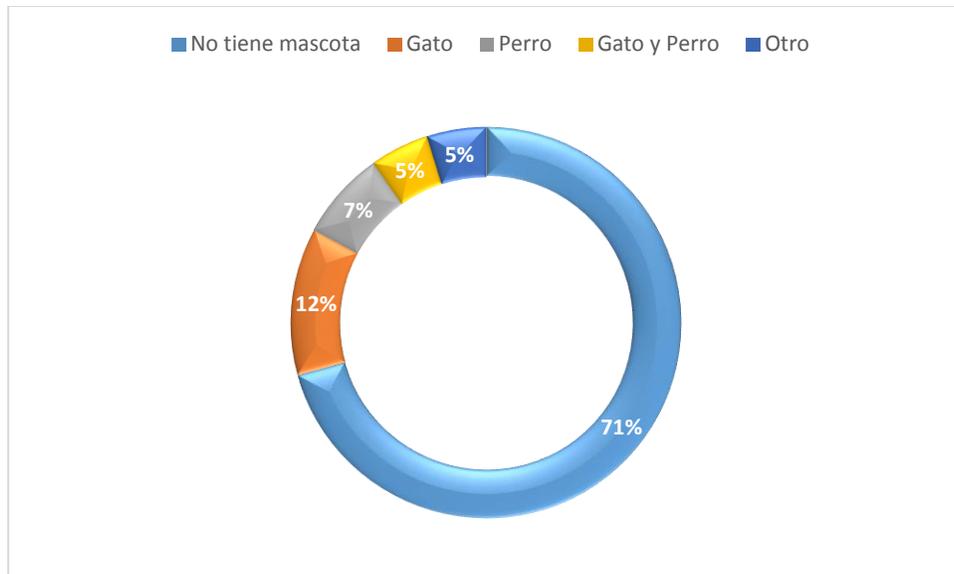


Figura 3. Mascota con la que convive el paciente.

De la población 92.6% toma agua purificada de garrafón (Gn) y solo el 7.4% consumen agua hervida (Hv).

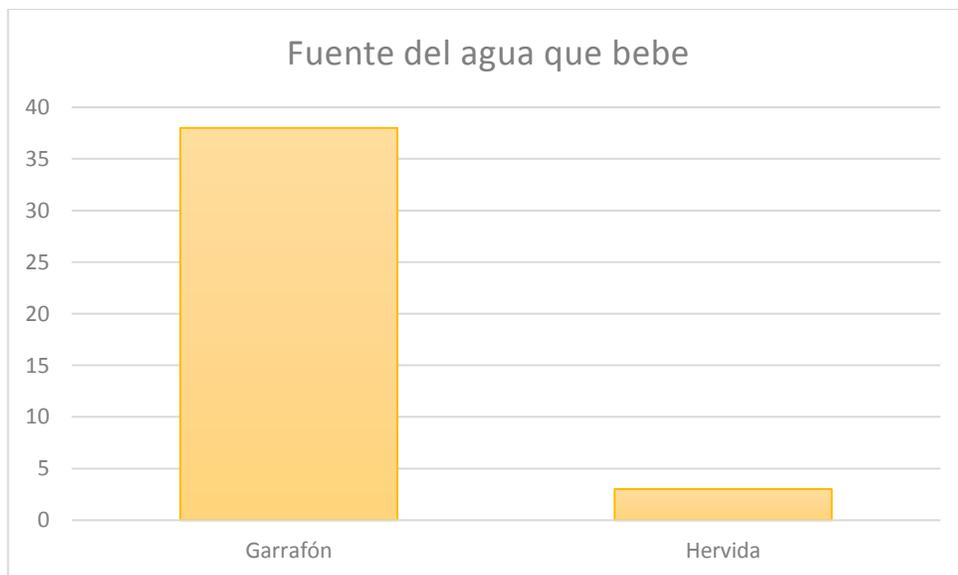


Figura 4. Fuente de agua para beber.

En los antecedentes familiares que reportaron los responsables legales de los participantes se encontraron Gastritis (Gs), Cáncer gástrico (Ca), Úlcera (U) y Dispepsia (D).

9. Resultados

En cuanto a los antecedentes personales también describieron dolor abdominal, en el epigastrio, con los alimentos, durante la noche, diarrea, vómito y reflujo.

Tabla 6c. Antecedentes personales y familiares de patologías gástricas.

# Ctrl	Familiares	Personales						
	Patología	Dolor				Diarrea	Vómito	Reflujo
		Abdominal	Epigastrio	Alimentos	Nocturno			
1s	NO	no	no	no	no	no	no	No
2s	Gs	no	no	no	no	no	no	No
3s	NO	no	no	no	no	no	no	No
4s	NO	no	no	si	no	si	no	No
5s	NO	no	no	no	no	no	no	No
6s	Gs	si	no	no	no	si	si	Si
7s	NO	no	no	no	no	no	no	No
8s	Gs	no	no	no	si	no	no	No
9s	NO	si	no	si	si	no	no	No
10s	NO	si	no	no	no	si	si	No
11s	Gs	no	no	no	si	si	si	No
12s	Gs	no	no	no	no	no	no	No
13s	NO	no	no	no	no	no	no	No
14s	Ca	no	no	no	no	si	si	No
15s	Gs	no	no	no	no	no	no	No
16s	NO	no	no	no	no	si	no	No
17s	NO	si	no	no	no	si	si	No
18s	NO	no	no	no	no	no	no	No
19s	Ca	si	no	no	no	no	no	No
20s	Gs	si	si	no	no	no	no	No
21s	NO	no	no	no	no	no	no	No
22s	NO	no	no	no	no	no	no	No
23s	U	no	no	no	no	no	no	No
24s	Gs	si	si	si	si	si	si	Si
25s	NO	no	no	no	no	si	no	No
26s	NO	no	no	no	no	no	no	No
27s	NO	no	no	no	no	no	no	No
28s	D	no	no	no	no	si	si	Si

9. Resultados

29s	NO	si	no	no	si	n0	no	No
30s	Gs	no						
31s	Gs	no						
32s	Gs	no						
33s	NO							
34s	NO							
35s	NO	no	no	no	no	si	no	No
36s	Gs	no	no	no	no	si	no	No
37s	NO							
38s	NO	no	no	no	no	si	no	No
39s	NO							
40s	NO							
41s	NO							

Entre los participantes los antecedentes familiares que más prevalencia tuvo fue la gastritis (12 participantes), seguido del cáncer gástrico (2), úlcera y dispepsia con un participante, no obstante, más de la mitad de la población (25 participantes) no tuvo antecedentes de estas patologías.

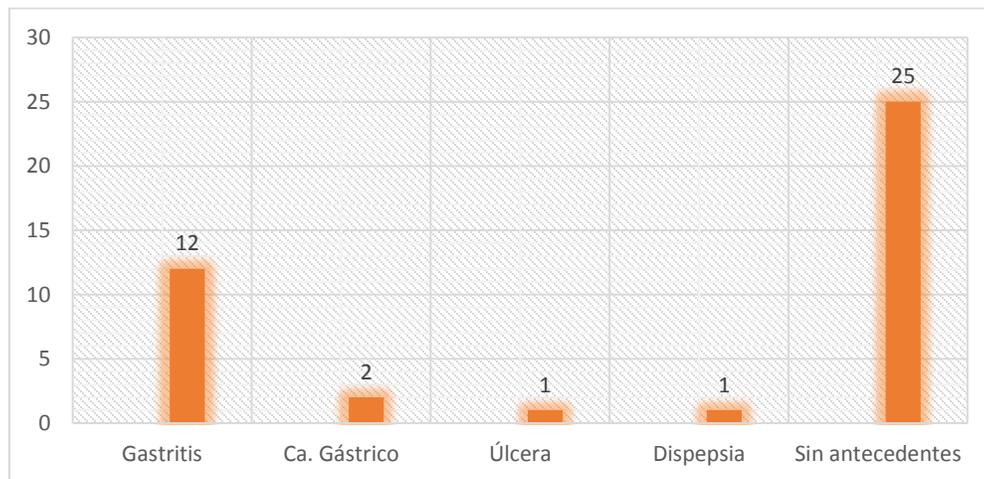


Figura 5. Antecedentes familiares

La mayoría de los niños (21) no reportó síntomas, seguido de diarrea en 13 de ellos, dolor abdominal, vomito, dolor nocturno, dolor con los alimentos y reflujo reportado por 3 en ambos síntomas y por último 2 con dolor en el epigastrio.

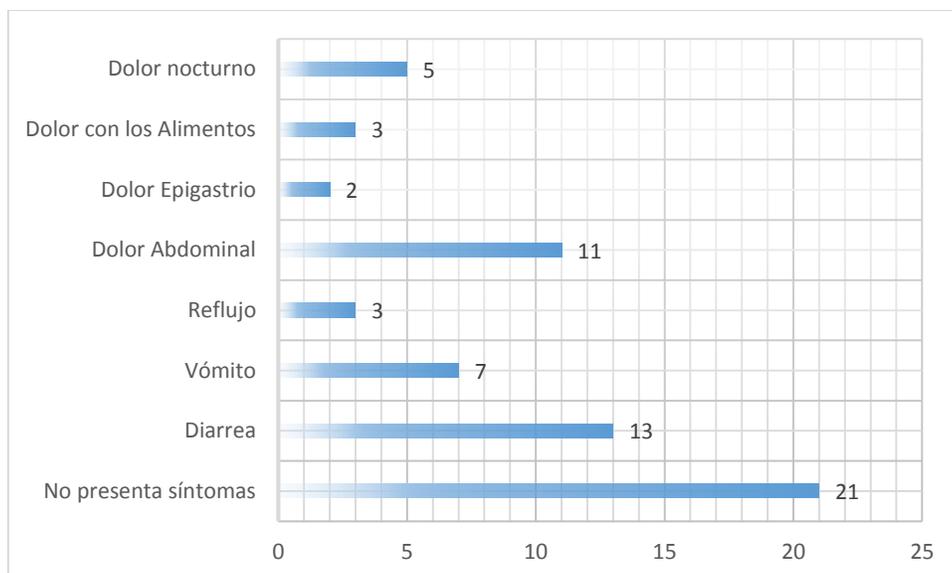


Figura 6. Antecedentes personales

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA PARA LA CEPA TIPO *H. pylori* ATCC 43504.

Se logró obtener DNA de la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504 con la técnica de fenol-cloroformo.

Al cuantificar y verificar la pureza del material se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de DNA para la cepa tipo de *H. Pylori* ATCC 43504

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μL)	RELACIÓN 260/280
Ctrl +	66.66	1.87

ESTANDARIZACIÓN MgCl₂ PARA LA CEPA TIPO *H. pylori* ATCC 43504.

La figura 7 muestra la concentración de MgCl₂ óptima para la PCR de la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504.

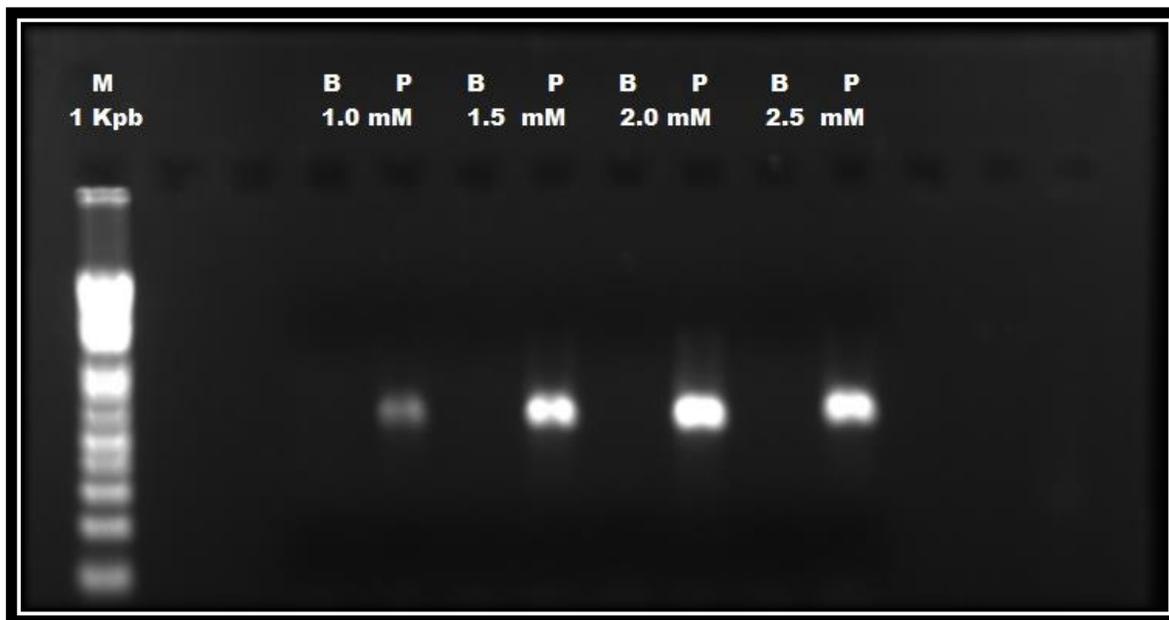


Figura 7. Concentración óptima de $MgCl_2$. En la imagen se observa el marcador de peso molecular de 1Kpb (M), blanco de reactivo (B) y muestra de la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504 (P). Tres de las cuatro concentraciones probadas son útiles para amplificar el fragmento, con la finalidad de optimizar los reactivo se eligió la concentración 1.5 mM como óptima a la que se obtiene el amplificado.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO PARA LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA DE LA CEPA TIPO *H. pylori* ATCC 43504.

Utilizando la concentración óptima de la reacción se obtuvieron las condiciones de la PCR para la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504 con el objetivo de optimizarla empleando la TM adecuada quedando de la siguiente manera:

Tabla 8. Condiciones de PCR para establecer temperatura de alineamiento óptima.

Reactivo	Volumen (μL) para 25 μL	Concentración final
Buffer de PCR (Invitrogen®) 10X	2.5	1X
dNTP's 2Mm	2.5	0.2mM
MgCl ₂ (Invitrogen®) 50mM	1.5	1.5mM
Cebador sentido 10 μM	2.5	1 μM
Cebador antisentido 10 μM	2.5	1 μM
Agua inyectable	cbp	---
Taq. DNA polimerasa platinum 5U/ μL	0.05	0.01U/ μL

En la figura 8 se aprecia la estandarización de la temperatura de alineamiento para la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504.

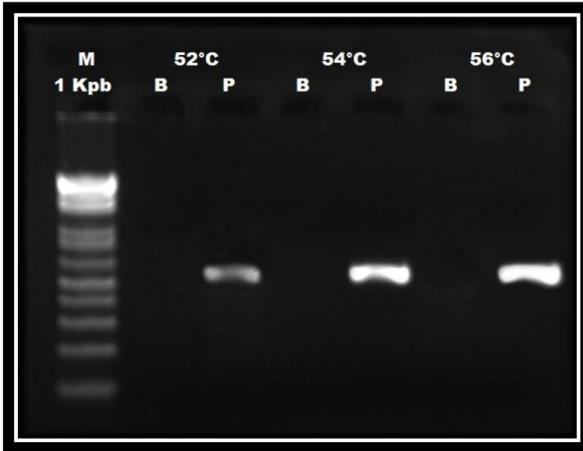


Figura 8. Estandarización de T_M para la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504. Se observa que pese a que tanto a la temperatura de 52°C como a 54°C la reacción ocurre exitosamente, no obstante, la banda a 54°C (Temperatura de alineamiento teórica), es más intensa por lo que se eligió esa temperatura como óptima. En cuanto a 56°C se descartó por requerir mayor temperatura.

DIAGNÓSTICO Y PREVALENCIA

Para establecer el diagnóstico como ya se mencionó previamente se llevó a cabo la PCR en 41 muestras de las cuales, se presentan las series en las que se observaron 4 resultados positivos a la infección. La prevalencia obtenida fue de 9.75% de la población.

9. Resultados

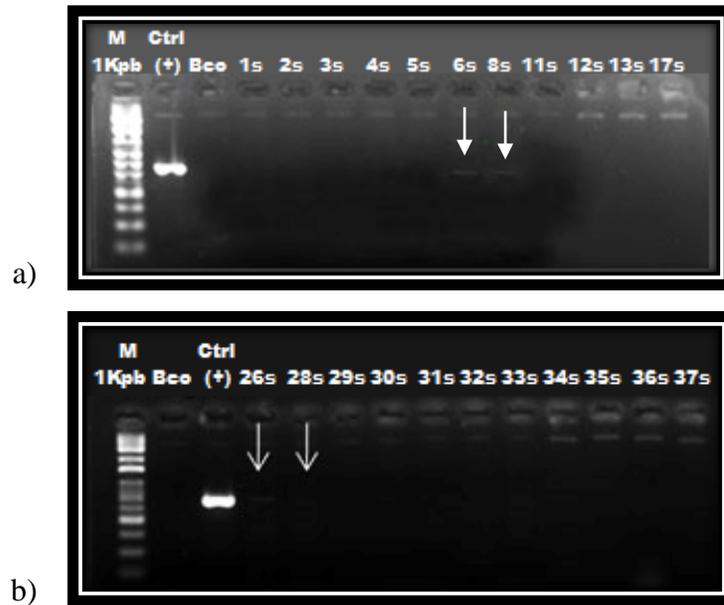


Figura 9. Amplificación del fracción ribosomal 16S de *H. pylori* en muestras clínicas. Las flechas indican las muestras positivas a la infección por *H. pylori*. En las imágenes se puede observar en el carril M correspondiente al marcador de peso molecular (1Kpb), Bco: blanco de reactivo, Ctrl (+), los carriles restantes pertenecen a las muestras analizadas.

En la prueba piloto se obtuvieron 4 resultados positivos de estos dos de sexo femenino y dos de sexo masculino, cabe señalar que tres de estas se obtuvieron en la reamplificación del producto de PCR.

Tabla 9. Resultados de la PCR en las muestras clínicas.

# Ctrl	PCR 16S		# Ctrl	PCR 16S	
	Amplificación	Reamplificación		Amplificación	Reamplificación
1s	-	-	22s	-	-
2s	-	-	23s	-	-
3s	-	-	24s	-	-
4s	-	-	25s	-	-
5s	-	-	26s	-	+
6s	-	+	27s	-	-
7s	-	-	28s	+	+
8s	-	+	29s	-	-
9s	-	-	30s	-	-
10s	-	-	31s	-	-

9. Resultados

11s	-	-	32s	-	-
12s	-	-	33s	-	-
13s	-	-	34s	-	-
14s	-	-	35s	-	-
15s	-	-	36s	-	-
16s	-	-	37s	-	-
17s	-	-	38s	-	-
18s	-	-	39s	-	-
19s	-	-	40s	-	-
20s	-	-	41s	-	-
21s	-	-			

En la figura 10 se observa que la prevalencia de la infección entre la población fue de aproximadamente el 10% (9.75%), este porcentaje se encuentra equilibrado entre niños y niñas con un incremento entre los niños de 5 años (2 muestras positivas).



Figura 10. Resultados PCR para la detección de *H. pylori*.

Tabla 10. Datos globales de las muestras positivas a la infección mediante PCR

#Ctrl	Edad	Sexo	Somatometría				Socioeconómicos			
			Peso (Kg)	Talla (m)	IMC	Percentiles	Agua	Drenaje	Mascota	Mascota
6s	3	M	13.5	0.97	14.34	5	Gn	Si	No	No
8s	4	F	15	1.05	13.6	3	Gn	Si	No	No
26s	5	F	16.5	1.04	15.25	53	Gn	Si	Otro	Otro
28s	5	M	16.5	1.1	13.63	3	Hv	Si	Gato y perro	Gato y perro
#Ctrl	Familiares		Personales				Personales			
	Patología	Dolor	Diarrea	Vómito	Reflujo	Dolor	Alimentos	Nocturno	Dolor	Alimentos
6s	Gs	no	si	no	no	no	si	Si	Si	si
8s	Gs	no	no	no	no	si	No	No	No	no
26s	No	no	no	no	no	no	No	No	No	no
28s	D	no	no	no	no	no	Si	Si	Si	si

Gn: Agua de Garrafón; Hv: Agua hervida; Gs: Gastritis; D: Dispepsia; No: No tiene o no presenta el factor analizado

∞ TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico se realizó mediante el programa GraphPad InStat® versión 3.10., utilizando la prueba X^2 .

∞ SEXO

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 1.0000, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

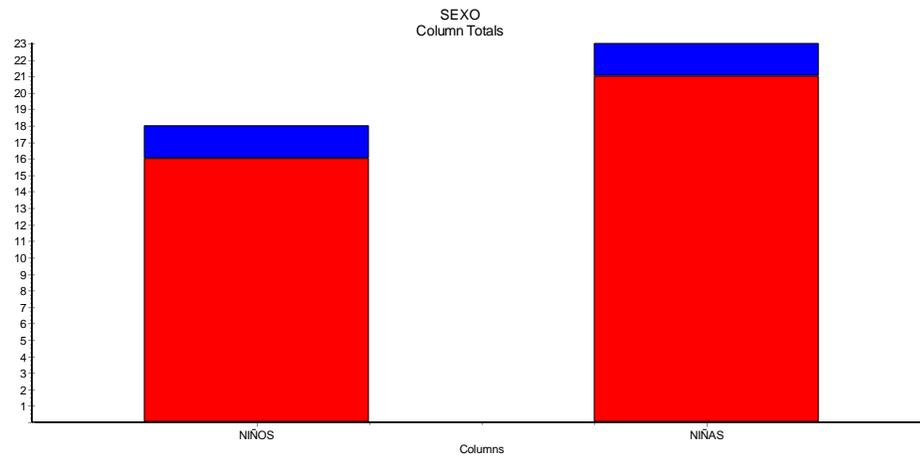
Odds Ratio

Odds ratio= 1.313

95% Confidence Interval: 0.1664 to 10.355 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ SEXO	NIÑOS	NIÑAS	TOTAL
POSITIVOS	2 (5%)	2 (5%)	4 (10%)
NEGATIVOS	16 (39%)	21 (51%)	37 (90%)
TOTAL	18 (44%)	23 (56%)	41 (100%)



* * *

IMC BAJO PESO Y NORMOPESO

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0.1053, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

Odds Ratio

Odds ratio= 8.333

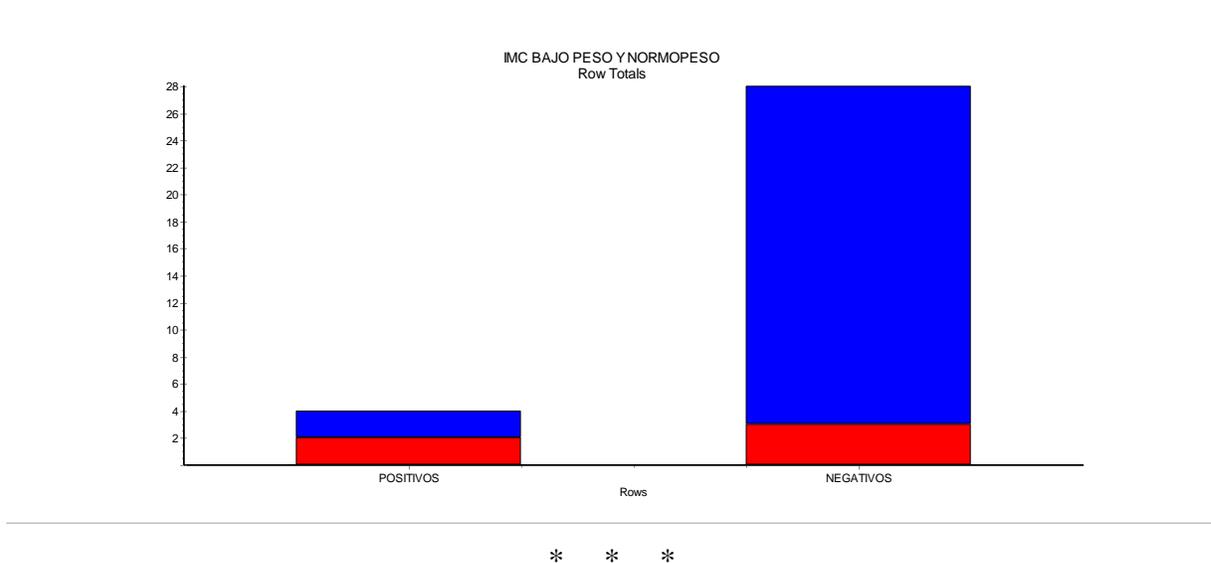
95% Confidence Interval: 0.8376 to 82.905 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	BAJO PESO	NORMOPESO	TOTAL
POSITIVOS	2 (6%)	2 (6%)	4 (13%)
NEGATIVOS	3 (9%)	25 (78%)	28 (88%)
TOTAL	5 (16%)	27 (84%)	32 (100%)

9. Resultados

Para este análisis no se consideraron los datos referentes a sobrepeso (4 pacientes o 9.75%), y obesidad (5 pacientes o 12.19%), al no presentar datos compatibles con el análisis ya que todos estos pacientes obtuvieron un resultado negativo para la PCR.



🔗 HACINAMIENTO

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 1.0000, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

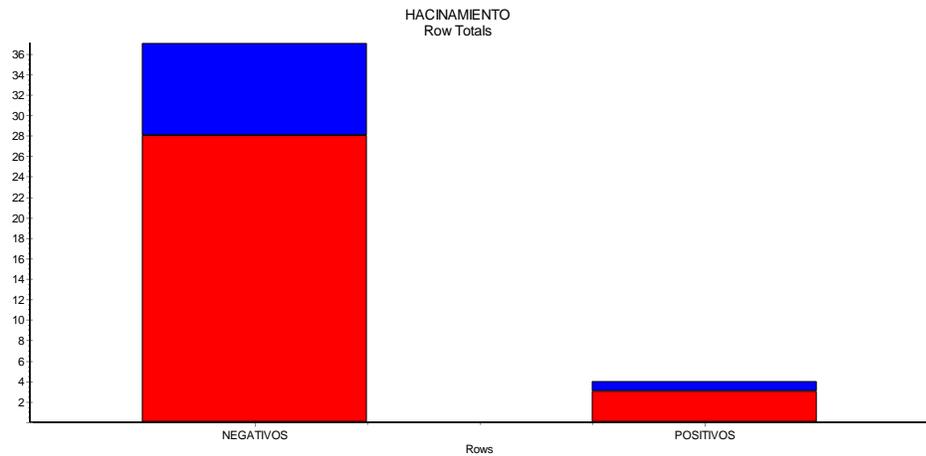
Odds Ratio

Odds ratio= 1.037

95% Confidence Interval: 0.09549 to 11.263 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	HACINAMIENTO	NO HACINAMIENTO	TOTAL
POSITIVOS	28 (68%)	9 (22%)	37 (90%)
NEGATIVOS	3 (7%)	1 (2%)	4 (10%)
TOTAL	31 (76%)	10 (24%)	41 (100%)



* * *

AGUA PARA BEBER

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0.2711, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

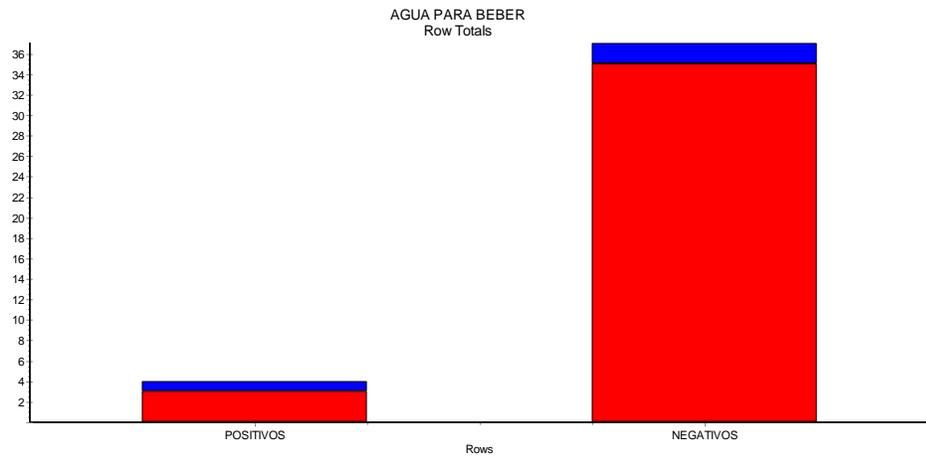
Odds Ratio

Odds ratio= 0.1714

95% Confidence Interval: 0.01181 to 2.488 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	GARRAFÓN	HERVIDA	TOTAL
POSITIVOS	3 (7%)	1 (2%)	4 (10%)
NEGATIVOS	35 (85%)	2 (5%)	37 (90%)
TOTAL	38 (93%)	3 (7%)	41 (100%)



* * *

🐾 MASCOTA

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0.5670, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

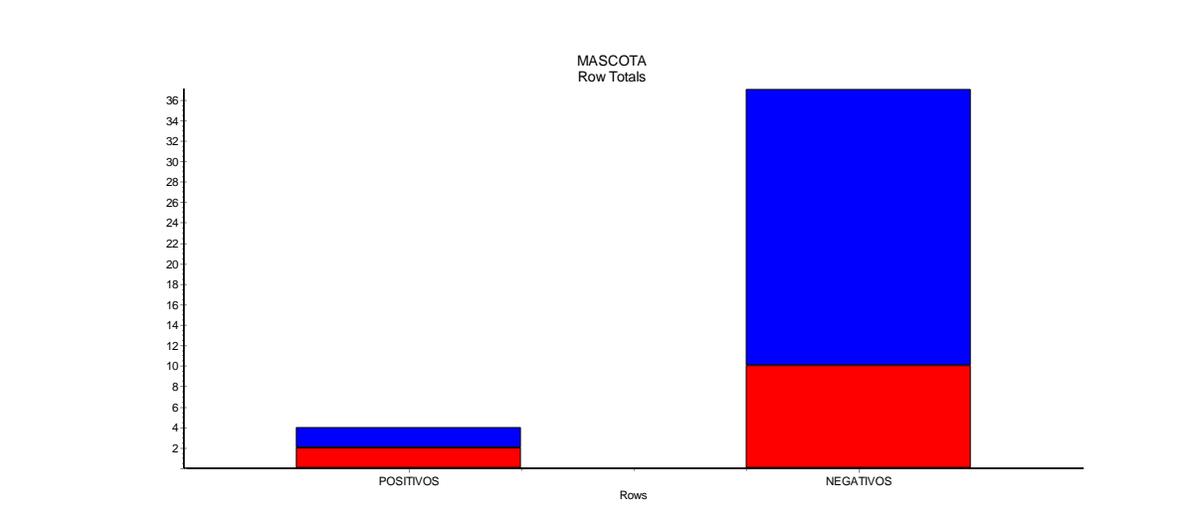
Odds Ratio

Odds ratio= 2.700

95% Confidence Interval: 0.3338 to 21.839 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	SI	NO	TOTAL
POSITIVOS	2 (5%)	2 (5%)	4 (10%)
NEGATIVOS	10 (24%)	27 (66%)	37 (90%)
TOTAL	12 (29%)	29 (71%)	41 (100%)



* * *

☞ ANTECEDENTES FAMILIARES DE ENFERMEDADES GÁSTRICAS

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0.2811, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

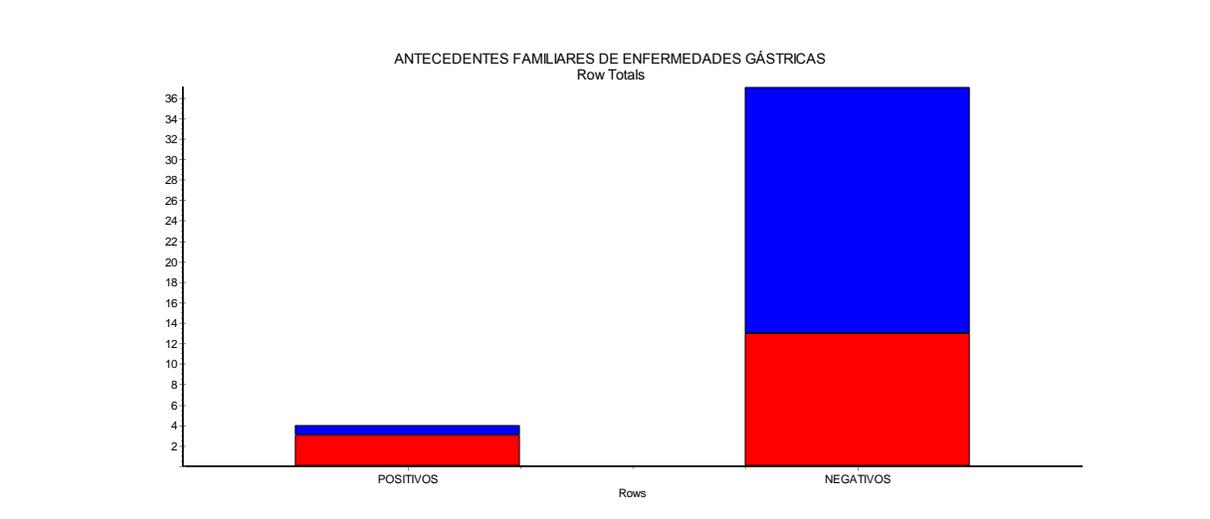
Odds Ratio

Odds ratio= 5.538

95% Confidence Interval: 0.5218 to 58.790 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	C/ ANTECEDENTES	S/ ANTECEDENTES	TOTAL
POSITIVOS	3 (7%)	1 (2%)	4 (10%)
NEGATIVOS	13 (32%)	24 (59%)	37 (90%)
TOTAL	16 (39%)	25 (61%)	41 (100%)



* * *

☞ ANTECEDENTES PERSONALES DE ENFERMEDADES GÁSTRICAS

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0.3030, considered not significant. The row/column association is not statistically significant.

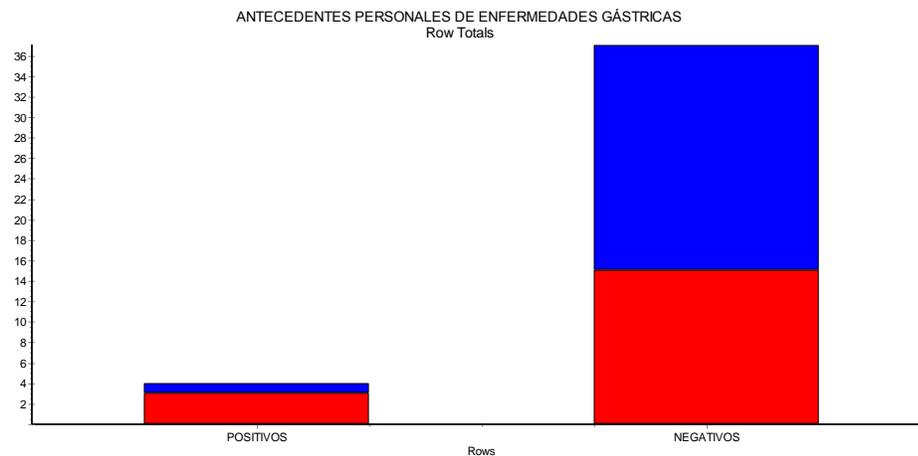
Odds Ratio

Odds ratio= 4.400

95% Confidence Interval: 0.4167 to 46.460 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

GRUPO/ FACTOR	C/ ANTECEDENTES	S/ ANTECEDENTES	TOTAL
POSITIVOS	3 (7%)	1 (2%)	4 (10%)
NEGATIVOS	15 (32%)	22 (54%)	37 (90%)
TOTAL	18 (44%)	23 (56%)	41 (100%)



* * *

De acuerdo con el análisis estadístico se observa que ninguno de los parámetros analizados tiene relación con la infección.

☞ VERIFICACIÓN DE SECUENCIA

A continuación se muestra el electroferograma obtenido del análisis de la secuencia obtenido mediante el programa Bioedit. V7.2.5 de distribución libre, el cual permite visualizar la secuencia de forma gráfica identificando mediante colores diferentes a cada uno de los nucleótidos que lo componen.

9. Resultados

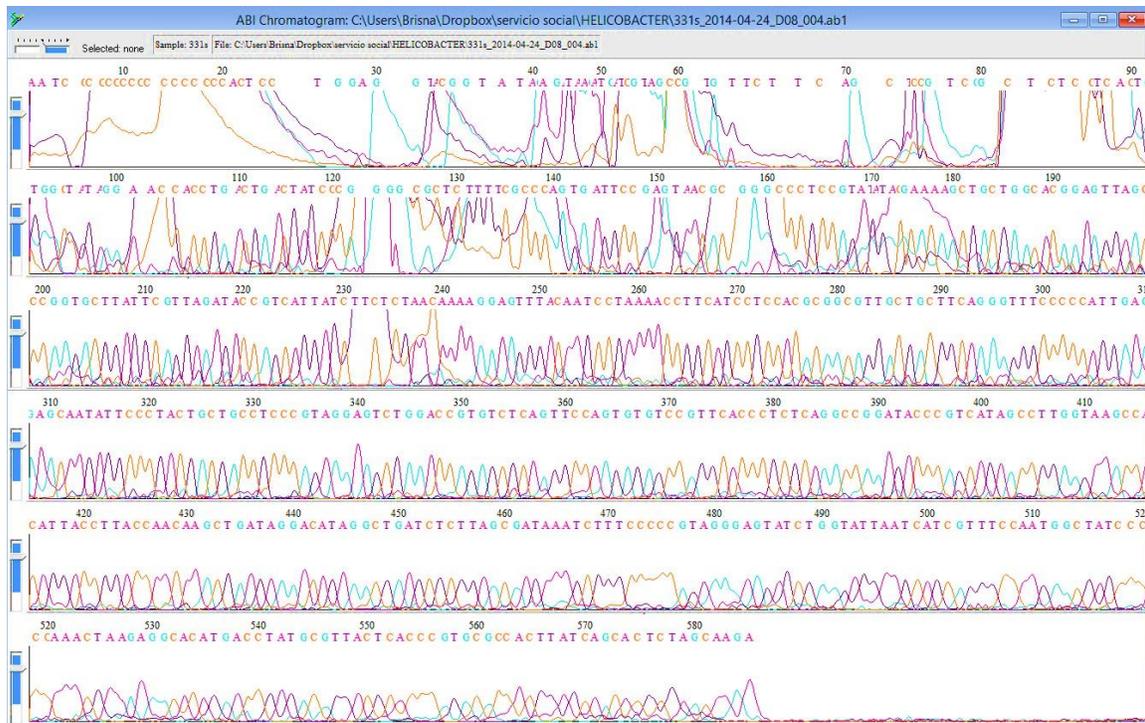


Figura 11. Electroferograma de la secuencia obtenida mediante Bioedit v7.2.5. En la imagen se observa la secuencia como la presenta el programa Bioedit v7.2.5. En la parte superior de la figura se pueden apreciar los datos de la muestra así como el inicio de la secuencia y en la última fracción se nota el final de la secuencia.

Como ya se mencionó la secuencia en formato FASTA se obtuvo para poder llevar a cabo el alineamiento.

```
Untitled Text
>331s
AATCCCCCCCCCCCCCCCCACTCCTGGAGGTACGGTATAGAGATAAGAT
GATCGTAGCCGTTCTTCAGCTCCGTCGGCTCTCCTCACTGGCTATAGG
AACCACCTGACTGACTATCCCGGGGCGCTCTTTTCGCCAGTGATCCGA
GTAAACGGGGCCCTCCGTATATACGAAAAGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC
GGTGCTTATTCGTTAGATACCGTCATTCTCTCTAACAAAAGGAGTTT
ACAAATCCTAAAACCTTCATCCTCCACGGCGTTGCTGCTCAGGGTTTC
CCCCATTGAGCAATATTCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG
TGTCCTCAGTCCAGTGTGTCGGTTCACCCCTCTCAGGCCGGATACCCGTC
TAGCCTTGGTAAGCCATTACCTTACCAACAAGCTGATAGGACATAGGCTG
ATCTCTTAGCGATAAATCTTTCCCCCGTAGGGAGTATCTGGTATTAATCA
TCGTTTCCAATGGCTATCCCAAATAAGAGGCACATGACCTATGCGTTAC
TCACCCGTGCGCCACTTATCAGCACTTAGCAAGA
```

Figura 12. Secuencia en formato FASTA obtenida mediante el programa Bioedit v7.2.5

9. Resultados

Una vez en BLAST, se introdujo la secuencia y tras unos segundos fue posible observar los datos de la secuencia, gráficos y tablas propias del alineamiento con las secuencias significativamente similares.

331s sequence exported from 331s_2014-04-24_D08_004.ab1

RID [VUKPSW2E01R](#) (Expires on 07-10 22:16 pm)

Query ID |c|227033
 Description 331s sequence exported from 331s_2014-04-24_D08_004.ab1
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 585

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.2.29+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Figura 13. Datos de la secuencia de consulta generada con la herramienta de alineamiento BLAST.

Al realizar el alineamiento de la secuencia obtenida mediante BLAST se obtienen los siguientes resultados:

En BLAST se obtiene una tabla que contiene todos los alineamientos significativos.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Helicobacter pylori J166 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	CP007603.1
Helicobacter pylori oki422 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	CP006824.1
Helicobacter pylori oki112 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	CP006821.1
Helicobacter pylori oki102 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	CP006820.1
Helicobacter pylori UM037 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	CP005492.2
Helicobacter pylori strain J166_286 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	KC311709.1
Helicobacter pylori strain J166_035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	KC311710.1
Helicobacter pylori strain J166_314 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	KC311707.1
Helicobacter pylori strain J166_315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	KC311708.1
Helicobacter pylori strain H9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	JX455160.1
Helicobacter pylori isolate WE64a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	HM046432.1
Helicobacter pylori B8 complete genome	797	1594	82%	0.0	97%	FN598874.1
Helicobacter pylori B38 complete genome, strain B38	797	1594	82%	0.0	97%	FM991728.1
Helicobacter pylori strain 311A-160209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	FJ788640.1
Helicobacter pylori strain ATCC 43504 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	797	797	82%	0.0	97%	NR_044761.1
Helicobacter pylori strain LPB 258-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	AY593988.1
Helicobacter pylori strain Lit76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	AF535197.1
Helicobacter pylori strain Sal05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	AF535194.1
Helicobacter pylori strain ATCC 43504 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	NR_114587.1
Helicobacter pylori strain PA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	AY366424.1
Helicobacter pylori strain PA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	797	797	82%	0.0	97%	AY366423.1

Figura 14. Secuencias con alineamiento significativo. En esta tabla se describe brevemente los alineamientos producidos entre secuencias con la que se evalúa. La columna Max score indica qué tan bien las secuencias comparadas empujan. La columna Total score realiza una sumatoria de todas las

9. Resultados

regiones que empatan entre la secuencia seleccionada y la de consulta, incluyendo las porciones no contiguas. *Query coverage* indica el porcentaje de la secuencia de consulta que se incluye en el segmento del alineamiento. El *E- value* o *Expect value* es igual al número de secuencias que se espera encontrar en una base de datos compuesta completamente de secuencias al azar, este valor está influenciado por el número de secuencias que componen la base de datos y la longitud de la secuencia de consulta. La *identidad* corresponde a la coincidencia de una secuencia seleccionada con el porcentaje más alto de bases idénticas [Porter, 2014].

En la primera porción de los resultados se encuentra un a gráfica que de acuerdo al código de colores, inicia en el color negro significa que es poca la similitud entre la secuencia consultada y la del alineamiento significativo, hasta llegar a rojo con una elevada significancia entre ambas secuencias.

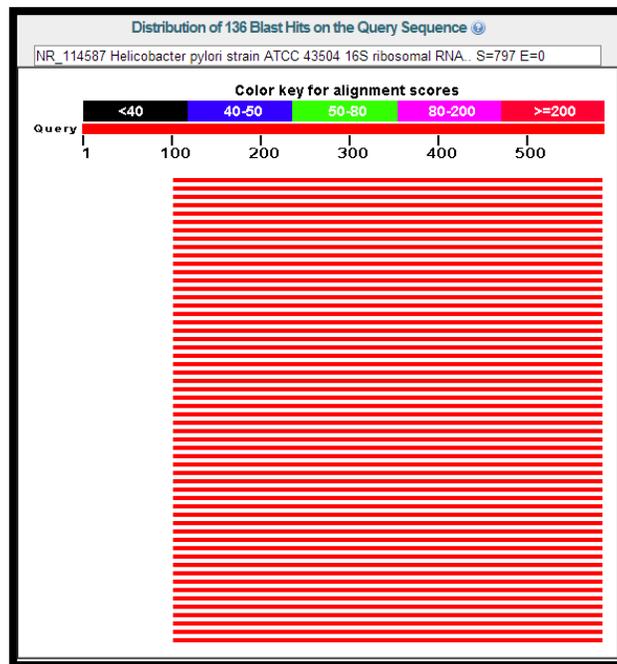


Figura 15. Gráfico del alineamiento de las secuencias con semejanza significativa.

A continuación se muestra un ejemplo de alineamiento significativo, se eligió debido a que corresponde al de la cepa empleada en la estandarización de la reacción de PCR.

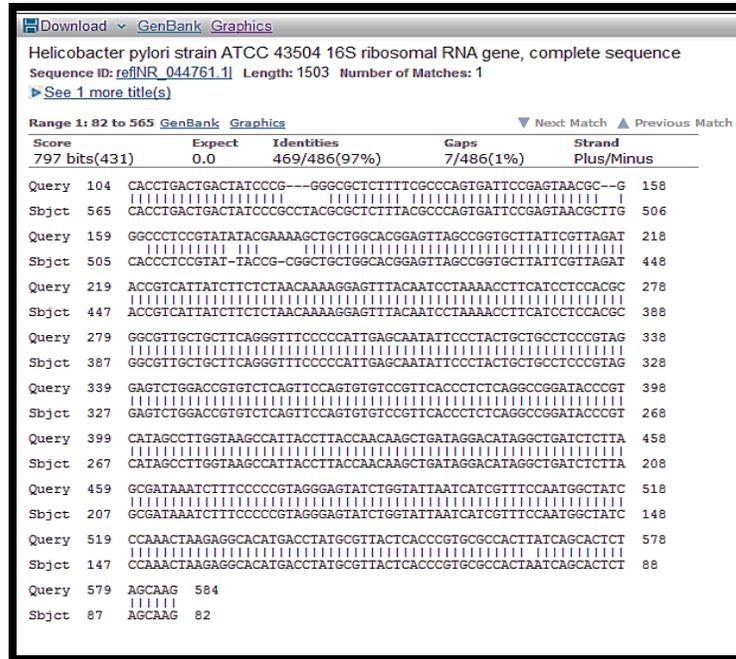


Figura 16. Alineamiento entre la secuencia seleccionada y la secuencia consultada.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La infección por *H. pylori* está etiológicamente relacionada a la gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. Para su diagnóstico se han desarrollado muchos métodos tanto invasivos como no invasivos. En estudios clínicos, un diagnóstico positivo requiere que el cultivo o pruebas indirectas como histología y la prueba del aliento con urea cumplan con esta condición. En el presente estudio se evaluó la infección por *H. pylori* en niños. Debido a que es adquirida en la niñez, los datos solicitados a los representantes legales de cada uno de los participantes tienen relación con características antropométricas, condiciones de la casa habitación y antecedentes patológicos tanto personales como familiares.

Inicialmente se procedió a obtener el índice de masa corporal (IMC) con la finalidad de determinar el estado nutricional de cada uno de los participantes. El IMC es de relevancia debido a que en la infección por *H. pylori* en niños se ha registrado como causa de bajo peso y talla. De la población, el 66% se encontró dentro del peso normal de acuerdo con la gráfica de percentiles definida por sexo y rangos de edad del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Con respecto a las muestras que resultaron positivas a la infección, dos de ellas se encontraron en el estado de bajo peso con 4 y 3 percentiles, de acuerdo con este parámetro, esta condición se puede asociar con la infección. En un estudio Vilchis y cols., encontraron asociación entre la infección y el peso bajo en comparación con niños control en donde la relación se fue modificando con la edad ya que observó que en los niños más grandes los efectos eran mayores. Tal parecería que la presencia de la bacteria tiene un efecto directo sobre el estado nutricional, no obstante, el análisis estadístico definió la no asociación de la infección con dicho parámetro. Otros de los participantes con resultado negativo a la PCR también obtuvieron valores menores de 5 percentiles (bajo peso), en estos casos se debe tener cuidado al interpretar este dato pues para leer un percentil 4 ó 3, se establece que el 3 ó 4 % de los niños normales exhiben un peso menor al promedio, sin embargo es importante diferenciar si es normal o como consecuencia de algún trastorno, esto lo evalúan los pediatras mediante la actividad, el aspecto o en casos en los que el niño ha comenzado a bajar de peso o se ha detenido el mismo cuando previamente era normal [Garrido, 2014]. En el otro extremo, de acuerdo con Fialho y colaboradores (2007) reportó que aun cuando los niños se encuentren dentro del rango normal de percentiles se debe considerar como un efecto secundario de la infección estudiando niños

de 8 años que obtuvieron valores menores a 25 percentiles caso que se observó en uno de los participantes positivos, ubicado en 17 percentiles y que aunque no es muy significativo, está por debajo del percentil esperado que es de 50 [Perry y cols, 1997].

Incluso con el gran número de estudios realizados en la relación de este microorganismo con el hospedero, no se tiene bien identificado el mecanismo por el cual afecta el crecimiento, aunque desde 1994 Patel y colaboradores reportaron que la causa del bajo peso en niños infectados puede ser la dispepsia, así como también la hipoclorhidria con la subsecuente pérdida de la barrera del estómago facilitando la colonización de otras bacterias en el intestino produciendo en consecuencia cuadros diarréicos.

Para estudios posteriores se sugiere considerar en este tipo de población la capacidad captación de hierro de las cepas, esto debido a que se han encontrado algunas con una mejor capacidad de captación de hierro del hospedero en comparación con pacientes que no presentaron cepas con tal característica, siendo así una causa de la anemia ferropénica. Una de las posibles explicaciones propuestas es la unión de la bacteria a la transferrina cuya función es la de transportar hierro a través de la sangre y también es un marcador del estado nutricional del paciente, otra es el secuestro de la proteína ferritina que sirve como almacén de hierro, y la quelación de la lactoferrina todas ellas presentes en la mucosa gástrica, por lo que sugiere una de las principales sustancias que consume el microorganismo del hospedero [Payne et al, 1993; Weinberg, 2009; Tan et al, 2011].

Por lo que respecta a los aspectos socioeconómicos que principalmente tienen relación con la transmisión de la bacteria entre la población en general. Un estudio que apoya la transmisión persona-persona es el desarrollado por Cervantes y cols. En el cual indicó que la transmisión ocurre en la misma casa primero se da la infección del hermano mayor y posteriormente la del menor en la cual se incrementa la velocidad de infección cuando se llevan menos de 4 años entre ellos. De igual forma Kivi y colaboradores desde el año 2000 reportaron que las cepas eran compartidas con mayor frecuencia entre madres e hijos que entre otros familiares de primer o segundo grado.

Otros elementos analizados en este estudio que tienen relación directa son la fuente de agua para beber y la presencia de drenaje ya que se ha demostrado que en países en vías de desarrollo como lo es México, con bajo nivel socioeconómico y con manejo inadecuado del

agua para beber es más elevada la infección con un valor mayor al 80% indicando de esta manera una fuente de transmisión fecal-oral, la falta de saneamiento de la misma o de mantenimiento en la tubería por la que se transporta (Nourai et al, 2009). Con respecto a la población se puede apreciar en la figura 4 que el 93% de los participantes bebe agua de garrafón y el 7% lo hace después de hervirla pese a estos datos, no se puede implicar una disminución o un aumento en el riesgo de infección consumir el agua municipal aunque está considerada como una probable fuente de la infección desde 1991, además porque se ha reportado que la bacteria puede sobrevivir en las redes de agua que abastecen la ciudad de México [Klein et al, 1991; Torres et al, 2008]. Al igual que el agua para beber, la ausencia de drenaje se estableció como fuente de infección al incrementarla contribuyendo a la posible vía de infección fecal- oral. Si bien ya se ha comprobado la disminución del riesgo para contraer la infección con la presencia de drenaje en las casas de la población estudiada, es importante resaltar que no se encontró una relación directa en esta investigación pues el 100% de la población contaba con el servicio [Klein et al, 1991; Percival & Williams, 2014].

Para este estudio también se tomó en cuenta que los participantes tuvieran mascotas en su hogar principalmente gatos y perros. Específicamente *H. pylori* ha sido aislada de gatos [Percival & Williams, 2014]. Por tal razón se consideró para la investigación, sin embargo, los reportes anteriores son contradictorios pues en algunos ensayos la han encontrado presente en gatos domésticos contraponiéndose con otros reportes en los que indican la inexistente relación entre la infección y la presencia de mascotas [Percival & Williams, 2014; Oleastro et al, 2011]. De los casos positivos sólo uno de ellos tiene gato y perro simultáneamente lo que confirmaría una relación nula relación entre la presencia de mascotas y el incremento del riesgo de infección. Cabe mencionar que el 71% de la población no tenía mascotas cuando se aplicó el cuestionario.

En cuanto a los antecedentes patológicos se observó lo siguiente. Los antecedentes familiares considerados en el cuestionario incluían a los familiares de primer y segundo grado con los niños, entre las enfermedades reportadas están gastritis, dispepsia, úlcera y cáncer gástrico. Para las cuatro muestras positivas, tres de ellas tuvieron antecedentes, dos de gastritis, y otro de dispepsia. A la fecha se sabe que la transmisión persona-persona tiene un patrón en los malos hábitos higiénicos siendo la fuente más importante de contagio a la relación intrafamiliar [Demirel et al, 2013], no obstante se ha reportado que el hábito de compartir los alimentos con

los mismos cubiertos durante la comida en familia contribuye al incremento de la infección [Vaira et al, 2001].

Particularmente tres de los participantes positivos a la PCR presentaron síntomas desde dolor abdominal o nocturno hasta diarrea, vómito o reflujo, siendo estos característicos de la infección derivadas de la hipoclorhidria causando dolor [Vilchis et al, 2009]. Sin embargo, Ghorbani-Dalini y colaboradores reportaron que tanto la severidad como la presentación clínica de síntomas dependen de la carga bacteriana, también reporta que mientras la carga va incrementándose en la mucosa gástrica, los primeros síntomas que ocurren son dolor, anorexia, pesadez después de comer, sensación de llenura antes de tiempo, náuseas y /o flatulencia. Asimismo incluyen vómito y reflujo al incrementarse la carga a 10^4 . Después, cuando la colonización alcanza las 10^5 bacterias se observa el primer grado de la enfermedad en el que se induce la inflamación seguida de lesiones y en consecuencia la gastritis aguda desembocando en una etapa crónica al llegar a las 10^6 [Ghorbani-Dalini et al, 2014]. Pese a que el 75% de los casos positivos tuvo síntomas, otros participantes también los indicaron dentro de sus antecedentes por lo que al llevar a cabo el análisis estadístico se concluyó que no se relacionan los síntomas con la infección, no obstante se deben considerar como marcadores en el futuro del paciente.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método *in vitro* para la amplificación de DNA que se basa en la replicación del DNA el cual ocurre durante la fase S del ciclo celular. Básicamente la PCR consiste en tres pasos: la desnaturalización térmica tanto del DNA diana como de los cebadores, luego el alineamiento de ellos con el DNA diana, y la extensión de los cebadores alineados por la DNA polimerasa. Los tres pasos del ciclo se repiten un determinado número de veces, cada vez duplicando el número de moléculas producidas [Lo & Chan, 2006]. De acuerdo con Sachse (2003), esta técnica es mucho más rápida en comparación con otras técnicas convencionales indicadas para microorganismos patógenos de crecimiento lento, o que son difíciles de cultivar fuera del hospedero, esto coloca a la PCR como una alternativa viable para demostrar la presencia de *H. pylori* que, como ya se mencionó anteriormente es un agente patógeno con dichas características.

Experimentalmente se obtuvo la concentración 1.5 mM de $MgCl_2$, el uso de esta sustancia se basa en que de manera natural las enzimas polimerasas de DNA son dependientes

de la presencia de cationes divalentes libres para su actividad que en la reacción de PCR habilita la formación de nuevo enlaces fosfodiéster y la síntesis de la cadena de DNA así como su interacción con el grupo OH-3' del cebador. Este ion divalente también estabiliza la estructura por su unión al fosfato del esqueleto del azúcar del DNA plantilla [Slack, Low, Kaminski & Yirrel, 2011]. Determinar la concentración óptima de magnesio se llevó a cabo con la finalidad de conseguir el balance entre la sensibilidad y especificidad de la reacción presentada para diagnosticar *H. pylori* en niños. Se debe cuidar la concentración de cationes divalentes ya que se ha visto que el exceso de MgSO₄ puede llevar a falsos positivos en controles negativos y blancos de reactivo, esto debido a la generación de productos no específicos por incorporación errónea de la DNA polimerasa ya que se reduce su fidelidad, mientras que una concentración insuficiente reduce la sensibilidad debido a que los dNTPs tienen la capacidad de secuestrar este ión y provocando de este modo la inhibición de la Taq polimerasa; por tanto se sabe que la concentración de MgCl₂ normalmente se debe encontrar entre 1mM y 4mM [Slack et al, 2011; Kennedy & Oswald, 2011].

Con respecto a la temperatura de alineamiento que fue de 54°C coincidió con la teórica y la calculada por fórmula la cual sirve solo para oligonucleótidos cortos de 14 a 20 pares de bases [Zárate, 2008]. Con esto se consiguió una prueba capaz de cumplir los requerimientos clínicos para aplicarse en el diagnóstico del microorganismo. Por su parte, la sensibilidad de la PCR está relacionada al número de moléculas diana, la complejidad de las moléculas que no son blanco, y el número de ciclos, generalmente la PCR es capaz de amplificar partiendo de una sola molécula de DNA plantilla, esta propiedad incluso ha permitido el desarrollo de la genotipificación de moléculas sencillas y el diagnóstico preimplantatorio [Lo & Chan, 2006; James, 2010]. Los cebadores se analizaron y se observó que el índice de complementariedad interno, es decir, entre ambos cebadores o uno de los dos consigo mismo es bajo por lo que se considera que ambos cebadores están diseñados correctamente. Además se calculó el contenido de Citosina- Guanina (CG%) el cual fue de 54.2 % para el cebador sentido y de 41.7% para el cebador antisentido lo que corresponde con lo reportado en la literatura como adecuado para este parámetro teniendo encontrándose en el rango de 40-60% [Ye, Couloris, Zaretskava, Cutcutache, Rozen, & Madden, 2012].

10. Discusión de Resultados

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa para la prueba piloto se aprecian en la figura 10 en ellos se observa cuatro muestras con resultado positivo, esto de acuerdo con lo reportado por Torres y colaboradores para niños entre 1-4 años la prevalencia se encuentra en el 24.5% y para niños de 5-9 años en el 42.5%, con esto se aprecia que es más baja la prevalencia de la infección entre la población estudiada. Ya que tanto para los niños de 3-4 se obtuvo un solo participante por cada grupo y para niños de 5-6 años se obtuvieron 2 participantes que se encontraron en el grupo de 5 años lo que correspondería con el incremento reportado por Torres y cols., de aproximadamente el doble del grupo anterior. Al observarse los resultados también se notó que no hubo incremento de acuerdo al género pues se ha reportado en la literatura que se desplaza la infección hacia el sexo masculino cuando se realiza este análisis quedando equilibrado el resultado [Porras et al, 2013; Ueda, et al, 2014]. La prevalencia baja se podría explicar gracias a que el nivel socioeconómico de la población permite tener acceso a drenaje, consumo de agua purificada proveniente de garrafón y/o por ebullición, y también a los hábitos de higiene como el lavado de manos [Alvarado-Esquivel, 2013].

Finalmente, se llevó a cabo la secuenciación de uno de las muestras que fueron positivas a la PCR y tal como se observa en la figura 15 la secuencia corresponde con la reportadas previamente para *H. pylori*. Con los resultados de BLAST se pudo hacer el análisis en el que se observa una elevada similitud con la secuencia de la fracción ribosomal 16S de la especie, de esta manera se demuestra que la prueba es altamente efectiva, esto se verifica por los datos proporcionados en la tabla ya que valor esperado o E-value fue de cero o menor, ya que de acuerdo con la literatura este debe tener un valor semejante a ese [Porter, 2014; Altschul et al, 1990]. En la figura 17 se observa el alineamiento entre la secuencia de consulta obtenida por el programa Bioedit y la de semejanza significativa se presentan 7 gaps estos son espacios introducidos en un alineamiento para compensar inserciones o deleciones en la secuencias durante la comparación [Fassler & Cooper, 2011]. Estos espacios se pueden explicar por el alto grado de diversidad alélica el cual de acuerdo con Schauer (2006), se encuentra entre los más altos observados en cualquier especie bacteriana gracias a una alta tasa de recombinación. Asimismo Alm y colaboradores reportaron que el 24% de los genes de *H. pylori* no tienen similitud de secuencia con los genes disponibles en las bases de datos libres. Entonces, la identidad del 97% podría estar causada por lo anteriormente descrito.

11. CONCLUSIONES

- ☞ Se logró establecer las condiciones óptimas para la detección mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa al gen de la fracción ribosomal 16S.
- ☞ Se obtuvo la concentración óptima de MgCl₂ para la PCR partiendo de las concentraciones 1.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mM, siendo 1.5 mM la adecuada.
- ☞ Se cumplió establecer la temperatura de alineamiento adecuada para lo cual se probaron las temperaturas 52, 54 y 56°C, encontrando 54°C como la temperatura de alineamiento precisa para la reacción.
- ☞ Se logró aplicar correctamente la técnica para la detección de *H. pylori* mediante una prueba piloto en una población de 41 niños entre 3 y 6 años de edad, asimismo se estudiaron algunas de las características que influyen en el incremento de la infección.
- ☞ Se pudo verificar adecuadamente la especificidad de la prueba mediante la secuenciación del producto de PCR obtenido de la prueba piloto indicando así la utilidad de la técnica como prueba diagnóstica no invasiva.
- ☞ Con lo observado en la prueba se podría apuntar a la PCR como una técnica diagnóstica apropiada ya que presenta un elevado grado de especificidad y sensibilidad, lo cual hace que los resultados obtenidos sean mucho más confiables en la detección de este microorganismo.

Como sugerencias a proyectos futuros están:

- ☞ Emplear mayor número de muestras.

Y un cuestionario amplio que considere el índice de hacinamiento, hábitos de higiene y hábitos al comer para determinar los factores que intervienen en la infección entre la población estudiada.

12. REFERENCIAS

- 1) Abdo, J., Uscanga, L., Sobrino-Cossio, S., Rivera-Ramos, J., Huerta-Iga, F. & Tamayo de la Cuesta. (2007). III Consenso Mexicano de *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología Mexicana* **72**(3): 321- 338.
- 2) Abreu, M. & Peek, R. (2014). Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* **146**(6):1534-1546.
- 3) Alm, R., Ling, D., Moir, D., King, B., Brown, E., Doig, P., Smith, D., Noonan, B., Guild, B., deJonge, B., Carmel, G., Tummino, P., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S., Jiang, Q., Taylor, D., Vovis, G. y Trust, T. (1999). Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of Human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**:176-180.
- 4) Alonso, J., Rodríguez, B., Moreno, A. & Chao, L. (2013). Evaluación de la utilidad de diferentes métodos para el diagnóstico de *H. pylori*. *Revista cubana de investigaciones biomédicas* **32**(1): 102-110
- 5) Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- 6) Alvarado-Esquivel, C. (2013). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in a Mennonite Community in Durango State, Mexico. *Helicobacter* **18**: 215- 221.
- 7) Blaser, M. & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews: Microbiology* **7**: 887- 894.
- 8) Cavalier- Smith, T. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 7-76.
- 9) Centro para el Control y Prevencion de Enfermedades. (2000). Percentiles del Índice de Masa Corporal por edad de 2-20 años: niños. [Online]. Consultado el 30 de julio de 2014, disponible en <http://www.cdc.gov/growthcharts/data/spanishpdf95/co06l023.pdf>
- 10) Centro para el Control y Prevencion de Enfermedades. (2000). Percentiles del Índice de Masa Corporal por edad de 2-20 años: niñas. [Online]. Consultado el 30 de julio de 2014, disponible en <http://www.cdc.gov/growthcharts/data/spanishpdf95/co06l024.pdf>
- 11) Cerezo J., Madrid V. (1995). Técnicas, estrategias y usos de biología molecular en medicina. *Rev Invest Clin* **126**: 603-11.

12. Referencias

- 12) Clyne, M., Dolan, B. & Reeves, E. (2007). Bacterial factors that mediate colonización of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **268**: 135-143
- 13) Córdova, M. (2011). Detection of the glmM Gene in *Helicobacter pylori* Isolates with a Novel Primer by PCR. *J. Clin. Microbiol* **49**(4): 1650.
- 14) Delahay, R. & Rugge, M. (2012). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* **17**(Suppl. 1): 9-15.
- 15) Demirel, B., Esen, B. & Ucmak, G. (2013). Clinical Factors Related with *Helicobacter pylori* Infection Is there an Association with Gastric Cancer History in First Degree Family Members? *Asian Pacific J Cancer Prev*, **14** (3), 1797-1802.
- 16) Doig, P., deJonge, B., Alm, R., Brown, E., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B., Moir, D., Vovis, G. y Trust, T. (1999). *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Bio Rev.* **63**(3): 675- 707.
- 17) Dorer, M., Talarico, S & Salama, N. (2009). *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.* **5**(10).
- 18) Failho, A., Braga, A., Queiroz, D., Rodrigues, M., Herbster, I., Braga, L. (2007). The association between *Helicobacter pylori* infection and height in children from an urban community in north-east Brazil. *Ann Trop Paediatr* **27**: 55–61.
- 19) Fassler, J. & Cooper, P. (2011). BLAST Glossary. [Online]. BLAST Help – NCBI. Consultado el 11 de Agosto de 2014 disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/pdf/blast_glossary.pdf
- 20) Garrido, J. (2014). Niños de bajo peso. [Online]. Consultado el 30 de Julio de 2014, disponible en <http://www.mipediatraonline.com/2012-12-13-23-37-32/item/223-ninos-de-bajo-peso>
- 21) Ghorbani- Dalini, S., Kargar, M., Doosti, A. & Najafi, A. (2014). The relationship between *Helicobacter pylori* disease and bacterial count in stomach. *Health* **6**(4): 259-262
- 22) Gisbert, J. & Pajares, J. (2004). 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A critical review. *Aliment Pharmacol Ther.* **20**:1001-17

- 23) Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr, Evans, D., Alper, L., Opekun, A. y Boutton, T. (1987). *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* **1**:1174–1177.
- 24) Guarner, J., Kalach, N. y Koletzko, S. (2010). *Helicobacter pylori* pruebas de diagnóstico en niños: revisión de la literatura desde 1999 hasta 2009. *European Journal of Pediatrics* **169**(1): 15-25
- 25) Guillemin, K. & Salama, N. (2002). *Helicobacter pylori* functional genomics en B. Wren, N. Dorrell, (Eds), *Methods in Microbiology, Volume 33* (291-319). Boston, EUA: Academic Press.
- 26) Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *J Gastroenterol* 1996; **31**(Suppl 9):33–36
- 27) Israel, D. & Peek, R. (2012). Chapter 76: Mechanisms of *Helicobacter pylori* induced Gastric Inflammation en L. Johnson, F. Ghishan, J. Kaunitz, J. Merchant, H. Said and J. Wood (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Two volume* (pp 2019- 2046). Boston, EUA: Academic Press
- 28) Jara- Romero, L. Sánchez-Figueroa, C., Santana-Bazalar, D., León-Jiménez, E., y Cubas-Benavides, F. (2013). Frecuencia de *Helicobacter pylori* y características clínicas en niños con endoscopia digestiva alta de un hospital de Lambayeque: 2007- 2010. *Rev. Cuerpo méd. HNAAA* **6**(3): 28- 32.
- 29) James, G. (2010). PCR Basics. En M. Schuller, T. Sloots, G. James et al (Eds), *PCR for Clinical Microbiology* pp 3-10. Australia: Springer
- 30) Kanna, S., Maradey-Romero, C. & Fass, R. (2013). Diagnostic Test for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology & Endoscopy News August*: 1-8.
- 31) Kawai, M., Furuta, Y., Tsuru, T., Oshima, K., Handa, N., Takahashi, N., Yoshida, M., Azuma, T., Hattori, M., Uchiyama, I., y Kobashi, I. (2011). Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol* **11**.
- 32) Kennedy, S. & Oswald, N. (2011). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Caister Academic Press: USA.

- 33) Klein, P., Graham, D., Gaillour, A. Opekun, A., y Smith, F. (1991). Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *The Lancet* **337**(8756): 1503-1506
- 34) Leal, Y., Flores, L., Fuentes-Pananá, R. & Torres, J. (2011). ¹³C-Urea Breath Test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection In children: A Systematic Review Meta-Analysis. *Helicobacter* **16**: 327-337.
- 35) Lim, L., Yeoh K., Ho B., & Lim S. (2005). Validation of four *Helicobacter pylori* rapid blood tests in a multiethnic Asian population. *World J Gastroenterol* **11**:6681–6683.
- 36) Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manika, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Pugnolle, F., van der Merwe, S., Yamaoka, Y., Graham, D., Perez-Trallero, E., Wandstrom, T., Suerbaum, S., y Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**:915.
- 37) Lo, Y. & Chan, K. (2006). Introduction to the Polymerase Chain Reaction. En Y. Lo, R. Chiu & K. Chan (Eds), *Clinical Applications of PCR*, Second Edition. New Jersey: Humana Press.
- 38) Madden, T. (2002). The BLAST sequence analysis tool. In McEntyre, J. (Ed), *The NCBI Handbook [Online]*. National Library of Medicine (US) National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD
- 39) Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N. y Kuipers, E.. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*; **56**:772–781
- 40) McClain, M., Shaffer, C., Israel, D., Peek, R. y Cover, T. (2009). Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics* **10**(3). doi:10.1186/1471-2164-10-3
- 41) Mendoza, E. Carmolina- Ponce, M., Pérez-Pérez, G. Mera, R., Vilchis, J., Moran, S., Rivera, O., Coria, R., Torres, J., Correa, P. y Duque, X. (2013). Present and Past *Helicobacter pylori* Infection in Mexican School Children. *Helicobacter* **19**: 55-64.
- 42) Mendoza-Ibarra, S., Pérez-Pérez, G., Bosques-Padilla, F., Urquidi-Rivera, M., Rodríguez-Esquivel, Z. & Garza-González, E. (2007). Utility of diagnostic tests for detection of *Helicobacter pylori* in children in northeastern Mexico. *Pediatrics International* **49**: 869-874.

- 43) Messana, I., Cabras, T., Fadda, M., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, C., Fadda, M., Cordaro, M., Giardina, B. y Castagnola, M. (2004). Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J. Proteome Res* 3: 792-800
- 44) Moncayo, J. y Santacruz, J. (2002). Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad úlcero gástrica. *Revista Médica de Risaralda* 8(1): 1- 7.
- 45) Monteiro, L., de Mascarel, A., Sarrasqueta, A., Bergey, B., Barberis, C., Talby, P., Roux, D., Shouler, L., Goldfain, D., Lamouliatte, H. y Mégraud, F. (2001). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 96:353–358
- 46) Nares-Cisneros, J., Jaramillo-Rodríguez, Y., Martínez-Ordaz, V., Velasco-Rodríguez, V., Madero, A., Mena-Arias, G. & Manriquez-Covarrubias, L. (2007). Immunocromatographic Monoclonal Test for detection of *Helicobacter pylori* Antigen in Stool is Useful in children from High-Prevalence Developing Country. *Helicobacter* 12: 354-358
- 47) Oleastro, M, Pelerito, A., Nogueira, P., Benoliel, J., Santos, A., Cabral, J., Lopes, A., Ramalho, P. y Monteiro, L. (2011). Prevalence and Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in a Healthy Pediatric Population in the Lisbon Area. *Helicobacter* 16: 363-372
- 48) Payne, S. (1993). Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 1: 66-69
- 49) Paniagua, G., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J., Camacho, A., Negrete, E. y Vaca, S. (2009). Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8(14).
- 50) Percival, S. & Williams, D. (20014). *Helicobacter pylori* en S. Percival, M. Yates, D. Williams, R. Chalmers, N. Gray (Eds), *Microbiology of Waterborne Diseases* (119-154). London, UK: Academic Press
- 51) Perri, F. Pastore, M., Leandro, F., Clemente, R., Ghos, Y., Peeters, M., Annese, V., Quitadamo, M., Latiano, A., Rutgeerts, P. y Andriulli, A. (1997). *Helicobacter pylori* infection and growth delay in older children. *Arch Dis Child* 77: 46–49.

- 52) Perry, S., de la Luz Sanchez, M., Yang, S., Haggerty, T., Hurst, P., Perez-Perez, G., Parsonnet J. (2006) Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. *Emerg Infect Dis.* **12**(11):1701-8. PubMed PMID: 17283620; PubMed Central PMCID: PMC3372328.
- 53) Porter, S. (2014). BLAST, Digital World Biology. Consultado el 11 de julio de 2014. URL: <http://www.digitalworldbiology.com/BLAST/slide7.html>
- 54) Ramírez-Ramos, A. y Sánchez-Sánchez, R. (2009). Contribución de Latinoamérica al estudio del *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, **Septiembre** 197-218.
- 55) Roblejo, Y. Samada, M., González, J., Sabatier, C., Martínez, M., Marrero, A., Fando, R., Rodríguez, B. (2005). Comparación de métodos en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales. *Revista CENIC* **36**(3): 191- 197.
- 56) Sachse, K. (2003). Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. En K. Sachse & J. Frey, *Methods in Molecular Biology* 216
- 57) Salmanian, A., Siavoshi, F., Akbari, F., Afshari, A. & Malekzadeh, R. (2008). Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*. *J Oral Pathol Med* **37**: 324-328
- 58) Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, EUA: *Cold Spring Harbor Press*
- 59) Saunders, N., Boonmee, P., Peden, J., Jarvis, S. (2005). Inter-species horizontal transfer resulting in core-genome and niche-adaptive variation within *Helicobacter pylori*. *BMC Genomics* **6** (9).
- 60) Sayed, A., Anaun, P., Kamath, K., Patil, S. Preethanath, R. & Anil, S. (2014). Oral cavity as an Extragastic Reservoir of *Helicobacter pylori*. *Hindawi Publishing Corporation volume 2014*: 1-16
- 61) Sayed, M., Ibrahim, W., Abdel-bary, S., Abdelhakam, S., El-Masry, S., Ghoraba, D. (2011). Salivary PCR detection of *Helicobacter pylori* DNA in Egyptian patients with dyspepsia. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* **12**: 211- 216.
- 62) Schipper, R., Silletti, E. & Vingerhoeds, M. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral Biology*.

12. Referencias

- 63) Shauer, D. (2006). Genomic of *Helicobacter* species. En P. Sherman, B. Bourke, (Eds), *Bacterial Genomes and Infectious Diseases*. USA: Springer. Pp 223-233.
- 64) Slack, G., Low, J., Kaminski, G. & Yirrel, D. (2011). Optimising PCR reactions: remember magnesium?. *Journal of Clinical Virology* 52(1): 6-64
- 65) Suarez, J., Reyes, C. y Herreros, L. (2011). *Helicobacter pylori*: revisión de los aspectos fisiológicos y patológicos. *Med. Vis.* **24**:287- 296
- 66) Suzuki, R. Shiota, S. y Yamaoka, Y. (2012). Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution* **12**: 203- 213.
- 67) Tan, S., Noto, J., Romero-Gallo, J., Peek, R. & Amieva, M. (2011). *Helicobacter pylori* Iron Trafficking in the Epithelium to Grow on the Cell Surface. *PLoS Pathogens* **7**(5): 1-17.
- 68) Tu, T., Lee, C., Wu, C., Chen, T., Chan, C., Huang, S. y Lee, M. (1999). Comparison of invasive and noninvasive tests for detecting *Helicobacter pylori* infection in bleeding peptic ulcers. *Gastrointestinal endoscopy* **49**(3): 302- 306.
- 69) Tiveljung, A., Borch, K., Jonasson, J., Mardh, S., Petersson, F & Monstein, H. (1998). Identification of *Helicobacter* in gastric biopsies by PCR based on 16S rDNA sequences: a matter of little significance for the prediction of *H. pylori*- associated gastritis? *J. Med. Microbiol.* **47**: 695- 704.
- 70) Thoreson, A., Borre, M., Andersen, L., Elsborg, L., Holk, S., Conway, P., Henrichsen, J., Vuust, J. y Kroghfelt, K. (1994). Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **10**: 326- 333.
- 71) Torres, F., García, A. y Zárate, A. (2008). *Helicobacter pylori*. [En línea]. Seminario: El Ejercicio Actual de la Medicina. Consultado el 30 de Julio de 2014, disponible en http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/ene_01_ponencia.html
- 72) Ueda, J., Goshō, M., Inui, Y., et al. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection by Birth Year and Geographic Area in Japan. *Helicobacter* **19**: 105-110
- 73) Vilchis, J., Duque, X., Mera, R. et al (2009). Association of *Helicobacter pylori* Infection and Height of Mexican Children of Low Socioeconomic Level Attending Boarding Schools. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **81**(6): 1091–1096

12. Referencias

- 74) Wallace, R., Shaffer, J., Murphy, R., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxiribonucleotides to $\phi\chi 174$ DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acid Research* **6**(11): 3543-3558
- 75) Weinberg, E. (2009). Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1790**: 600-605
- 76) WHO-IARC. (1997). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. **61**: 177- 179
- 77) Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J. y Hirayama, T. (2003). Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem.* **278**(21):19183-19189.
- 78) Ye, J., Couloris, G., Zaretskava, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 18(13):
- 79) Zhongming, G. & Shauer, D. (2006). Genomics of *Helicobacter* species. En Voon L. Chan, Philip M. Sherman & Billy Bourke (Ed.). *Bacterial Genomes and Infectious Diseases* (pp. 91- 107) USA: Humana Press
- 80) Zurita Ortega, F., Martínez Porcel, R., Ali Morel, O., Fernández García, R. y Fernández Sánchez, M. (2010). Aportaciones a la determinación de la prevalencia de la obesidad entre el alumnado de educación especial. *Rev Pediatr Aten* **12**(45)