



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a
antibióticos de *Helicobacter pylori* en niños con dolor
abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del
Instituto Nacional de Pediatría”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA
LUIS JAVIER MORELIA MANDUJANO

ASESOR: Dra. CAROLINA MARIA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ
CO-ASESOR: M. en C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2022



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
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Que presenta el pasante: **Luis Javier Morelia Mandujano**

Con número de cuenta: **309007036** para obtener el título de: **Licenciado 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya | |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles | |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | |

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

LMCF/javg



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Que presenta el pasante: **Luis Javier Morelia Mandujano**

Con número de cuenta: 309007036 para obtener el título de: Licenciado 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya | |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles | |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | |

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de Helicobacter pylori en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Que presenta el pasante: Luis Javier Morella Mandujano
Con número de cuenta: 309007036 para obtener el título de: Licenciado 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya | _____ |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | _____ |
| SECRETARIO | Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio | _____ |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles | _____ |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | _____ |

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de Helicobacter pylori en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Que presenta el pasante: **Luis Javier Morelia Mandujano**
Con número de cuenta: **309007036** para obtener el título de: Licenciado 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya | _____ |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | _____ |
| SECRETARIO | Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio | _____ |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles | _____ |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | _____ |

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

LMCF/javg



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Que presenta el pasante: **Luis Javier Morelia Mandujano**

Con número de cuenta: 309007036 para obtener el título de: Licenciado 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------|---|-------|
| PRESIDENTE | M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya | |
| VOCAL | Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles | |
| 2do. SUPLENTE | Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez | |

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

LMCF/javg



“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos de tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado...”

Marie Curie



Dedicatoria

Principalmente a mi mamá Martha Morelia, aquí está el fruto de todo tu esfuerzo y se ve reflejado en el profesional el cual gracias a ti hoy soy.

A mi abuela Teresa Mandujano, la cual fue pieza fundamental en mi educación desde pequeño y donde quiera que te encuentras este logro también es gracia a ti.

A mis sobrinos Alexis, Andrea y Alexander que son los que hacen que siga en este camino.



Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme todos los conocimientos adquiridos a lo largo de mi vida como estudiante, el cual me siento orgulloso por pertenecer a la mejor casa de estudios que tiene el país.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 por ser mi segunda casa por 4 años y medio, en la cual no solo me disté los mejores años de mi vida, sino que también me pusiste en mi camino a personas maravillosas, las cuales han aportado para mi formación educativa, profesional y personal, y que gracias a ti encontré el amor a la docencia.

A mis asesoras, la profesora Andrea; muchas gracias maestra por todo el apoyo recibido, desde que me acepto en su servicio social, y posteriormente en la realización de esta tesis, siempre estaré agradecido con usted, ya que en los buenos y difíciles momentos siempre tiene un consejo que darme, un gran respeto y admiración tengo hacia usted como académica y como persona.

A mi asesora la Dra. Carolina Romo, por abrirme las puertas en su equipo de trabajo, por todos sus conocimientos que me transmitió y que se ven reflejados en este trabajo, que a pesar que las circunstancias me llevaron agarrar un camino diferente, siempre le estaré agradecido por todo el apoyo y que gracias a usted probé lo que es dedicarse a la investigación. Mis más grandes respetos hacia usted. es una gran investigadora y de las mejores que puede tener el INP.

Al laboratorio de Bacteriología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar mi proyecto de investigación que, a lo largo de casi 2 años de estar ahí, me llevo las mejores experiencias y de las primeras que tuve fuera de la escuela, y a cada uno de los que pertenecen a este laboratorio en especial al Dr. Coria, al Q. Armando y a la Sra. Lilia.

A mis amigos de la 4° Generación de BQD, Ricardo Riquelme, Fanny, Pauly, Alexis, Lenin, Fidel, Yahir, Sandra, Karina, Eliseo, Annie, Angie, Marisol, con los cuales pase los mejores momentos a su lado, desde la presión de entregar trabajos, reportes, estudiar para los exámenes y como no olvidar las fiestas, nuestra quema de batas y los viajes de generación los cuales siempre llevare estos grandes momentos que pasamos juntos.

A mis amigos del servicio social de bacter, tocayo Luis Malpica y Monse, éramos el mejor equipo de servicio que pudo pasar por bacteriología, gracias por aprender junto con ustedes esta gran pasión por las bacterias.



A grandes profesores de la FESC, que a lo largo de mi trayectoria académica me transmitieron sus conocimientos; Lidia Ballesteros, Dra. Gilda Flores, Julio Botello, Idalia, Maritere, Maru Posada, Alma Núñez, Gaby Fuentes, Lupita Hernández, Dr. Andrés Romero, Heidi, Sandra, Erick, Betsabé, Rosalba, Alejandro, Dr. Marco Vega, Lourdes Galván, Rene Damián, a todos ellos GRACIAS.

A los profesores: Jonathan, David, Moisés, Verónica, Lupita Avilés, Dulce Ruvalcaba y Don Martin, gracias por todo lo que me enseñaron y que ahora los considero grandes amigos.

A mis alumnos Mariana, Miguel Ángel y David, los cuales fueron de mis primeros alumnos que tuve en la facultad y que hoy en día son mis mejores amigos.

A la familia Cruz Montiel y al Dr. Obed, gracias por abrirme las puertas de su casa y por todo el apoyo brindado.

A mis amigos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría: Juanita, Eva, Hugo, Martin, Lola, Maricela, Q. Guillermo, Zamora y José Luis; por enseñarme a trabajar en el banco, en especial a Norma y Gaby que las considero mis mejores amigas y que siempre están ahí para ayudarme.

“Por mi Raza Hablara el Espíritu”
Luis Javier Morelia Mandujano



Contenido

| | |
|---|-----------|
| INDICE DE FIGURAS | 1 |
| INDICE DE TABLAS | 3 |
| INDICE DE GRAFICOS | 4 |
| ABREVIATURAS | 5 |
| 1. RESUMEN..... | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3. MARCO TEORICO | 5 |
| 3.1 Epidemiología..... | 5 |
| 3.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> en México..... | 6 |
| 3.1.2 Transmisión | 7 |
| 3.2 Taxonomía | 7 |
| 3.3 Características microbiológicas..... | 8 |
| 3.3.1 Condiciones de crecimiento | 9 |
| 3.4 Metabolismo | 10 |
| 3.5 Genoma de <i>Helicobacter pylori</i>..... | 10 |
| 3.5.1 Cepa de <i>H. pylori</i> 26695..... | 10 |
| 3.5.2 Cepa de <i>H. pylori</i> J99..... | 11 |
| 3.5.3 Otras cepas de <i>H. pylori</i> | 11 |
| 3.6 Factores de virulencia..... | 12 |
| 3.6.1 Motilidad | 13 |
| 3.6.2 Ureasa | 13 |
| 3.6.3 Proteínas de membrana externa..... | 14 |
| 3.6.3.1 Bab A..... | 14 |
| 3.6.3.2 Sab A..... | 14 |
| 3.6.3.3 Oip A..... | 14 |
| 3.6.3.4 Alp A/B..... | 15 |
| 3.6.4 DupA..... | 15 |
| 3.6.5 Citotoxina VacA | 15 |
| 3.6.6 Isla de Patogenicidad cagPAI..... | 16 |
| 3.6.7 Cag A..... | 17 |
| 3.6.7.1 Secreción de la proteína CagA a través del sistema de secreción tipo IV | 18 |
| 3.7 Genes de la zona de plasticidad..... | 20 |
| 3.8 Enfermedades asociadas..... | 20 |
| 3.8.1 Colonización de la mucosa gástrica | 21 |



| | |
|---|-----------|
| 3.8.2 Manifestaciones clínicas | 23 |
| 3.9 Diagnostico..... | 25 |
| 3.9.1 Métodos invasivos..... | 25 |
| 3.9.2 Métodos no invasivos..... | 26 |
| 3.10 Tratamiento..... | 29 |
| 3.10.1 Regímenes terapéuticos | 29 |
| 3.11 Resistencia a antibióticos..... | 29 |
| 4. OBJETIVOS..... | 32 |
| 4.1 General..... | 32 |
| 4.2. Particulares..... | 32 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 33 |
| 6. JUSTIFICACIÓN..... | 33 |
| 7. METODOLOGÍA | 34 |
| 8. RESULTADOS..... | 43 |
| 9. DISCUSION..... | 56 |
| 10. CONCLUSIONES | 60 |
| 11. REFERENCIAS | 61 |
| 12. ANEXOS..... | 66 |
| 1. Tabla 10. Lista de Primers utilizados para la amplificación de los genes | 66 |
| 2. Extracción de DNA cromosomal por el método de GES | 67 |
| 3. Extracción de DNA a partir de biopsias gástricas por el método de Fenol-Cloroformo..... | 68 |
| 4. Preparación del master mix para las reacciones de PCR..... | 69 |
| 5. Condiciones en el termociclador..... | 71 |



INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Warren (izquierda), Marshall (derecha) pioneros en la investigación y estudios de <i>Helicobacter pylori</i> | 3 |
| Figura 2. Mapa de la prevalencia de <i>H. pylori</i> en las diferentes regiones del mundo..... | 5 |
| Figura 3. Seroprevalencia (♦) y magnitud (□) de IgG anti- <i>H. pylori</i> en 11,605 mexicanos..... | 6 |
| Figura 4. Árbol filogenético de especies de <i>Helicobacter</i> | 8 |
| Figura 5. La imagen muestra el aspecto de <i>H. pylori</i> cuando se observa por microscopia electrónica..... | 9 |
| Figura 6. Genoma completo de la cepa 26695 de <i>H. pylori</i> | 11 |
| Figura 7. Reacción de la enzima ureasa..... | 13 |
| Figura 8. Representación esquemática del gen <i>vacA</i> con las 3 regiones polimórficas (s, i, m) y los alelos de cada región..... | 16 |
| Figura 9. Localización de la isla de patogenicidad en el genoma de <i>H. pylori</i> y los genes que lo constituyen, entre ellos el gen <i>cagA</i> | 17 |
| Figura 10. Estructura del Sistema de Secreción tipo IV, el cual es empleado por <i>H. pylori</i> para liberar a las células la proteína CagA..... | 19 |
| Figura 11. Ensamblaje de los componentes del T4SS para la liberación de la proteína CagA..... | 19 |
| Figura 12. Anatomía del estómago..... | 21 |
| Figura 13. Penetración de la mucosa gástrica de <i>H. pylori</i> y su adhesión a las células epiteliales..... | 22 |
| Figura 14. El papel de los principales factores de virulencia en la patogénesis de <i>H. pylori</i> | 23 |



| | |
|--|----|
| Figura 15. Historia Natural de la Enfermedad por la infección de <i>H. pylori</i> | 23 |
| Figura 16. Tasa de resistencia de los diferentes antibióticos en las diferentes regiones geográficas..... | 31 |
| Figura 17. Esquema de la preparación de las cajas con claritromicina..... | 36 |
| Figura 18. Esquema de la preparación de las cajas con metronidazol..... | 37 |
| Figura 19. Forma de sembrado de las cepas en las cajas para la prueba de resistencia a antibióticos..... | 38 |
| Figura 20. <i>H. pylori</i> en tinción de Gram..... | 43 |
| Figura 21. Colonias de <i>H. pylori</i> en medio de Agar Sangre..... | 43 |
| Figura 22. Prueba de catalasa en cepas de <i>H. pylori</i> | 44 |
| Figura 23. Prueba de ureasa en cepas de <i>H. pylori</i> | 44 |
| Figura 24. Cuantificación de DNA mediante NANODROP 2000®..... | 44 |
| Figura 25. Amplificación de los genes para el diagnóstico de <i>H. pylori</i> | 45 |



INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Influencia de la edad en la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en México..... | 6 |
| Tabla 2. Tabla comparativa del genoma de las diferentes cepas de <i>H. pylori</i> y otras especies de <i>Helicobacter</i> | 12 |
| Tabla 3. Comparación de la presencia de las manifestaciones clínicas por <i>H. pylori</i> en niños y adultos..... | 25 |
| Tabla 4. Resumen de los métodos de diagnóstico para <i>H. pylori</i> | 28 |
| Tabla 5. Genes involucrados en la resistencia a antibióticos en <i>H. pylori</i> | 30 |
| Tabla 6. Tasa de prevalencia de resistencia a antibióticos de <i>H. pylori</i> en diferentes regiones geográficas..... | 31 |
| Tabla 7. Recopilación de resultados de diagnóstico para <i>H. pylori</i> y sensibilidad a antibióticos. | 46 |
| Tabla 8. Resultados de la sensibilidad a Claritromicina..... | 54 |
| Tabla 9. Resultados de la sensibilidad a Metronidazol..... | 55 |
| Tabla 10. Lista de primers utilizados para las técnicas moleculares (PCR) | 66 |



INDICE DE GRAFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Porcentaje de acuerdo con el género de los pacientes con DAR que se le realizo biopsia gástrica..... | 49 |
| Gráfica 2. Porcentaje de acuerdo con el género de los pacientes positivos a <i>H. pylori</i> | 49 |
| Gráfica 3. Histograma de frecuencias de edad de los niños con DAR que se le realizo biopsia gástrica..... | 50 |
| Gráfica 4. Histograma de frecuencias de edad de los niños con DAR con diagnóstico de <i>H. pylori</i> | 50 |
| Gráfica 5. Porcentaje de acuerdo con el origen de la biopsia de los pacientes con DAR positivos a <i>H. pylori</i> | 51 |
| Gráfica 6. Porcentaje de la presencia de los genes de virulencia de <i>H. pylori</i> en cepas aisladas..... | 52 |
| Gráfica 7. Porcentaje de la presencia de los genes de la zona de plasticidad de <i>H. pylori</i> en cepas aisladas..... | 53 |



ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| ATCC American Type Culture Collection | IgG Inmunoglobulina G |
| Bab A Adhesina de unión al antígeno de Lewis | INP Instituto Nacional de Pediatría |
| BHI Agar Infusión Cerebro Corazón | kDa kiloDalton |
| CagA Gen asociado a la citotoxina A | MALT Tejido Linfoide Asociado a Mucosa |
| CLSI Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio | NH₃ Amoniaco |
| CMI Concentración Mínima Inhibitoria | OMP Proteína de Membrana Externa |
| CO₂ Dióxido de carbono | ORF Marco de Lectura Abierto |
| CoA Coenzima A | PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| DAR Dolor Abdominal Recurrente | PMN Polimorfonuclear |
| DNA ácido desoxirribonucleico | POR Piruvato Ferredoxin Oxidorreductasa |
| Dup Perforación de ulcera duodenal | RNA ácido ribonucleico |
| ELISA Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas | RUT Prueba Rápida de Ureasa |
| FAK Cinasa de adhesión focal | Sab A Adhesina de unión a ácido siálico |
| GC Guanina-Citosina | SSF Solución Salina Fisiológica |
| GES Tiocianato de Guanidina | T4SS Sistema de Secreción Tipo 4 |
| GTP Guanosin trifosfato | TnPZ Transposones de la zona de plasticidad |
| IBP Inhibidor de la bomba de protones | ureC Gen de la ureasa |
| | VacA Citotoxina vacuolizante |



1. RESUMEN

El presente trabajo consistió en realizar el diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría

Los aislados de *H. pylori* se obtuvieron a partir de biopsias gástricas (antro, cuerpo e incisura) de pacientes pediátricos del servicio de Gastroenterología del INP, las cuales llegaban al laboratorio de Bacteriología Experimental de la Torre de Investigación del mismo Instituto; la biopsia se maceraba para su disgregación, hasta formar un homogenizado; una alícuota de este era para el diagnóstico microbiológico que consistió en sembrar en Agar Sangre con y sin antibiótico (Trimetoprima, Vancomicina) para aislar la cepa pura y realizar la prueba de sensibilidad a antibióticos y la búsqueda de los principales genes de virulencia (*dupA*, *vacA*, *cagA*, *cagPAI* y los genes de la zona de plasticidad) por PCR de DNA extraído de las cepas; y otra alícuota para la extracción de DNA de la biopsia para el diagnóstico molecular que consistió en la búsqueda de genes conservados (*ureC* y *16S*) por la técnica de PCR.

Los pacientes de este estudio tenían una edad promedio de 8 ± 1.84 años. De los 50 de niños pertenecientes a este estudio, 15 pacientes fueron positivos a *H. pylori*, ya sea por cultivo y/o PCR esto equivale al **30%**. De las 96 biopsias obtenidas de cualquiera de estas regiones: antro, cuerpo e incisura en los 50 pacientes, 20 fueron biopsias fueron positivas para *H. pylori* por cualquiera de los métodos de identificación, esto equivale al **20.8%** de total de biopsias, siendo la región de antro, la región donde más se encontró *H. pylori*. El mayor porcentaje de resultados positivos a *H. pylori* se obtuvo con la combinación de las técnicas de cultivo y PCR. En cuanto a la genotipificación de las cepas aisladas, el 50% presento *vacA s1b/* y el 75% fue *vacAm1*, el 75% fue *cagPAI (+)* pero sin la presencia del gen *cagA*, y tampoco *dupA (+)* y el 50% de las cepas presento el gen *jhp0945* y el *jhp0947* estuvo en el 25%. El 50% de las cepas fue resistente a claritromicina y el 63.3% para metronidazol.



2. INTRODUCCIÓN.

Hace tres décadas se consideraba que la producción excesiva de ácido clorhídrico era el principal factor responsable de la úlcera péptica y gastritis. Investigaciones en este campo de la medicina han aportado datos muy interesantes y novedosos en la comprensión de esta enfermedad. Hoy en día, se considera a un agente infeccioso bacteriano, denominado *Helicobacter pylori*, como una de las principales causas en el origen de estos padecimientos.

La primera descripción de bacterias espirales en el estómago se dio en animales en el siglo XIX y en humanos fue hasta el siglo XX (**Bento-Miranda & Figueiredo, 2014**). Sin embargo, fue en 1983 cuando Robin Warren, médico patólogo australiano, reportó la presencia de una “bacteria curva” en la mucosa gástrica y junto con Barry Marshal, médico australiano y profesor de Microbiología Clínica, aisló esta bacteria de la mucosa gástrica humana. Inicialmente fue llamada “*Campylobacter pyloridis*” y a partir de 1989 es llamado *Helicobacter pylori*, lo cual los llevó a recibir en el 2005 el premio nobel de medicina, por comprobar que esta bacteria puede causar gastritis y estar asociada con el desarrollo de úlcera duodenal e incluso cáncer gástrico



Figura 1. Warren (izquierda), Marshall (derecha) pioneros en la investigación y estudios de *Helicobacter pylori*.

En 1991 se encuentra la primera asociación entre *H. pylori* y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT); posteriormente en 1994, el Instituto Nacional de Salud en una conferencia en los Estados Unidos, declaró una nueva asociación entre *H. pylori* y úlcera péptica. En el mismo año, fue reconocida esta bacteria como un carcinógeno tipo 1 asociado con el adenocarcinoma gástrico y el linfoma no Hodgkin gástrico. Poco después se identificó por primera vez en niños sometidos a endoscopia gastrointestinal superior y que



tenían características histológicas de gastritis crónica activa, esto fue seguido por otro estudio, que describe la asociación del organismo con la inflamación gastroduodenal. **(Rajindrajith, Devanarayana, & de Silva, 2009)** Estos resultados establecieron firmemente que *H. pylori* es un importante patógeno del estómago.



3. MARCO TEORICO

3.1 Epidemiología

La infección por *H. pylori* es un problema de salud pública en todo el mundo, su prevalencia muestra una gran variación geográfica, en varios países en desarrollo más del 80% de la población está infectada con *H. pylori*; la prevalencia en países industrializados generalmente se encuentra por debajo del 40% y es menor en niños y adolescentes que en adultos y personas mayores. En los países en desarrollo, las tasas de infección por *H. pylori* aumentan rápidamente en los primeros 5 años de vida y permanecen constantemente elevadas a partir de entonces, lo que indica que *H. pylori* puede adquirirse desde la infancia. **(Kusters et al., 2006)**

En una revisión sistemática del 2015, muestra que aproximadamente 4,4 millones de personas en todo el mundo eran positivos para *H. pylori*. Se observa una amplia variación en la prevalencia entre regiones y países. La prevalencia es más alta en África (79,1%), América Latina y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%). En contraste, la prevalencia es más baja en América del Norte (37,1%) y Oceanía (24,4%). **(Hooi et al., 2017)**

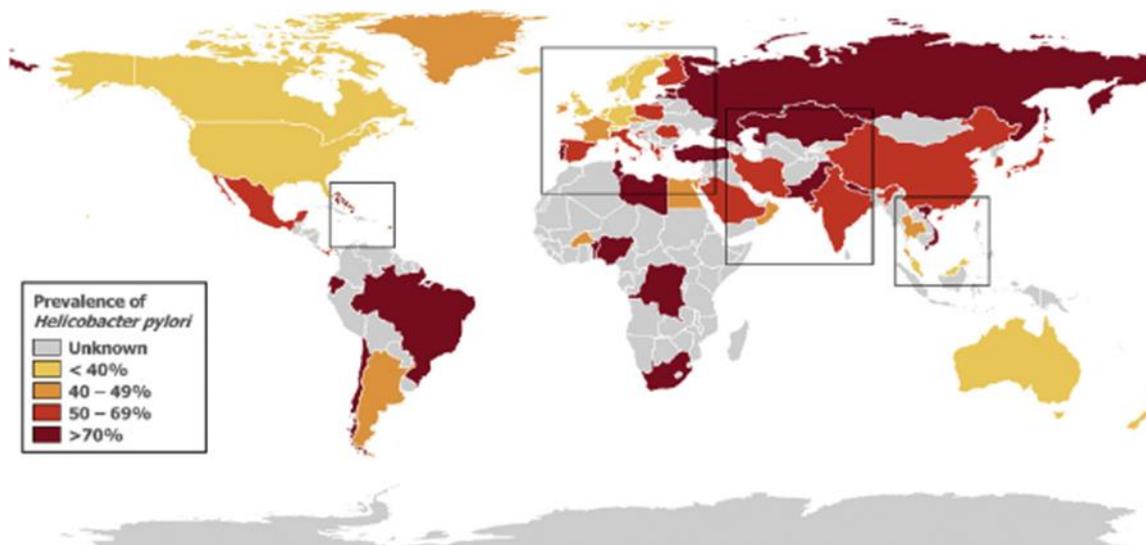


Figura 2. Mapa de la prevalencia de *H. pylori* en las diferentes regiones del mundo. (Hooi et al., 2017)

Se han estudiado con detalle los factores que predisponen a la infección por *H. pylori* en niños. Los principales factores identificados en estos estudios fueron el bajo nivel socioeconómico en el que se desarrollan y que la infección es mayor entre los que viven en viviendas hacinadas. **(Rajindrajith et al., 2009)**



3.1.1 *Helicobacter pylori* en México

En México, la prevalencia seroepidemiológica de la infección por *H. pylori* se estima entre un 60-80% en adultos; fundamentalmente en búsqueda de anticuerpos de clase IgG dirigidos contra esta bacteria siendo el más amplio el estudio de Torres et al., 1998 quienes analizaron una muestra de 11,605 sueros de todo el país y demostraron que los niveles de positividad fueron superiores al 80% en los grupos mayores de 30 años (hasta el 89% en el grupo de 60 a 69 años), presentándose el mayor incremento de la seroprevalencia en los grupos de 0 a 9 años lo que evidencia que la colonización se presenta en los primeros años de vida y permanece por periodos muy prolongados.

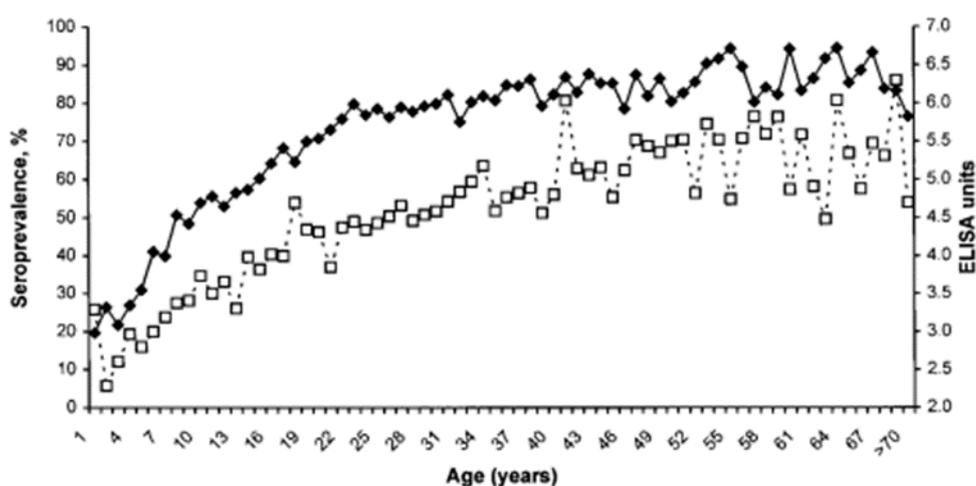


Figura 3. Seroprevalencia (◆) y magnitud (□) de IgG anti-*H. pylori* en 11,605 mexicanos (J Torres et al., 1998)

Tabla 1. Influencia de la edad en la seroprevalencia de *H. pylori* en México.

| Grupo de edad (años) | % (seropositividad) |
|----------------------|---------------------|
| 1-4 | 24.5 |
| 5-9 | 42.5 |
| 10-14 | 55.3 |
| 15-19 | 65.1 |
| 20-29 | 76.5 |
| 30-39 | 81.2 |
| 40-49 | 84.4 |
| 50-59 | 86.2 |
| 60-69 | 89.1 |
| >70 | 78.7 |

Nota: las variables analizadas en este estudio fueron; grupo de edad, raza, nivel socioeconómico y género. Modificado (J Torres et al., 1998)



3.1.2 Transmisión

El estómago humano es el único reservorio identificado para *H. pylori*, de acuerdo a varios estudios, las posibles rutas de transmisión son: fecal-oral, oral-oral y gastro-oral. **(Rajindrajith et al., 2009)**. Estas rutas se establecieron debido a que se ha detectado en saliva, vómito, reflujo gástrico y heces, pero no hay evidencia concluyente de la transmisión predominante a través de cualquiera de estos productos. Esto puede ser debido al hecho de que la mayoría de la investigación sobre la transmisión se ha centrado solo en adultos. **(Kusters et al., 2006)**

Al igual varios estudios han reportado la presencia de DNA de *H. pylori* en fuentes de agua ambiental, sólo hay un solo informe de que *H. pylori* se cultivó con éxito de agua, pero esto involucró aguas residuales y, como tal, puede representar la contaminación fecal de la fuente de agua.

3.2 Taxonomía

El microorganismo que hoy se conoce como *H. pylori* fue introducido en la comunidad científica en 1982, Skirrow, un microbiólogo en el campo de *Campylobacter*, incluyó en este género al nuevo microorganismo debido a su ubicación específica y asociación, por lo que se le denominó primeramente como *Campylobacter pyloridis*, el éxito del cultivo de la bacteria dio lugar a la aceptación de este nombre que posteriormente fue corregido a *Campylobacter pylori*. Estudios posteriores a nivel genético, resultó en la formación de un nuevo género denominado "*Helicobacter*" **(Figura 4)** el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA condujo a la diferenciación de *H. pylori* a partir de especies de *Campylobacter*, esta herramienta ha sido importante en la clasificación de otros miembros de este género. Algunas otras características importantes que diferencian las especies de *Helicobacter* de especies de *Campylobacter* incluyen la posesión de flagelos envainada, el perfil de ácidos grasos únicos, la falta de quinonas respiratorias, la enzima ureasa activa, la temperatura de crecimiento, un perfil de proteínas distinta, entre otras. **(Windsor & O'Rourke, 2000)**

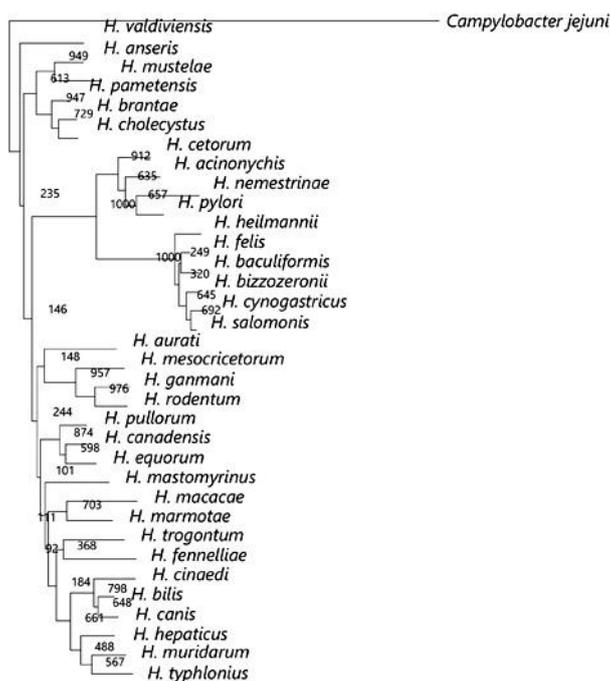


Figura 4. Árbol filogenético de especies de *Helicobacter* (Øverbyet al., 2016)

De acuerdo al manual de Bergey's, la clasificación taxonómica para *H. pylori* es la siguiente:

- Dominio: Bacteria
 Filo: Proteobacteria
 Clase: Epsilonproteobacteria
 Orden: Campylobacterales
 Familia: Helicobacteraceae
 Género: *Helicobacter*
 Especie: *H. pylori*

3.3 Características microbiológicas

Helicobacter pylori es una bacteria Gram (-) en forma de espiral, mide de 2 a 4 μm de longitud y de 0.5 a 1 μm de ancho. Este microorganismo tiene de 2 a 6 flagelos unipolares de una longitud de 3 μm aproximadamente, estos flagelos les confieren la motilidad y un rápido movimiento en soluciones viscosas como es el caso de la mucosa de las células epiteliales gástricas. Se ha reportado que esta bacteria puede presentar una morfología en forma de cocos, esto debido a un cultivo muy prolongado; estas formas no pueden cultivarse *in vitro* y se piensa que representan células muertas, aunque se ha sugerido que las formas cocoides pueden representar un estado no viable de *H. pylori*. (Kusters, Vliet, & Kuipers, 2006)

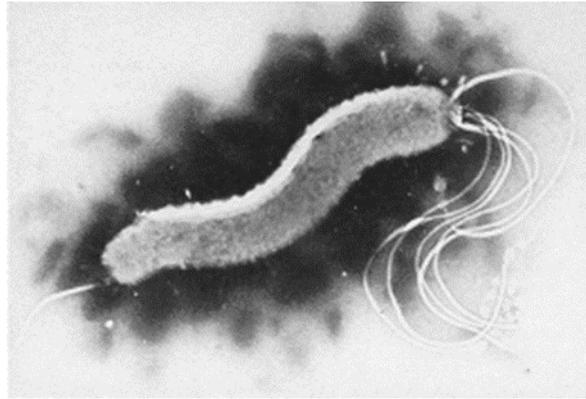


Figura 5. La imagen muestra el aspecto de *H. pylori* cuando se observa por microscopía electrónica (cortesía del Prof A. Lee y Dr. J. O'Rourke, Escuela de Microbiología e Inmunología, University of New South Wales, Australia)

Esta bacteria es microaerófila, catalasa (+), oxidasa (+); tiene alta actividad de ureasa, característica principal de esta bacteria (**Dunne, Dolan, & Clyne, 2014**). Otras pruebas bioquímicas son: nitratos (+), hidrólisis de indoxil acetato (-), indol (-), en medio de TSI no hay producción de H₂S, hidrólisis de hipurato (-) y no produce ácido a partir de algunos azúcares. (**Andersen et al., 1999**)

3.3.1 Condiciones de crecimiento

H. pylori se considera como una bacteria fastidiosa, microaerófila, puede sobrevivir a temperatura de 4°C y a temperatura ambiente durante 5 a 48 horas en la mayoría de los medios convencionales. Para su cultivo se utilizan medios enriquecidos como Agar Chocolate y Agar Sangre, los cuales son puestos en un ambiente de anaerobiosis con 5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂ con 95% de humedad a 36°C, las cuales son las condiciones óptimas para su crecimiento. Es una bacteria de crecimiento lento, de 5-7 días en medios de cultivo (**Xia et al., 1994**)

Comúnmente también son utilizados otros medios para el aislamiento y cultivo tales como Agar Columbia o Agar Brucella suplementados con sangre de caballo o de cordero, alternativamente se utiliza por igual suero fetal bovino. Para el primer aislamiento se adicionan a los medios de cultivo una mezcla de antibióticos, estos consisten en vancomicina, trimetoprima, polimixina B y anfotericina B; esto es con el fin de lograr un crecimiento puro y sin ningún contaminante en las placas. Medios líquidos para la conservación de *H. pylori* consisten en caldo Brucella, Muller-Hinton o BHI, suplementados con 2 al 10% de suero de carnero (**Kusters et al., 2006**)



Algunas cepas de *Helicobacter* cambian su morfología a formas cocoides cuando están más de 10 días en los medios de cultivo, esto es debido a cambios en su metabolismo que sufre la bacteria; el medio inclinado de Agar Chocolate, retarda la formación de cocoides por lo que es recomendado como un medio adecuado para el transporte de cultivos de *H. pylori*. **(Xia et al., 1994)**

En medios como Agar Sangre o Agar Chocolate el crecimiento de *H. pylori* se presenta como colonias pequeñas, translúcidas y uniformes presentando una apariencia de “gotas de rocío”. **(Figura 4) (Andersen et al., 1999)**

3.4 Metabolismo

Las especies de *Helicobacter* usan a la glucosa como la única fuente de hidratos de carbono y la fuente principal de fosforilación a nivel de sustrato, también se deriva la energía de la degradación de algunos aminoácidos tales como la serina, alanina, aspartato y prolina. La biosíntesis de peptidoglicano, fosfolípidos, aminoácidos aromáticos, ácidos grasos y cofactores se deriva a partir de acetil-CoA o de productos intermedios en la vía glucolítica. El metabolismo del piruvato refleja el carácter microaerófilico de este microorganismo. La conversión de piruvato a acetil CoA se realiza mediante el piruvato ferredoxin oxidoreductasa (POR), una enzima que hasta el momento solo se ha descrito en microorganismos hipertermófilos. El Ciclo de Krebs es incompleto y la derivación del glioxilato está ausente. El análisis de las vías de degradación y de las vías biosintéticas de la pirimidina, purina y hemo sugiere que *H. pylori* utiliza varios sustratos como fuente de nitrógeno, incluyendo urea, amoníaco, alanina, serina y glutamina. **(Kusters et al., 2006)**

3.5 Genoma de *Helicobacter pylori*

En la actualidad se conoce el genoma completo de *H. pylori*, esto se ha logrado gracias a las técnicas de secuenciación. Varias cepas se han secuenciado, pero las más destacadas por su amplia caracterización han sido la cepa J99 y la 26695.

3.5.1 Cepa de *H. pylori* 26695

En 1997 fue secuenciada la primera cepa de *H. pylori* (26695), de un paciente de origen inglés con gastritis crónica. Esta cepa, presenta un cromosoma circular con un tamaño de 1.67 Mb con un contenido de GC de aproximadamente 39%, contienen 36 especies de tRNA y 7 de rRNA, cuenta con dos secuencias de inserción (IS605, IS606), en su cromosoma se encuentran 1,555 genes que codifican aproximadamente 1,445 proteínas. **(Dong, 2009)**

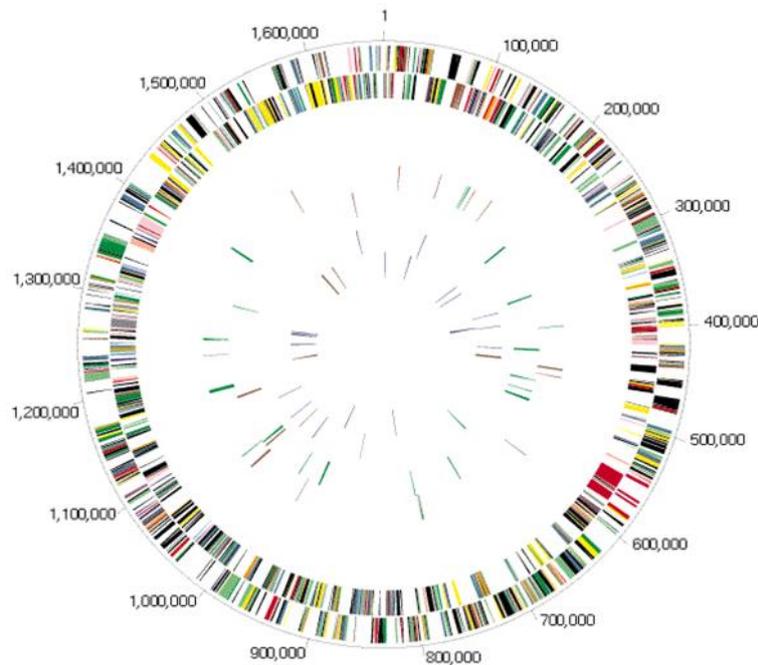


Figura 6. Genoma completo de la cepa 26695 de *H. pylori*.

3.5.2 Cepa de *H. pylori* J99

En 1999, la cepa J99 se secuenció, de un paciente estadounidense que presentaba úlcera duodenal. En comparación con la cepa 26695, tiene un cromosoma circular ligeramente más pequeño (1.64 Mb), tiene un porcentaje de GC de 35 %; los marcos de lectura abiertos previstos son menores en la cepa J99, que asciende a 1495. Hay 1406 genes compartidos por ambas cepas, pero 86 marcos de lectura abiertos están ausentes de la cepa 26695. **(Dong, 2009)**

3.5.3 Otras cepas de *H. pylori*

En el año 2006 se secuenció una cepa de *H. pylori* procedente de una paciente con gastritis crónica atrófica de 80 años de edad, llamada cepa HPAG1. Similar a las cepas secuenciadas 26695 y J99, el tamaño del genoma de esta cepa es de 1.59 Mb.

También se secuenció la cepa G27, originalmente aislada de un paciente italiano, la cual ha sido utilizada ampliamente en la investigación de *H. pylori*. Lo característico de esta cepa es que es transformable, tiene un tamaño similar a las demás cepas (1.65 Mb) y un contenido de GC del 38.9%. **(Dong, 2009)**



Una cepa de origen mexicano, 29CaP fue aislada de un paciente con adenocarcinoma gástrico crónico, se secuenció utilizando tecnologías tales como: PacBio RS, Illumina MiSeq 2000 y 454 Titanium. Tiene un tamaño de 1.6 Mb, con un contenido de GC del 38%, 1615 genes, 117 pseudogenes, 36 tRNAs, 7 rRNAs y un RNA no codificante. Además, en el análisis esta cepa mostro la ausencia de la isla de patogenicidad, un genotipo de VacA s2i2m2 y la presencia de un fago con una secuencia de 31.7 Kb. **(Mucito-Varela et al., 2016)**

Tabla 2. Tabla comparativa del genoma de las diferentes cepas de *H. pylori* y otras especies de *Helicobacter*.

| Especies | <i>Helicobacter pylori</i> | | | <i>H. acinonychis</i> | <i>H. hepaticus</i> |
|-------------------------------|----------------------------|----------|----------|------------------------------|---------------------|
| Cepa | 26695 | J99 | HPAG1 | Sheeba | ATCC51449 |
| Origen | Clínica | Clínica | Clínica | Felinos | Roedores |
| Tamaño (bp) | 1 667 867 | 1643 831 | 1596 366 | 1553 928 | 1 799 146 |
| Contenido GC (%) | 39 | 35 | - | 38.2 | 35.9 |
| Plásmidos | No | No | pHPAG1 | pHac1 | No |
| Elementos de inserción | IS605, IS606 | IS606 | No | ISHa1675, ISHa1942, ISHa1152 | No |
| Isla genómica | cag PAI | cag PAI | cag PAI | HacGI | HHGI1 |

Modificado de Dong, 2009

3.6 Factores de virulencia

Un factor de virulencia es un componente de la bacteria capaz de inducir y participar en el mecanismo de desarrollo de la enfermedad. Las cepas que poseen estos factores de virulencia están más asociados a pacientes con manifestaciones clínicas más severas. Los factores de virulencia de *H. pylori* desempeñan un papel inevitable en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales a través de la inflamación de la mucosa gástrica. **(Abadi & Perez-Perez, 2016)**. Entre los factores de virulencia por ejemplo se pueden encontrar proteínas de membrana de la bacteria, enzimas, toxinas, proteínas secretoras etc., que le permitan la colonización, persistencia y daño a la mucosa gástrica.



3.6.1 Motilidad

La motilidad de *H. pylori* es un factor clave para la colonización de la mucosa gástrica, para ello se necesita la expresión de dos proteínas flagelares, FlaA y FlaB, los cuales codifican para la síntesis de flagelos que se requieren para la motilidad completa de esta bacteria. Otros componentes de la estructura flagelar que también han demostrado ser esenciales para la motilidad y la colonización incluyen la proteína de gancho FlgE y FliD. La biogénesis flagelar es un proceso bien regulado mediante un gen, el *flhA*, el cual controla la expresión de *flaA*, *flaB* y *flgE*. (Dunne et al., 2014) Al igual su forma helicoidal de esta bacteria le ayuda a poder colonizar la mucosa gástrica. (Yang & Cui, 2017)

3.6.2 Ureasa

H. pylori es un microorganismo no acidófilo, ya que sobrevive en un rango de pH de 4-8 sin la presencia de urea y en presencia de urea sobrevive a un pH de 2.5; por lo que esta bacteria produce la enzima ureasa que hidroliza la urea a NH_3 y CO_2 (Figura 6). La generación de NH_3 proporciona capacidad de neutralización de ácido, lo que permite a *H. pylori* colonizar elevando el pH en su microambiente y periplasma. (Dunne et al., 2014)

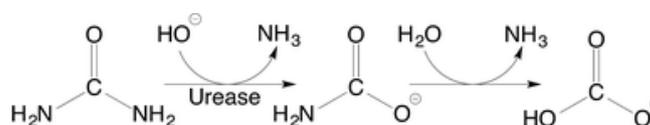


Figura 7. Reacción de la enzima ureasa

La enzima ureasa tiene un tamaño aproximadamente de 600 kDa, el cual consiste de un complejo de 12 subunidades de UreA y UreB. La proteína se produce originalmente como una apoenzima inmadura, la activación tiene lugar cuando cuatro proteínas chaperonas, UreE, UreF, UreG y UreH se colocan en el sitio catalítico de la proteína, además de iones Níquel, así como la hidrólisis de GTP (Biagi, Musiani, & Ciurli, 2013)

Esta enzima se encuentra tanto en el citoplasma como en la superficie de *H. pylori*. La regulación de pH del periplasma se produce a través de la conversión de CO_2 en HCO_3^- por la anhidrasa α -carbónica periplasmática, el HCO_3^- actúa conjuntamente con NH_3 para amortiguar el pH, generando condiciones neutras. Los datos anteriores son una evidencia de que la enzima ureasa de *H. pylori* es un factor absolutamente esencial para la supervivencia del organismo en el estómago humano. (Dunne et al., 2014)



3.6.3 Proteínas de membrana externa

En las bacterias, las proteínas de membrana externa por sus siglas en inglés OMPs, tienen muchas funciones, entre ellas están la importación de nutrientes y la traducción de señales desde el ambiente exterior donde se encuentran; las OMPs de las bacterias desempeñan un papel fundamental en la colonización, la expresión de factores patogénicos y la resistencia a los antibióticos. En 1997, cuando se secuenció por primera vez el genoma de *H. pylori* cepa 26695, se encontró que tenía 32 OMPs codificables, estudios posteriores revelaron que la adhesina de unión a ácido siálico (SabA), la adhesina de unión a antígeno-grupo sanguíneo (BabA), la lipoproteína A y B asociada a adherencia (AlpA / B), la proteína inflamatoria externa A (OipA) y la membrana externa de Helicobacter Proteína Q (HopQ) participan en la adhesión.

3.6.3.1 Bab A

BabA se identificó como la primera molécula de adhesina de *H. pylori*, y esta proteína puede unirse al antígeno sanguíneo Lewis B (Le^b), esta unión se da entre estructuras fucosiladas. La particularidad que tiene esta proteína es que tiene un alto nivel de heterogeneidad, ya que presentan diversos polimorfismos y un alto nivel de variación alélica. **(Dunne et al., 2014)**

3.6.3.2 Sab A

H. pylori se puede unir a estructuras sialiladas que se encuentran en la mucosa gástrica y en las células epiteliales a través de la adhesina de unión ácido siálico, **SabA**. Esta adhesina es importante para la colonización y la inducción de inflamación en la mucosa gástrica. **(Dunne et al., 2014) (Matsuo et al., 2017)**. SabA también se une a los receptores sialilados que tienen los neutrófilos, y presenta actividad hemaglutinante, uniéndose a gangliósidos en los eritrocitos.

3.6.3.3 Oip A

OipA se identificó como una proteína que induce una respuesta pro inflamatoria ya que es capaz de inducir la producción de IL-8 en las células epiteliales gástrica. Se sugiere que OipA también induce la remodelación de las fibras de estrés de actina, activando la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) lo cual da un crecimiento epidérmico alterado. **(Matsuo et al., 2017)**



3.6.3.4 Alp A/B

AlpA y AlpB están involucrados en la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas, al colágeno IV y a la laminina, que existen en la matriz extracelular. Existe una homología del 46.7% con las proteínas de BabA y BabB por lo que ambas proteínas son importantes para la colonización en las células de la mucosa gástrica. **(Matsuo et al., 2017)**

3.6.4 DupA

El gen promotor de ulcera duodenal (*dupA*) se localiza en la región de plasticidad de *H. pylori*, y es codificada por los genes *jhp0917* y *jhp0918*, la presencia de estos genes se ha asociado con la presencia de ulcera duodenales. Se sugiere que la producción de IL-8 conlleva posiblemente la liberación de DupA causando una gastritis predominante, además la inflamación de la mucosa y la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) conduciendo a la aparición de la ulcera duodenal. **(Abadi & Perez-Perez, 2016)**

3.6.5 Citotoxina VacA

VacA es otro factor importante que se ha indicado para tener efectos sobre la virulencia de *H. pylori*, la actividad de esta proteína se encontró cuando se demostró que los filtrados de esta bacteria inducen grandes vacuolas en las células epiteliales gástricas. El gen *vacA* que codifica para esta toxina se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, pero no todas las cepas sintetizan la proteína VacA; cuando esta es producida puede permanecer en la superficie bacteriana o ser secretada como una toxina de aproximadamente 88 kDa mediante el sistema de secreción de tipo II. **(Jones, Whitmire, & Merrell, 2010).**

El gen *VacA* es considerado polimórfico, se han definido tres regiones de variación y hay al menos dos principales variantes en cada región; las regiones se designan: región señal (S), región intermedia (i) y la región media (m). La región s de *VacA* se encuentra en la parte p33 de la toxina e influye en la actividad de vacuolización y la eficacia de la formación de canales aniónicos; la variante s2 sufre una escisión en un sitio alternativo, proporcionando así una extensión de 12 aminoácidos hidrofílicos, la variante s1 contiene más aminoácidos hidrófobos cerca del sitio de escisión que la variante s2; por lo tanto, la secuencia s1 se inserta más fácilmente en la membrana de la célula huésped. La región m se encuentra en la porción p55 de la toxina e influye en el tropismo de la célula huésped; la región m1 tiene mayor virulencia. La región i se encuentra entre las regiones s y m, esta región es el mejor indicador de severidad de la enfermedad. **(Jones, Whitmire, & Merrell, 2010)**

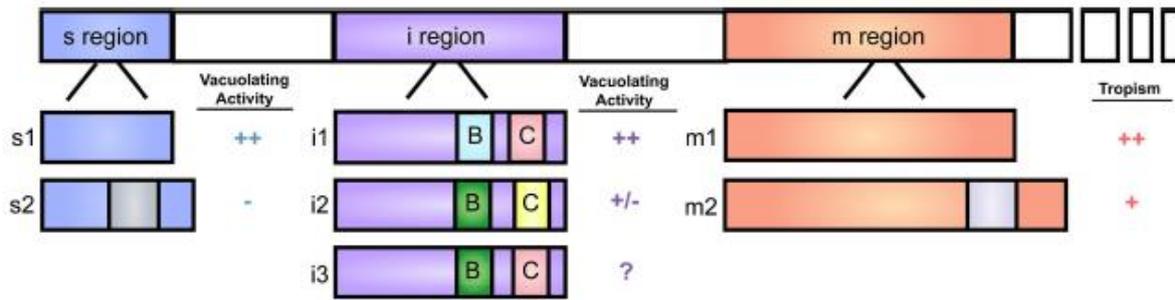


Figura 8. Representación esquemática del gen *vacA* con las 3 regiones polimórficas (s, i, m) y los alelos de cada región. (Jones et al., 2010)

Esta citotoxina causa múltiples efectos celulares además de la vacuolación celular, entre ellos:

- Despolarización del potencial de membrana
- Disfunción mitocondrial
- Autofagia provocando la muerte celular
- Activación de proteína cinasas por mitógenos
- Inhibición de las actividades de linfocitos T

La mayoría de las alteraciones celulares inducidas por VacA requieren la oligomerización de la toxina, que se inserte en la bicapa lipídica para formar un canal de membrana y la internalización a la célula. (Pyburn et al., 2016)

3.6.6 Isla de Patogenicidad *cagPAI*

El descubrimiento de la isla de patogenicidad (*cagPAI*) de *H. pylori* fue un paso importante para comprender la patogenicidad de esta bacteria. Esta isla se encuentra dentro de su genoma, tiene un tamaño de 37 a 40 Kb (Bergé & Terradot, 2017), se cree que *cagPAI* ha sido originalmente heredado durante la transferencia horizontal de genes (mediante el proceso de conjugación). Esta isla codifica de 27 a 30 genes, entre ellos para la proteína CagA y un sistema de secreción de tipo IV (T4SS), el cual funciona como una jeringa molecular para la translocación de CagA al citoplasma de las células epiteliales gástricas. (Tohidpour, 2016). Al igual *cagPAI* está implicada en inducción de citosinas pro inflamatorias de las células huésped principalmente la interleucina 8 (IL-8); varios estudios han demostrado que de 14 a 17 de los 27 genes que contiene la *cagPAI*, son indispensables para la translocación de CagA y la inducción completa de IL-8. (Nguyen et al., 2008)

A nivel genético, de acuerdo con análisis del genoma de *H. pylori*, *cagPAI* es considerada la principal zona variable en todo el genoma de la bacteria. Está constituida por un marco abierto



de lectura (ORF), rodeada por 31pb de repeticiones directas, las cuales contienen sitios de recombinación que corresponden con los últimos nucleótidos del gen *glr* (glutamato racemasa), es decir, que *cagPAI* se encuentra entre el gen *glr* y un ORF cuya función aún no se ha descrito, conocido como ORF5 (HP0519). Tanto río arriba como río abajo tiene secuencias de inserción, llamadas elementos IS605, las cuales varían en número dependiendo de la cepa. (Arévalo, Trespacios, & Otero, 2009)

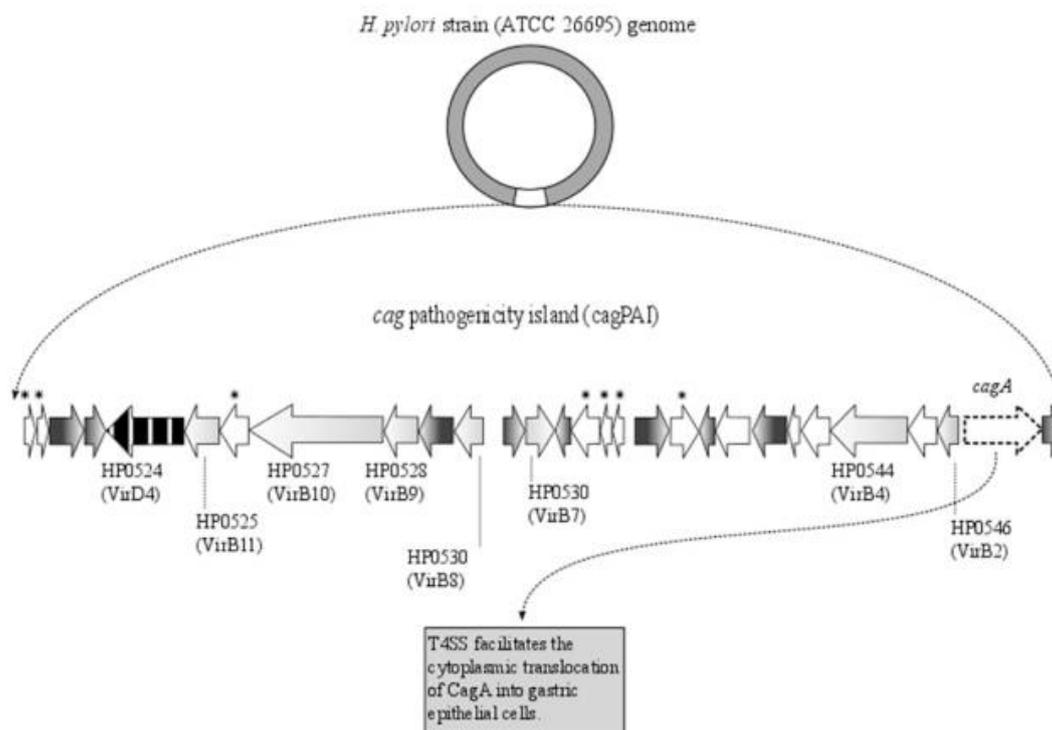


Figura 9. Localización de la isla de patogenicidad en el genoma de *H. pylori* y los genes que lo constituyen, entre ellos el gen *cag A*

3.6.7 Cag A

Las cepas virulentas de *H. pylori* expresan una proteína inmunodominante de 120-145 kDa denominada gen asociado a la citotoxina A (CagA). Una de las características de CagA es la capacidad de interactuar con las cinasas de la célula huésped y someterse a modificaciones de fosforilación de tirosina. El sitio de fosforilación de CagA incluye una serie conservada de aminoácidos en el carboxilo terminal el cual consiste en Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (denominada región EPIYA). (Tohidpour, 2016).

Cuando ocurre la translocación de CagA al citoplasma de las células epiteliales gracias se pierde la homeostasis de ellas, provocando una inflamación crónica y malignidad en las



células, generando que haya un cambio en la polaridad de estas y posteriormente apoptosis celular. CagA fue llamada la primera oncoproteína de origen bacteriano. **(Backert & Tegtmeyer, 2017)**. Cabe mencionar que no todas las cepas de *H. pylori* producen esta proteína, por lo que hay cepas que se les denominan CagA⁻

3.6.7.1 Secreción de la proteína CagA a través del sistema de secreción tipo IV

Para que la proteína CagA haga su posible efecto oncogénico sobre la célula hospedera, esta tiene que salir del citoplasma de la bacteria hasta el exterior, y lo hace gracias al Sistema de Secreción tipo IV (T4SS). Este T4SS representa una estructura similar a la de una aguja que sobresale de la superficie bacteriana y es inducida por el contacto de la célula huésped para inyectar factores de virulencia. Los transportadores T4SS típicamente consisten de 11 proteínas VirB (codificadas por genes *virB1-virB11*) y la llamada proteína de acoplamiento (la NTPasa VirD4); estas proteínas se pueden agrupar en tres categorías: (a) los componentes centrales o el canal putativo (VirB6-10); (B) los componentes asociados al pili (VirB2, y posiblemente VirB3 y VirB5); y (c) los componentes energéticos (las NTPasas: VirB4 y VirB11). **(Figuras 10 y 11)**

Para que ocurra todo este ensamblaje, la peptidasa I elimina péptidos señal de precursores del componente principal pilus VirB2 y el componente menor pilus VirB5, seguido por la ciclación de VirB2 por un factor desconocido. VirB2 y VirB5 procesados posteriormente se asocian con las membranas estabilizadas por VirB4 y VirB8. Una vez que se ha ensamblado el T4SS, para que se pueda transportar CagA a la célula epitelial se requiere que el sistema de secreción interactúe con un receptor específico en la célula huésped, por lo que se ha propuesto que las integrinas podrían interactuar con la proteína CagL. Las integrinas son moléculas transmembranales de adhesión célula-célula y célula-matrix extracelular que se unen a motivos Arg-Gly-Asp (RGD); CagL contiene estos motivos por los cuales posiblemente suceda la interacción del pili a la integrina $\alpha_5\beta_1$ para que posteriormente se inyecte la proteína CagA. Transcurrido el ensamblaje del T4SS y la adhesión a la célula epitelial, se transloca la proteína CagA para lo cual se requiere de la proteína CagF que actúa como chaperona uniéndose a la porción C-terminal de la secuencia señal de la proteína CagA hasta que esta es translocada a la célula epitelial. **(Tegtmeyer et al., 2016)**

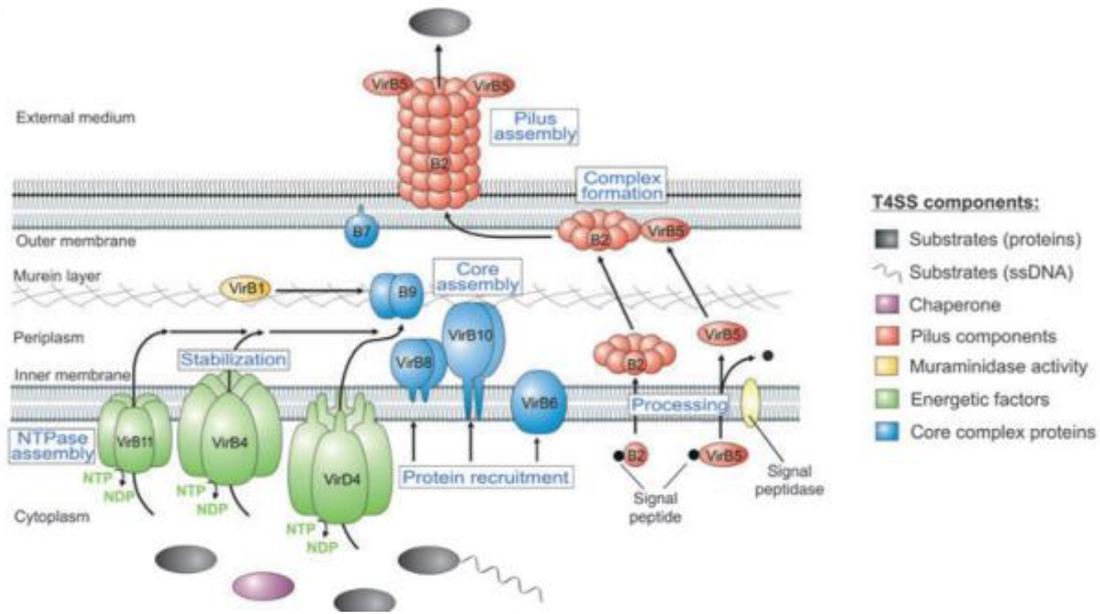


Figura 10. Estructura del Sistema de Secreción tipo IV, el cual es empleado por *H. pylori* para liberar a las células la proteína CagA (Tegtmeier et al., 2011)

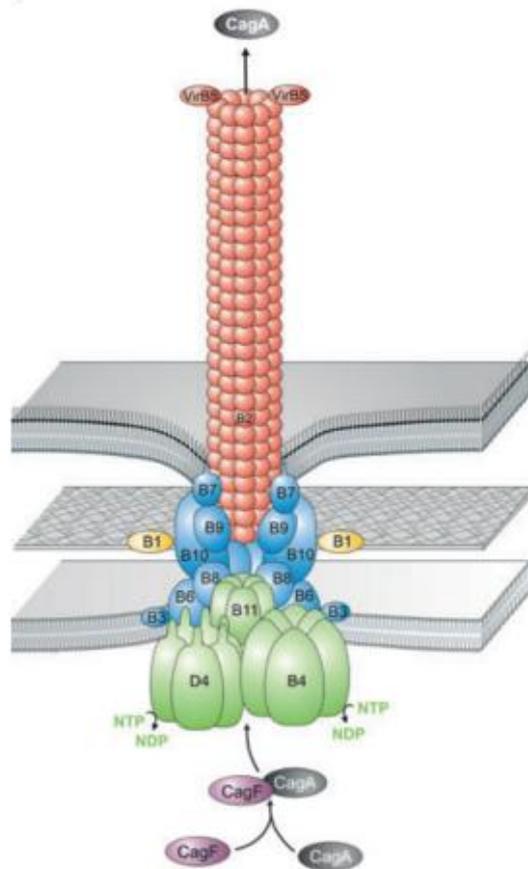


Figura 11. Ensamblaje de los componentes del T4SS para la liberación de la proteína CagA (Tegtmeier et al., 2011)



3.7 Genes de la zona de plasticidad

Dentro del genoma de *H. pylori* hay un conjunto de genes que se encuentran sólo en ciertas cepas, estos son de especial interés porque su ganancia o pérdida pueden estar implicados en la virulencia de la bacteria. Algunos de estos "genes específicos de cepa" están en elementos de DNA móviles, que pueden insertarse en genomas sin necesidad de la homología del DNA requerida para la recombinación generalizada clásica.

Con la comparación completa del genoma de *H. pylori* de las cepas 26695 y J99 se reveló la existencia de genes específicos de cepa en esta bacteria y que más de la mitad de ellos se agrupan en regiones hipervariables, conocidas como regiones de plasticidad o Zonas de Plasticidad. Estas regiones se caracterizan por tener un bajo contenido de G+C en comparación con el resto del genoma lo que sugiere la transferencia horizontal de genes. Las zonas de plasticidad se consideran elementos transponibles llamados TnPZ, el cual se compone generalmente de:

- Un grupo de genes para la proteína de secreción de tipo IV (*tfs3*)
- Un gen de la familia de la tirosina recombinasa ("*xerT*")
- Un ORF que codifica una proteína helicasa y dominios de DNA metilados.

Estas zonas de plasticidad se han estudiado principalmente en la cepa J99 de *H. pylori*, en ella tiene un tamaño de 45 kb y está conformada por 48 genes continuos que van del *jhp0914* al *jhp0961*. Algunos genes tienen homología con el factor *virB4* como es el caso *jhp0917* y *jhp0918* que codifican para el gen *dupA*. Otros genes que se encuentran en esta zona de plasticidad se asocian frecuentemente con un mayor riesgo de enfermedades gastroduodenales tales como la gastritis, ulcera duodenal y cáncer gástrico, los cuales son: *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*. (Romo-González et al., 2015)

3.8 Enfermedades asociadas

Para que *Helicobacter pylori* pueda causar esa gran gama de patologías, primero tiene que colonizar la mucosa del estómago del humano, el cual es el reservorio natural de esta bacteria. La anatomía del estómago está formada por antro pilórico, cuerpo, incisura, fondo (Figura 12).

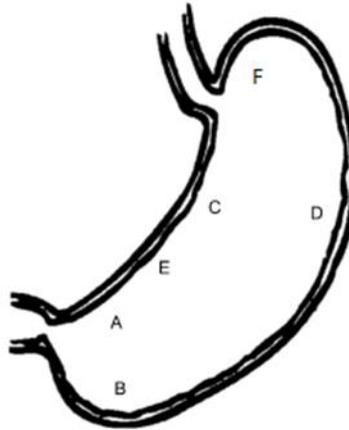


Figura 12. Anatomía del estómago; en donde A) curvatura menor de antro; B) curvatura mayor de antro; C) curva menor de cuerpo; D) curvatura mayor de cuerpo; E) incisura angularis; F) fondo.

H. pylori tiene preferencia por colonizar la región del antro, la cual es la región menos ácida del estómago, aunque también puede colonizar el cuerpo, bajo condiciones de baja secreción de ácido, así como las regiones de incisura y fondo. **(Park & Kim, 2015)**

3.8.1 Colonización de la mucosa gástrica

La capa gruesa de moco que recubre las células epiteliales del tracto gastrointestinal actúa como una barrera física que ayuda a que los microorganismos patógenos no interactúen ni colonicen el epitelio subyacente. Aproximadamente el 80% de *H. pylori* se encuentra vivo en el moco gástrico en lugar de estar en contacto con el epitelio, para ello esta bacteria tiene la capacidad de alterar la estructura del moco, ya que se ha identificado un sistema de tiorredoxina, que reduce las interconexiones con los enlaces disulfuro de la mucina, esto reduce la capacidad de formación de gel; también la capacidad de neutralizar el pH del estómago por la acción de la enzima ureasa, ya que a pH elevados se va perdiendo la consistencia del moco lo que hace más fácil que *H. pylori* lo pueda penetrar, además de su forma helicoidal (forma de sacacorchos), se ha demostrado que forma microcolonias dentro del moco y que interactúa con una proteína llamada MUC5AC. Además de la mucina, se ha demostrado recientemente que *H. pylori* puede interactuar con glicolípidos unidos a mucina directamente, como el caso de TFF1, un miembro de la familia de proteínas que se coexpresan con MUC5AC en el estómago. Ese pequeño porcentaje que interactúa con las células epiteliales gástricas lo hacen gracias a las proteínas de membrana que expresa *H. pylori* como BabA y SabA, los cuales actúan como adhesivos en la célula hospedera. Después de la unión de *H. pylori* a las células epiteliales el organismo manda señales a las células para subvertir su función, dando lugar al desarrollo de la patología. **(Dunne et al., 2014)**

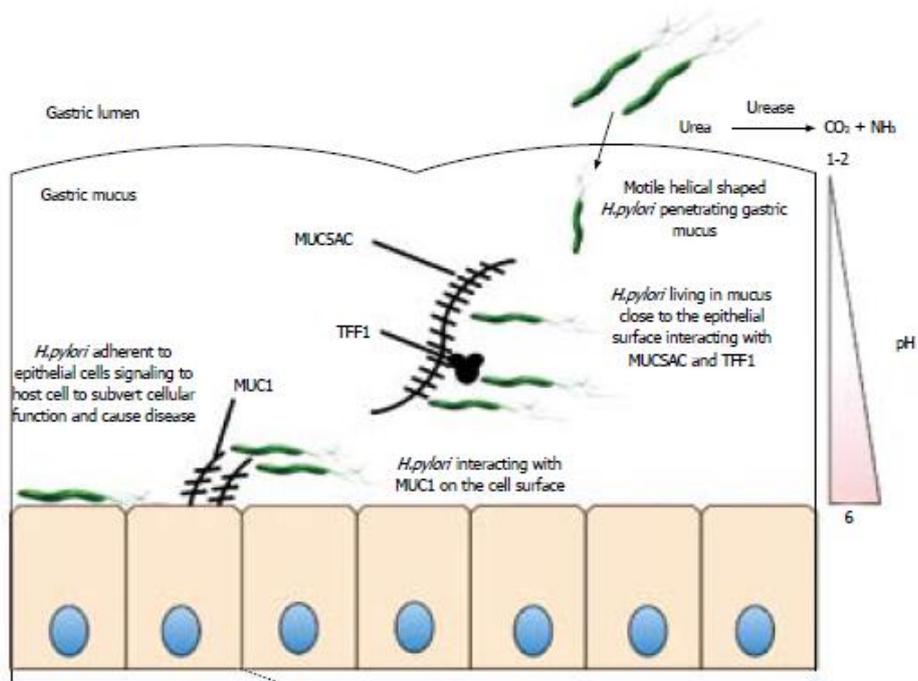


Figura 13. Penetración de la mucosa gástrica de *H. pylori* y su adhesión a las células epiteliales. (Dunne et al., 2014)

Después de la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas es mediada por las proteínas BabA y SabA, CagA es trasladado a las células epiteliales a través del T4SS, lo que contribuye a la alteración de una miríada de señales de transducción, que afecta la fisiología de la célula huésped, por otro lado, VacA induce la vacuolación citoplasmática, la apoptosis y la inmunosupresión. (Zhang, 2016)

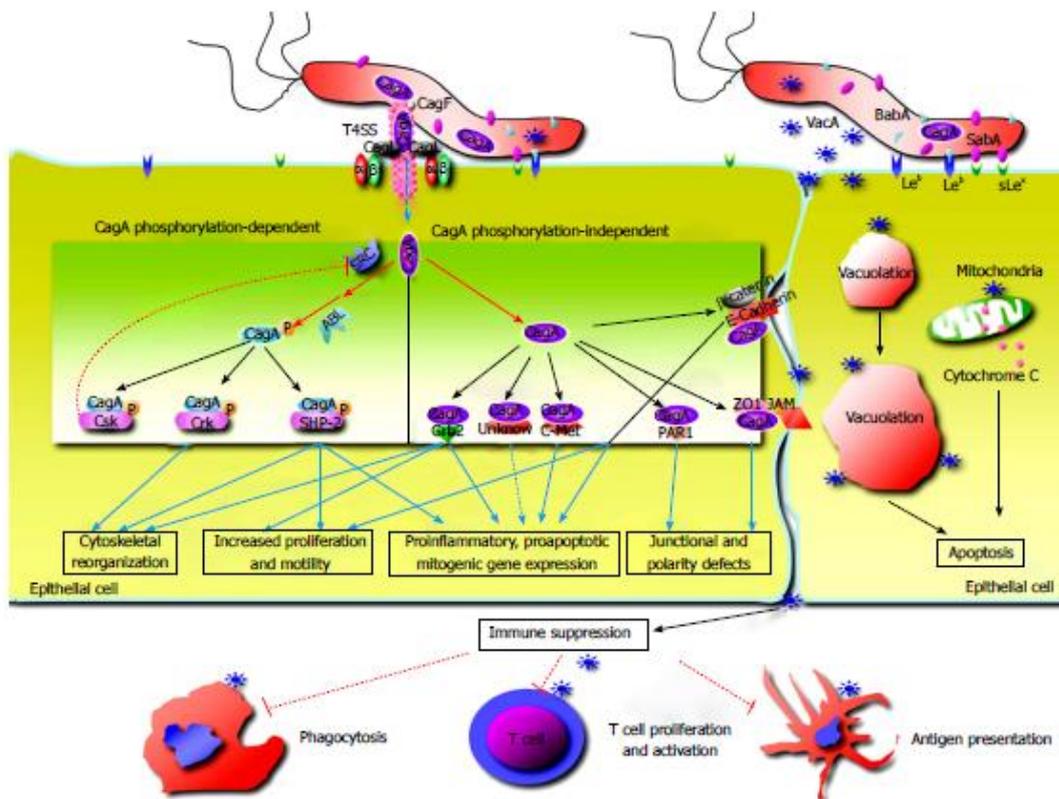


Figura 14. El papel de los principales factores de virulencia en la patogénesis de *H. pylori*. (Zhang, 2016)

3.8.2 Manifestaciones clínicas

La infección por *H. pylori* está asociada con gastritis crónica, úlcera duodenal o cáncer gástrico en adultos.

Infección por *H. pylori* en niños

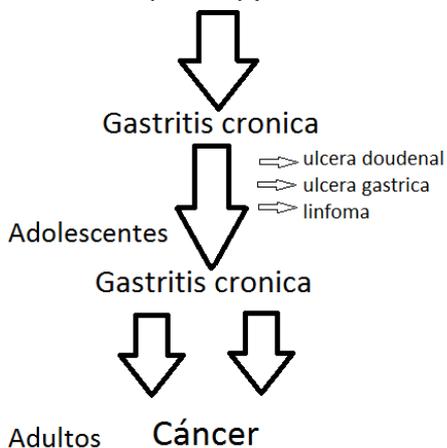


Figura 15. Historia Natural de la Enfermedad por la infección de *H. pylori*. Modificado (Javier Torres et al., 2000)



Aunque solo alrededor del 20-30% de las personas infectadas desarrollan alguna patología gastroduodenal y menos del 3% puede llegar a desarrollar cáncer gástrico, esto depende no solo de la virulencia de la bacteria, sino de factores propios del huésped y ambientales. Un aspecto importante es que normalmente esta infección se adquiere en la niñez (**Mourad-Baars et al., 2006**), teniendo una prevalencia del 30-50% dependiendo de la región geográfica; en países como México los reportes que se tienen sobre prevalencia de *H. pylori* puede variar, dependiendo del rango de edad; se ha encontrado que a los 10 años el 50% puede estar infectado (**Torres et al., 1998; Belkind-Gerson et al., 2001**). A diferencia de la infección en adultos, los niños pueden presentar cualquiera de los siguientes escenarios: 1) Infección y eliminación espontánea; 2) Presentar manifestación clínica como el dolor abdominal recurrente (DAR) de tipo orgánico asociado a *H. pylori*; 3) estar infectado recibir tratamiento de erradicación y eliminar la infección; 4) Infección y desarrollo de alguna patología gastroduodenal como gastritis, y con menor frecuencia úlcera-péptica (úlceras duodenal o úlcera gástrica) y Linfoma tipo MALT; y 5) la posibilidad de estar infectado, permanecer asintomático por largo tiempo (infección crónica) con el riesgo de desarrollar alguna enfermedad gastroduodenal a largo plazo. (**Duque et al., 2012**)

El dolor abdominal recurrente (DAR) de tipo orgánico es la entidad que algunos estudios han asociado con la presencia de *H. pylori* en niños. Esta entidad se define por la presencia de al menos tres episodios discretos de dolor, lo suficientemente debilitantes como para interferir con la actividad de rutina y que estos ocurren 3 meses o más durante el año anterior al examen clínico. Bajo esta definición clásica de Apley, DAR puede verse en un concepto mucho más amplio que incluye diferentes patrones de dolor abdominal en los niños, tales como dolor periumbilical paroxístico, dolor epigástrico, dispepsia y dolor abdominal inferior con alteración en los patrones intestinales, esto afecta a alrededor del 10% de los niños, generalmente entre los 5-14 años de edad. (**Javier Torres et al., 2000**)



Tabla 3 Comparación de la presencia de las manifestaciones clínicas por *H. pylori* en niños y adultos.

| Condición | Niños y Adolescentes | | Adultos (%) |
|----------------------------|----------------------|--------|-------------|
| | % | Rango | |
| Gastritis crónica activa | 95 | 90-100 | 90-100 |
| Úlcera duodenal | 92 | 33-100 | 88-100 |
| Úlcera gástrica | 22 | 11-75 | 58-100 |
| Dolor abdominal recurrente | 22 | 0-81 | NA |
| Dispepsia no ulcerosa | NA | NA | 40-80 |
| Cáncer gástrico | NA | NA | 46-94 |

*NA: No Aplica

(Torres et al., 2000)

3.9 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante una combinación de pruebas, tanto invasivas como no invasivas. Teniendo en cuenta el amplio espectro de los métodos de diagnóstico, en la práctica clínica sólo deben utilizarse pruebas precisas en circunstancias específicas y, en la actualidad, la sensibilidad y la especificidad de dichas pruebas deberían superar el 90%. La elección de las pruebas generalmente depende de las circunstancias clínicas, la razón de probabilidad de las pruebas positivas y negativas, la rentabilidad de la estrategia de pruebas y de la disponibilidad de las pruebas. (Lopes et al., 2014)

3.9.1 Métodos invasivos

Se le denomina invasivo en aquellas pruebas donde se requiere de la toma de una biopsia gástrica mediante una endoscopia. Dentro de ellos se incluyen:

Histología. La tinción estándar para teñir la muestra de biopsia es con Hematoxilina-Eosina, en la cual nos ayuda a visualizar inflamación del tejido (tipo de gastritis) y visualizar la presencia de *H. pylori*. Se utilizan también otros tipos de tinciones, con plata o Giemsa. (Rajindrajith et al., 2009)



Cultivo. El cultivo de *H. pylori* se realiza en muestras de biopsia gástrica, debido a que esta bacteria muestra una distribución irregular en la mucosa, se puede hacer el cultivo de antro, cuerpo o fondo; por lo que esta prueba es el estándar de oro para el diagnóstico. Como *H. pylori* es considerado una bacteria fastidiosa, para su cultivo se utilizan medios ricos tales como agar sangre o agar chocolate, algunas veces suplementados con suero de carnero y son incubados en una atmosfera de CO₂ (entre 5% al 10 %) **(Lopes et al., 2014)**. El cultivar la bacteria da la ventaja de evaluar la sensibilidad a los antibióticos.

Prueba rápida de ureasa. RUT (por sus siglas en inglés) es utilizada para determinar la actividad de la enzima ureasa presente en *H. pylori*, en ella se coloca la biopsia sobre un medio que contiene urea disponible comercialmente. La hidrólisis de la urea por la ureasa, provoca un cambio de color en los productos químicos sensibles al pH del medio, lo cual nos permite identificar a la bacteria si está presente. **(Rajindrajith et al., 2009)**. CLOtest es el más utilizado en la clínica.

Métodos moleculares. Las pruebas moleculares, realizadas con DNA de la biopsia lo cual nos puede proporcionar una detección más rápida, precisa y sensible de la bacteria que los métodos convencionales, con posibilidad de extensión a otros fines, como la detección de mutaciones relacionados con la resistencia a antibióticos y determinantes de virulencia. Además de biopsias gástricas se pueden utilizar muestras biológicas distintas de las biopsias gástricas, como muestras de heces o cavidades bucales. Cualquiera que sea el caso, la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR está casi siempre presente, ya sea por PCR convencional o por PCR en tiempo real. **(Lopes et al., 2014)**

3.9.2 Métodos no invasivos

Prueba de aliento. La prueba de aliento con urea marcada ¹³C-urea, utiliza un isotopo de urea (¹³C) el cual es ingerido por el paciente, interpretándose de la siguiente manera, si presenta infección por *H. pylori*, la ureasa de la bacteria descompone a la urea marcada en iones amonio y ¹³CO₂ el cual está marcado, este se absorbe por el torrente sanguíneo en donde se detecta y se mide por aire expirado utilizando un espectrofotómetro de masas. **(Guarner, Kalach, Elitsur, & Koletzko, 2010)**

Serología. En ella se buscan anticuerpos contra *H. pylori*, o en su caso antígenos del mismo. La presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *H. pylori* nos indica una infección activa porque una vez que un individuo es colonizado, la infección continúa durante toda la vida a menos que se instituya un curso de terapia de erradicación apropiada, la búsqueda de



inmunoglobulinas séricas (Ig) A o M no son fiables para detectar la colonización gástrica, por lo tanto, sólo se utilizan anticuerpos IgG en la práctica de laboratorio clínico, para ello se utilizan inmunoensayos como ELISA. Otro enfoque novedoso en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* es la detección de antígeno bacteriano en las heces, para su detección se utilizan métodos inmunocromatográficos. **(Rajindrajith et al., 2009)**



Tabla 4 Resumen de los métodos de diagnóstico para *H. pylori*.

| Métodos de diagnóstico | Sensibilidad y especificidad | Tiempo requerido | Detección bacteria | | Aplicación | Observaciones |
|----------------------------------|------------------------------|------------------|--------------------|-----------|---|--|
| | | | Viable | No viable | | |
| Histología | >95% | 1-2 días | Si | Si | Alternativa del estándar de oro | Requiere un patólogo experto; también proporciona datos sobre inflamación y atrofia |
| Cultivo de biopsia | >95% | 5-7 días | Si | - | Prueba considerada el estándar de oro para el diagnóstico | Permite la prueba de sensibilidad antimicrobiana; requiere experiencia microbiológica específica |
| Prueba rápida de ureasa | >90% | <1 día | Si | - | Prueba rentable y rápida | Requiere una prueba adicional para la confirmación de la infección por <i>H. pylori</i> |
| Prueba de aliento | >90% | <1 día | Si | - | Alternativa del estándar de oro | Prueba muy útil y confiable para evaluar el éxito del tratamiento para la erradicación de <i>H. pylori</i> ; disponibilidad limitado debido al requerimiento de equipo |
| Prueba del antígeno fecal | >90% | 1 día | - | Si | Todavía no se utiliza ampliamente | Prueba simple, pero puede no ser confiable para la evaluación del éxito del tratamiento de <i>H. pylori</i> |
| Serología | 80-90% | 1-2 días | NA | NA | Se utiliza para estudios epidemiológicos | No puede demostrar infección en curso debido a la memoria inmunológica |
| PCR (biopsia) | >95% | 1 día | Si | Si | Se puede buscar la presencia de factores de virulencia | Relativamente simple |

NA: No Aplica

(Kusters et al., 2006)



3.10 Tratamiento

En la actualidad se han propuesto una gran variedad de regímenes de tratamiento para la erradicación de *H. pylori*; en los últimos años, los regímenes que se utilizan son con inhibidores de la bomba de protones (IBP) en combinación con varios antibióticos como la amoxicilina más claritromicina o metronidazol, estos han sido considerados como el tratamiento de primera línea para la infección por *H. pylori*. **(Safavi et al., 2016)**

Debido a que *H. pylori* se localiza en la superficie ácida de la mucosa gástrica, se requiere un supresor de ácidos (es por eso que en el tratamiento se utiliza un inhibidor de la bomba de protones, IBP) para mantener un pH constante y facilitar la replicación bacteriana para aumentar la eficacia de los antibióticos. **(Arslan et al., 2017)**

3.10.1 Regímenes terapéuticos

- Terapia doble. En ella se incluye un IBP más claritromicina o amoxicilina o metronidazol. Es la más utilizada. El periodo de tratamiento es de 14 días.
- Terapia triple. Aquí se incluye un IBP, claritromicina, amoxicilina o metronidazol. Basándose en varios ensayos clínicos disponibles, parece que una terapia triple basada en quinolonas estará operativa como la terapia de primera línea en la infección por *H. pylori*. El uso de levofloxacino como una alternativa a la claritromicina en terapias triples y secuenciales ha sido investigado por la terapia triple basada en levofloxacina (levofloxacino, amoxicilina, esomeprazol). El periodo de tratamiento es de 14 días. **(Qian et al, 2012)**
- Terapia cuádruple. Comprende subcitrato de bismuto, IBP, metronidazol y tetraciclina, este régimen se ha aceptado mejor que la triple terapia estándar en varios estudios, ya que ha mostrado una tasa de éxito por encima del 95.8%. El periodo de tratamiento 10 a 14 días. **(Safavi et al., 2016).**

Las guías del Colegio Americano de Gastroenterología de 2007 recomiendan el tratamiento de primera línea al igual que el de terapia triple de 10 a 14 días. **(Talebi et al., 2017).**

3.11 Resistencia a antibióticos

H. pylori, al igual que algunas otras bacterias, adquiere resistencia a los antibióticos por mutaciones; todos los antibióticos que se han propuesto en los regímenes de erradicación pueden presentar dicha resistencia. El mecanismo no implica plásmidos que podrían ser transmitidos horizontalmente sino mutaciones puntuales que se transmiten verticalmente,



mientras que la transformación puede ser posible si dos cepas están presentes simultáneamente en el estómago, a consecuencia es un aumento progresivo en la tasa de resistencia debido a la presión de selección. **(Megraud & Lehours, 2007)**

Tabla 5 Genes involucrados en la resistencia a antibióticos en *H. pylori*.

| Antibióticos | Gen relacionado |
|----------------------|-------------------|
| Macrólidos | <i>rm 23S</i> |
| Metronidazol | <i>rdxA, frxA</i> |
| Quinolonas | <i>gyrA</i> |
| Rifampicina | <i>rpoB</i> |
| Amoxicilina | <i>pbp1</i> |
| Tetraciclinas | <i>rm 16S</i> |

La resistencia se da en los principales antibióticos que se presentan en la tabla 5 a consecuencia de varias modificaciones en la secuencia de los nucleótidos que constituyen a esos genes:

- **Macrólidos:** la resistencia a esta familia de antibióticos es la consecuencia de mutaciones puntuales en dos posiciones de la secuencia en los nucleótidos, 2142 (A2142G y A2142C) y 2143 (A2143G), que conducen a un cambio conformacional.
- **Amoxicilina:** Las cepas de *H. pylori* que albergan mutaciones en el gen *pbp-1* originan la sustitución de aminoácidos Ser-4143Arg.
- **Tetraciclinas:** la resistencia está involucrada debido a un cambio en el triplete AGA-926-928 por TTC.
- **Quinolonas:** su resistencia se asocia a una mutación puntual en el gen *gyrA* (en las posiciones 87, 88, 91).
- **Rifampicina:** mutaciones han sido descritas para el gen *rpoB* en las posiciones 524, 525 y 585 dando origen a dicha resistencia.
- **Nitroimidazoles:** Los 5-nitroimidazoles tienen que ser reducidos en la célula para alterar el DNA bacteriano. Un gen importante a este respecto es *rdxA*, una nitrorreductasa insensible al oxígeno. Mutaciones en *rdxA* pueden hacer la proteína ineficaz. Otras proteínas también pueden estar implicadas en este proceso de reducción, como la flavina oxidorreductasa (*frxA*). **(Megraud & Lehours, 2007)**



En un estudio que realizaron dos investigadores (Ebrahimzadeh Leylabadlo, H y Mohammadzadeh Asl Y) evaluaron de forma independiente de manera ciega los siguientes datos: (1) suma de bacterias incorporadas; (2) tasa de resistencia a antibióticos; y (3) el área geográfica involucrada. Los datos se muestran en la tabla y grafica siguientes

Tabla 6. Tasa de prevalencia de resistencia a antibióticos de *H. pylori* en diferentes regiones geográficas.

| Región (n) | Cla % | Amo % | Met % | Tet % | Lev % | Rif % | Fur % |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Asia (23748) | 27.46 | 23.61 | 46.57 | 7.38 | 25.28 | 12.45 | 23 |
| América del Sur (587) | 12.88 | 6.56 | 52.85 | 0 | 21.23 | NR | 0 |
| América del Norte (818) | 30.8 | 2 | 30.5 | 0 | 19 | NR | NR |
| Europa (26024) | 22.11 | 0.35 | 31.19 | 1.15 | 14.19 | 1 | NR |
| África (831) | 5.46 | 40.87 | 75.02 | 50 | 15 | NR | NR |
| Total (52008) | 19.74 | 14.67 | 47.22 | 11.70 | 18.94 | 6.75 | 11.5 |

NOTA: Amo: Amoxicilina; Cla: Claritromicina; Met: Metronidazol; Tet: Tetraciclina; Lev: Levofloxacino; Rif: Rifabutin; Fur: Furazolidona; n: numero; NR: No Reportado (Ghotaslou, 2015)

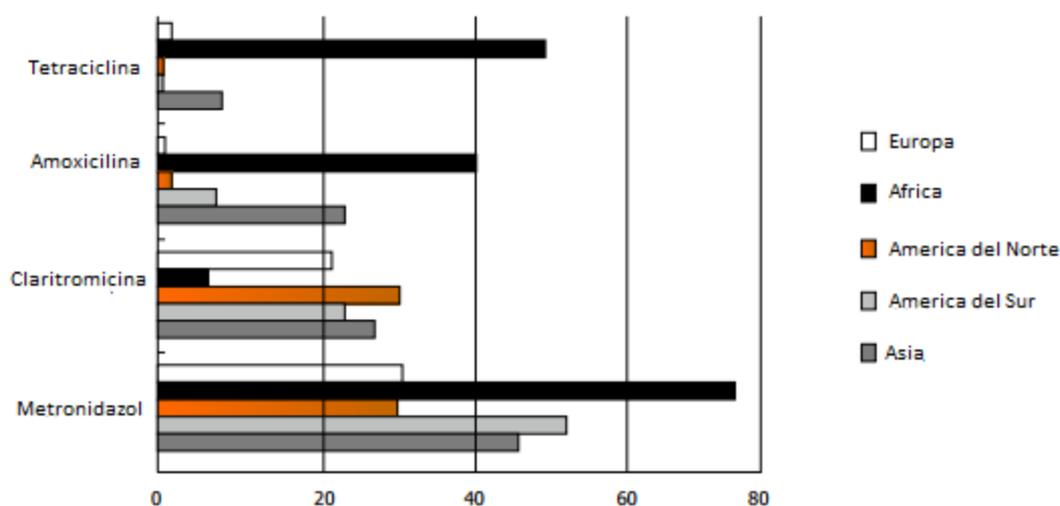


Figura 16. Tasa de resistencia de los diferentes antibióticos en las diferentes regiones geográficas. Modificado (Ghotaslou, 2015)



4. OBJETIVOS

4.1 General

Realizar el diagnóstico, genotipificación y sensibilidad a antibióticos de aislados de *Helicobacter pylori* de niños con dolor abdominal recurrente del Instituto Nacional de Pediatría.

4.2. Particulares

- Cultivo de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas.
- Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas mediante la técnica de PCR (genes *UreC* y *16S rRNA*).
- Realizar la genotipificación de los genes de virulencia: *dupA1*, *dupA2*, *VacAS1*, *VacAS1b*, *VacAm1*, *Jhp0945*, *Jho0947*, *Jhp0949a*, *Jhp0949b*, *Jhp0940*, *CagPAI* y *CagA* en los aislados de *H. pylori* positivos a cultivo.
- Realizar la prueba de sensibilidad a antibióticos mediante la técnica de dilución en placa en aislados de *H. pylori* positivos a cultivo.



5. HIPÓTESIS

Las biopsias gástricas de los niños con dolor abdominal recurrente presentan infección por *Helicobacter pylori* y sus principales genes de virulencia, así como resistencia a metronidazol y claritromicina.

6. JUSTIFICACIÓN.

Dar un diagnóstico de *H. pylori* en niños es difícil, ya que la mayoría no presenta sintomatología alguna; sin embargo, un cuadro clínico que pueden llegar a presentarse es el Dolor Abdominal Recurrente (DAR). La frecuencia de dolor abdominal crónico de etiología orgánica en el Instituto Nacional de Pediatría es de 75% en donde la enfermedad ácido-péptica con o sin *Helicobacter pylori* constituye el 52% de los casos.,

Además, otro de los problemas que se presentan es la resistencia a diferentes antibióticos en la infección por *H. pylori* ya que esto ha ido en aumento y esto está generando un grave problema para un eficaz tratamiento.



7. METODOLOGÍA

Muestras.

El aislamiento de *H. pylori* de pacientes con dolor abdominal recurrente se realiza a partir de biopsia gástrica colocadas en tubos Eppendorf con Solución Salina Fisiológica (SSF) de diferentes regiones del estómago (antro, cuerpo e incisura). El diagnóstico de esta infección se realiza en el laboratorio de Bacteriología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría.

Homogeneizado de la muestra.

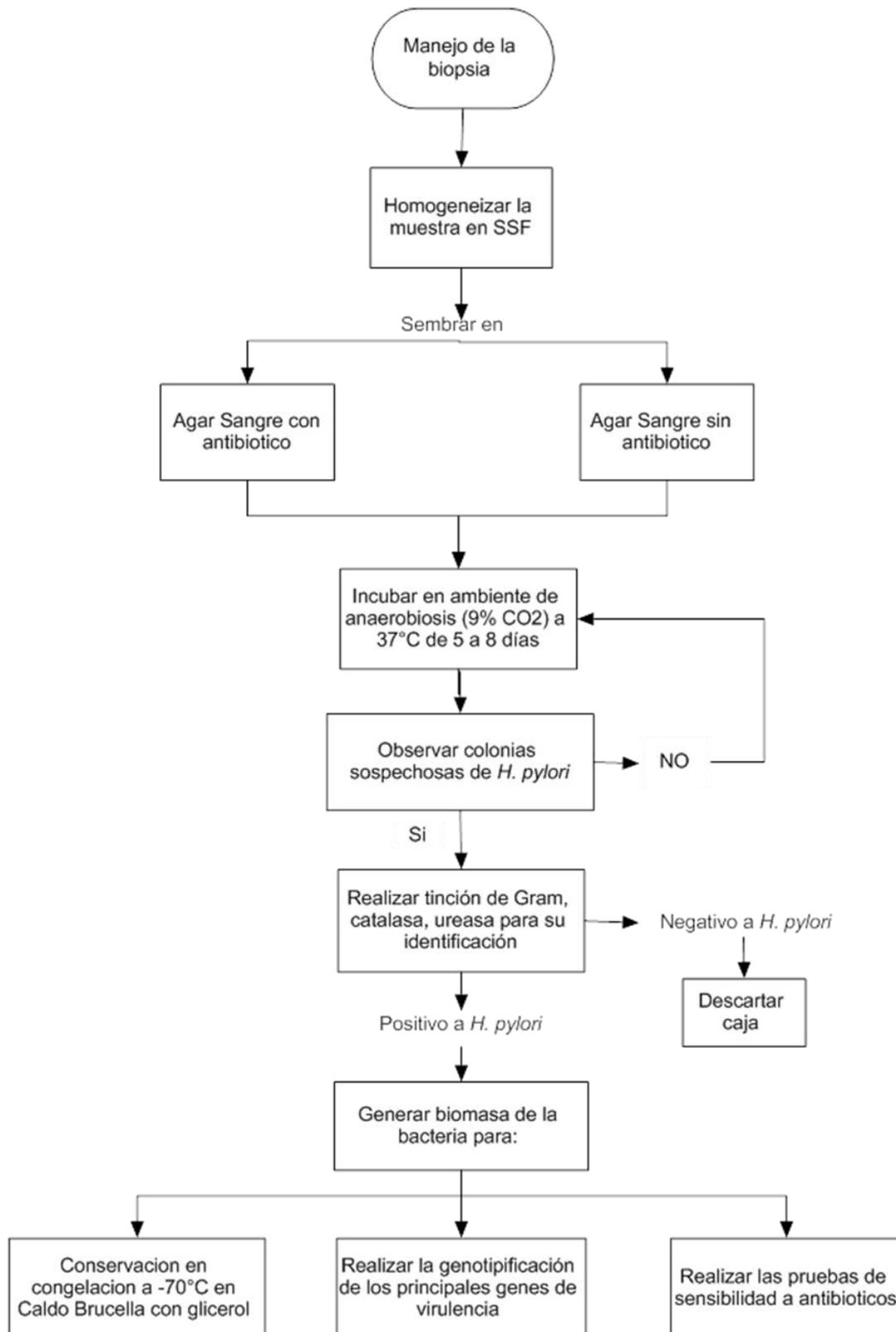
La biopsia se coloca en un tubo Eppendorf de vidrio esmerilado agregando 50 μ L de SSF, se homogeniza el tejido hasta su degradación. La muestra se debe procesar a no más de 3 horas a su llegada al laboratorio.

Primo aislamiento de *Helicobacter pylori*.

Del homogeneizado se toman 15 μ L y se colocan en una caja de Agar Sangre con antibiótico (Trimetoprima, Vancomicina) y una caja de Agar Sangre sin antibiótico, lo cual se incuba en ambiente de anaerobiosis (37°C y 9% de CO₂) de 5 a 8 días. Posteriormente se seleccionan colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* y se siembran en nuevas placas de Agar Sangre (con antibiótico y sin antibiótico) en ambiente de anaerobiosis por 4 a 5 días. Se seleccionan colonias con morfología característica de *H. pylori* (gotas de rocío) a las cuales se les realizan las pruebas de: tinción de Gram, catalasa y ureasa para su diagnóstico microbiológico; además de generar biomasa para congelar la cepa en 1mL de Caldo Brucella con glicerol y se congelan a -70°C.



Aislamiento de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas





Prueba de resistencia a antibióticos

La sensibilidad a los antibióticos se realizó mediante la técnica de dilución en placa utilizando el método de la CMI de acuerdo a los estándares de la CLSI para el caso de claritromicina y para metronidazol de acuerdo a los reportes publicados sobre valores de corte.

Sensibilidad a Claritromicina

El stock de Claritromicina se preparó a una concentración de 1280 µg/mL para ello se pesaron 12.98 mg de la sal de claritromicina, (Potencia 986 µg/mg) en 10 mL de Buffer de Fosfatos pH= 6.5, para que disolviera totalmente, el vaso de precipitado se colocó en baño maría con constante agitación.

$$\text{mg de claritromicina} = \frac{\left[1280 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right] [10 \text{ mL}]}{986 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 12.98 \text{ mg}$$

Preparación de las diluciones y cajas con antibiótico.

Posteriormente se realizaron diluciones decimales del stock de antibiótico en tubos con 4 mL de caldo Muller-Hinton (ver diagrama): de cada tubo se colocó 2 mL en cajas Petri, más 18 mL de agar Muller-Hinton con sangre al 2%. Se utilizaron tres cajas controles las cuales no llevaban antibiótico, eran control inicial, intermedio y final. Todo esto en completa esterilidad.

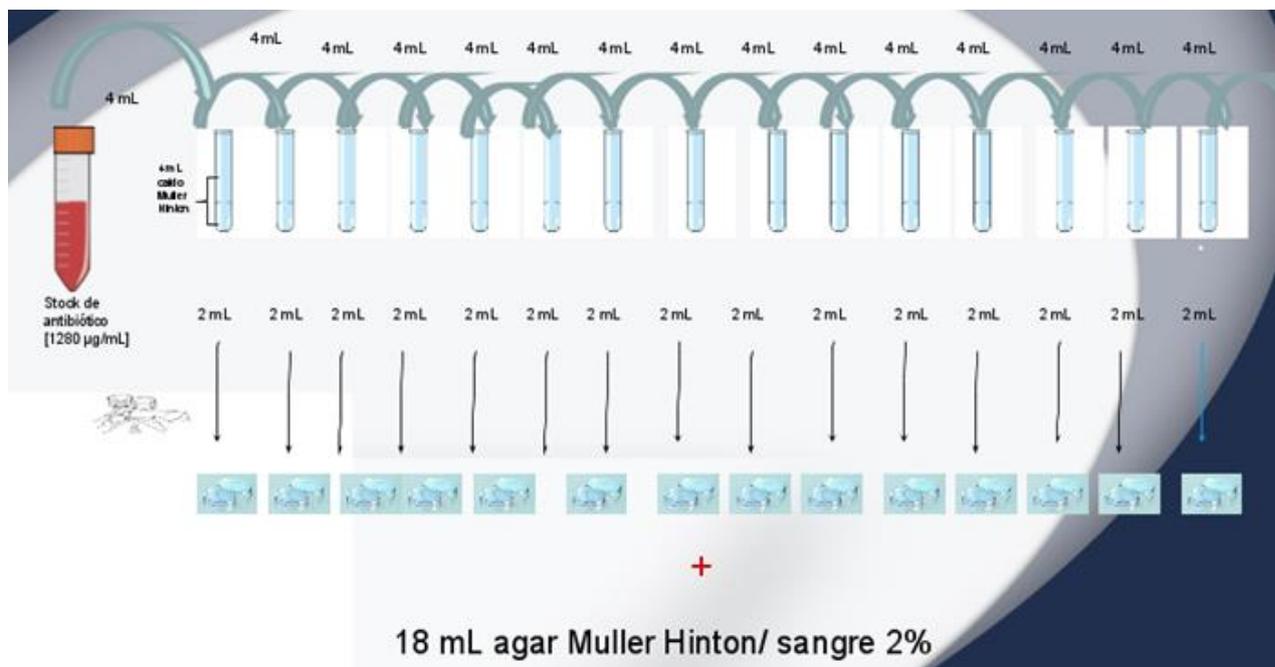


Figura 17. Esquema de la preparación de las cajas con claritromicina



Sensibilidad a Metronidazol.

El stock de Metronidazol se preparó a una concentración de 5120 µg/mL para ello se pesaron 51.2 mg de la sal de metronidazol. (Potencia 1000 µg/mg), en 10 mL de Buffer de Fosfatos pH= 6.5, para que disolviera totalmente, el vaso de precipitado se colocó en baño maría con constante agitación.

$$\text{mg de metronidazol} = \frac{\left[5120 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right] [10 \text{ mL}]}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 51.2 \text{ mg}$$

Preparación de las diluciones y cajas con antibiótico.

Posteriormente se realizaron diluciones decimales del stock de antibiótico en tubos con 4 mL de caldo Muller-Hinton (ver diagrama de trabajo): de cada tubo se colocó 2 mL en cajas petri, más 18 mL de agar Muller-Hinton con sangre al 2%. Se tuvieron tres cajas controles las cuales no llevaban antibiótico, eran control inicial, intermedio y final. Todo esto en completa esterilidad.

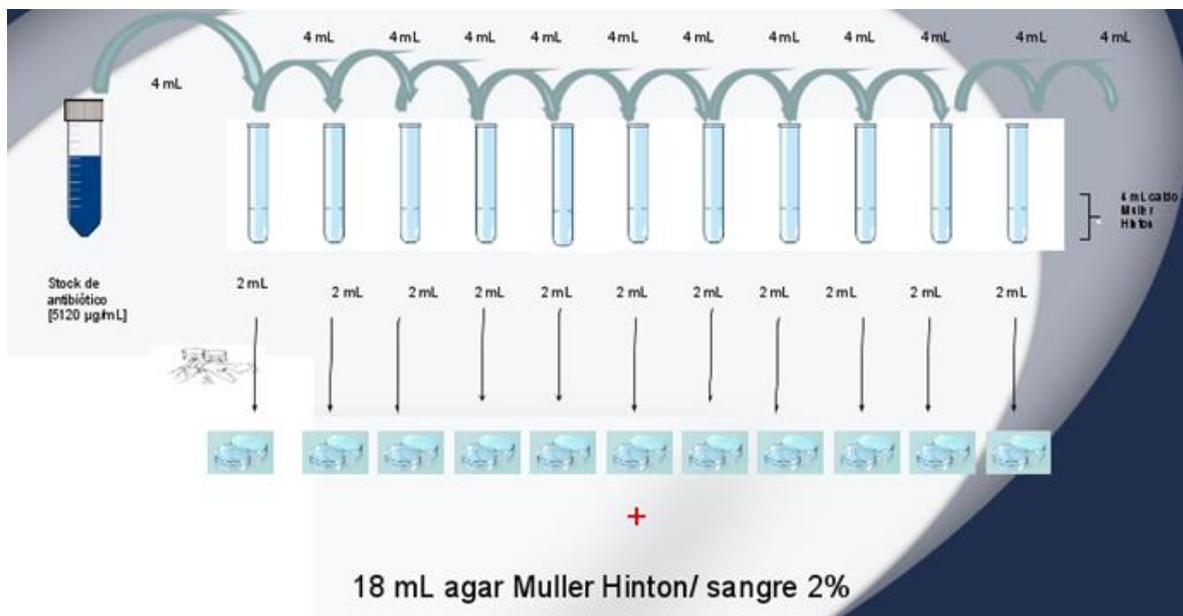


Figura 18. Esquema de la preparación de las cajas con metronidazol



Inoculación de la cepa control y muestras.

Se descongelaron las cepas de *H. pylori* de niños con DAR y la cepa control (*Helicobacter pylori*, ATCC 43504), se sembraron en cajas de agar sangre y se incubaron a 37°C en ambiente de anaerobiosis hasta obtener cantidad considerable de biomasa.

Se realizaron suspensiones tanto de las cepas como de la cepa control en tubos con 4 mL caldo Muller-Hinton igualándolas al tubo 2 del Nefelómetro de McFarland.

Se inoculo 10 µL de las suspensiones bacterianas en las cajas preparadas con antibióticos como se muestra en la imagen; se incubaron a 37°C y en ambiente de anaerobiosis de 2 a 3 días.

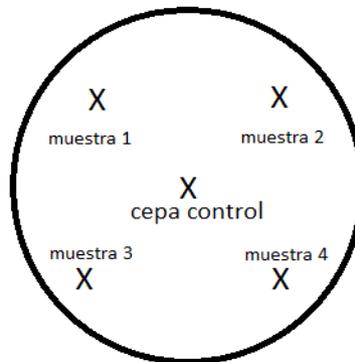


Figura 19. Forma de sembrado de las cepas en las cajas para la prueba de resistencia a antibióticos

Interpretación

Los valores de corte de resistencia y sensibilidad se toman de acuerdo a los estándares de la CLSI que se muestran a continuación.

Para metronidazol:

Valores de corte

Cepa control de *H. pylori* (ATCC 43504): 256-64 µg/mL



Cepas *H. pylori* reportes: Resistencia alta 128 µg/mL

Resistencia moderada 32-64 µg/mL

Resistencia baja > 8 µg/mL

Intermedia 2-4 µg/mL

Sensible <2 µg/mL

Para claritromicina:

Valores de corte

Cepa control de *H. pylori* (ATCC 43504): 0.12-0.015 µg/mL

Cepas *H. pylori* reportes: Resistente ≥ 1 µg/mL

(Kwon et al., 2000) (Poon et al., 2009) (Maggi et al., 2000)



Diagnóstico molecular de *H. pylori* en biopsia gástrica.

Preparación de la muestra para la extracción de DNA.

Del homogeneizado restante se realizó la lisis del tejido de la biopsia agregando 600 μL de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + 0.1% sarcosina) + 20 μL de Proteinasa K (10 mg/mL) + 20 μL lisozima (5 mg/mL) dejándola incubar toda la noche a 50°C, o incubar a 55°C por 3 horas y cada media hora agitar en vortex. Al día siguiente o después de las 3 horas, incubar los tubos a 95°C por 5 minutos para inactivar la Proteinasa K.

Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de Fenol-Cloroformo. (Ver Anexo) El precipitado de DNA se resuspendió en 50 μL de agua destilada libre de nucleasas y se guarda en refrigerador de -20°C hasta su momento de uso.

Cuantificación de DNA

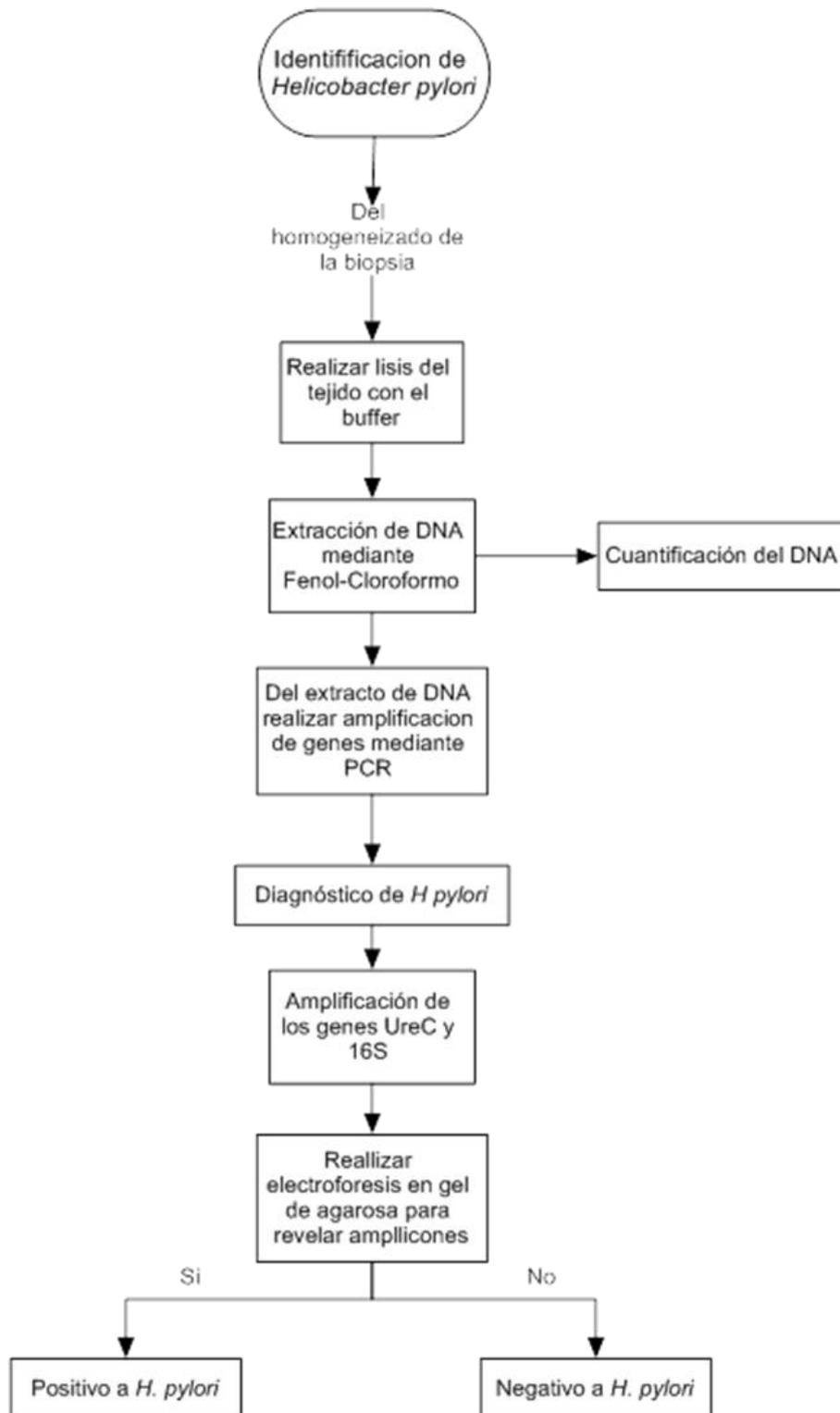
Para realizar la cuantificación del DNA se utilizó el equipo NANODROP 2000®, donde se colocó 1 μL para medir el DNA de las muestras en concentraciones de nanogramos/microlitro (ng/ μL); además se obtuvo la pureza del DNA con la relación de las absorbancias 260/280, trabajando con muestras con un valor de 1.6 a 1.9 la cual es el rango que nos indica que nuestro DNA se encuentra puro.

La identificación molecular de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación de los genes *UreC* y *16S rRNA* mediante PCR usando como template DNA extraído de la biopsia (Condiciones ver Anexo)

La descripción de la mezcla de PCR y condiciones de amplificación para cada gen se presenta en el Anexo.



Identificación de *H. pylori* en biopsia gástrica mediante PCR





Genotipificación de las cepas de *H. pylori*

Para la búsqueda de los genes de virulencia de las cepas que se obtuvieron a partir de biopsias gástricas, se procedió a descongelarlas de los viales para realizar un sembrado masivo en agar sangre, después de su crecimiento (aproximadamente máximo de 48 horas), se tomó un cuarto de la caja del cultivo y se resuspendió en un tubo Eppendorf con 1000 µL de solución salina estéril, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min., se desechó el sobrenadante con cuidado de no eliminar el botón celular para la extracción de DNA mediante el método de GES (Tiocianato de Guanidina)

La identificación de los genes de virulencia se realizó por la técnica de PCR punto final, los genes que se identificaron fueron: *DupA1*, *DupA2*, *VacAS1a*, *VacAS1b*, *VacAm1*, *CagA*, *cagPAI*; al igual se identificaron los genes de la zona de plasticidad: *Jhp0945*, *Jhp094*, *Jhp0949a*, *Jhp0949b*, *Jhp0940*.

La descripción de la mezcla de PCR y condiciones de amplificación para cada gen se presenta en el Anexo.

8. RESULTADOS

El diagnostico microbiológico

La Figura 20 muestra la tinción de Gram de los aislamientos de *H. pylori* a partir de biopsia gástrica, donde se puede observar la morfología microscópica característica de esta bacteria bacilos Gram negativos en forma de espiral.

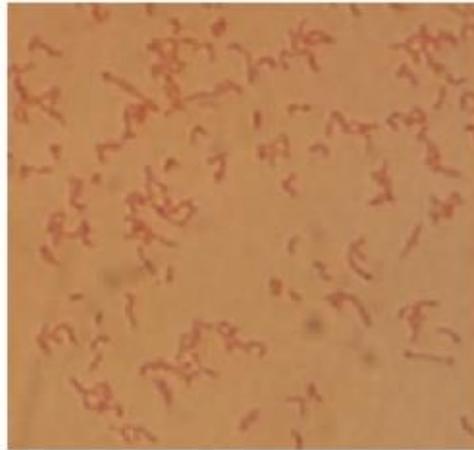


Figura 20. *H. pylori* en tinción de Gram

Colonias de *H. pylori* en Agar Sangre con 10% de sangre de carnero (Figura 21)



Figura 21. Colonias de *H. pylori* en medio de Agar Sangre



Pruebas bioquímicas características de *H. pylori*; prueba de catalasa positiva y prueba de ureasa positiva (Figuras 22 y 23)

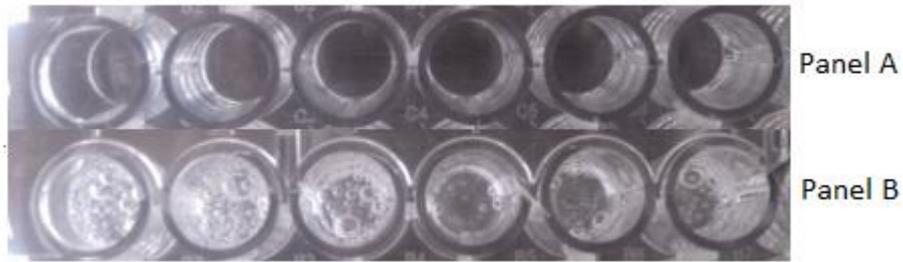


Figura 22. Prueba de catalasa en cepas de *H. pylori*. A) antes de inocular la bacteria B) Después de inocular, prueba de catalasa positiva

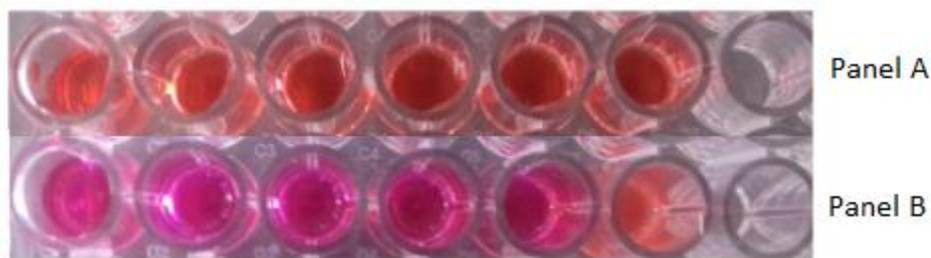


Figura 23. Prueba de ureasa en cepas de *H. pylori*. A) antes de inocular la bacteria B) Después de inocular, prueba de ureasa positiva dejando el ultimo pozo como control negativo

Diagnóstico molecular de *H. pylori* en biopsia gástrica.

Cuantificación del DNA de biopsia para la identificación de *H. pylori* por PCR

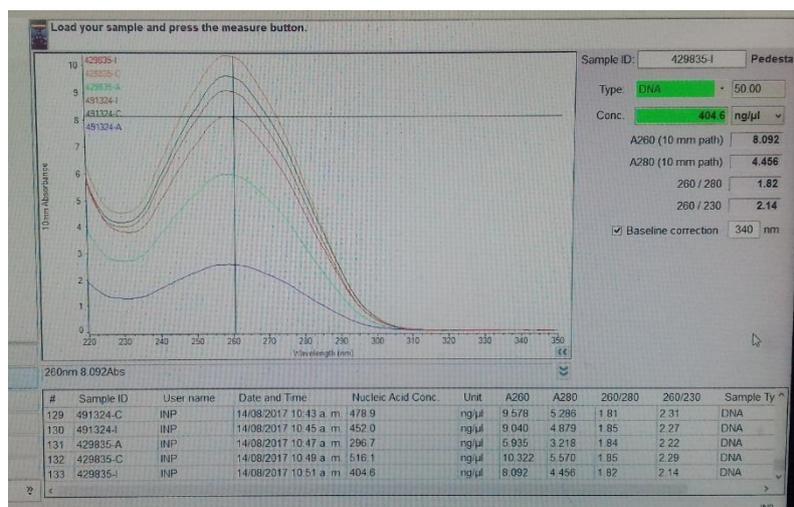


Figura 24. Cuantificación de DNA mediante NANODROP 2000®

Los geles muestran la amplificación de los genes *ureC* y *16S rRNA* de *H. pylori* en el DNA de biopsia gástrica de niños con DAR

Gel de amplificación del gen *ureC* (Figura 25a) y gel de amplificación del gen *16S* (Figura 25b) para el diagnóstico molecular de *H. pylori* a partir de biopsia gástricas

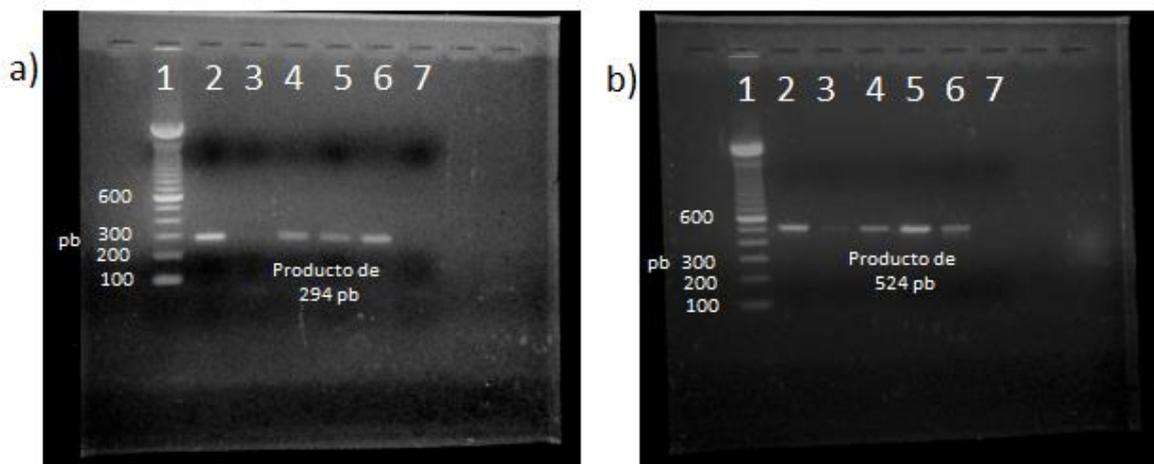


Figura 25. Amplificación de los genes para el diagnóstico de *H. pylori*. a) Gel del gen *ureC*: carril 1 se muestra el Marcador de Peso Molecular; carril 2 es el control positivo utilizando la cepa control J99 donde se observa una banda de 294 pb indicativo de la presencia del gen *ureC*; los carriles 3,4,5,6, son muestras de biopsias gástricas de pacientes con DAR, dando positivo al gen las muestras de los carriles 4,5,6 observándose la banda de 294 pb; carril 3 es muestra negativa; carril 7 es nuestro blanco. b) Gel del gen *16S* del rRNA: carril 1 se muestra el Marcador de Peso Molecular; carril 2 es el control positivo utilizando la cepa control J99 donde se observa una banda de 524 pb indicativo de la presencia del gen *16S*; los carriles 3,4,5,6, son muestras de biopsias gástricas de pacientes con DAR, dando positivo al gen las muestras de los carriles mencionados observándose la banda de 254 pb; carril 7 es nuestro blanco. Con uno de los dos genes que amplificara la muestra se daba como positiva a *H. pylori*.



En un total de 50 niños con DAR del servicio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Pediatría, se procesaron 90 biopsias gástricas. En la siguiente tabla se muestra la población estudiada, el número de biopsias de cada paciente y el diagnóstico de *H. pylori*.

Tabla 7. Recopilación de resultados de diagnóstico para *H. pylori* y sensibilidad a antibióticos.

| No. paciente | Edad (años) | Género | No. biopsias | Región del Estomago | Cultivo (+/-) | PCR ureC (+/-) | PCR 16SrRNA (+/-) | Sensibilidad a antibiótico |
|--------------|-------------|--------|--------------|---------------------|---------------|----------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | NR | M | 1 | NR | - | - | - | NA |
| 2 | 12 | M | 2 | NR | + | + | + | NA |
| | | | | Antro | - | - | - | NA |
| 3 | NR | M | 1 | NR | - | + | + | NA |
| 4 | NR | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 5 | NR | M | 1 | Antro | - | + | - | NA |
| 6 | NR | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 7 | 17 | F | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 8 | NR | F | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| 9 | NR | M | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 10 | NR | F | 1 | Fondo | - | - | - | NA |
| 11 | NR | F | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 12 | 7 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 13 | NR | F | 1 | Antro | - | + | + | NA |
| 14 | 18 | M | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Antro | - | - | - | NA |
| 15 | 7 | F | 2 | Antro | - | + | + | NA |
| | | | | Antro | - | - | - | NA |
| 16 | 6 | F | 2 | Incisura | + | + | + | Cla (R) Met (R) |
| | | | | Antro | + | + | + | Cla (R) Met (R) |
| 17 | 7 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 18 | 7 | F | 1 | Antro | - | + | + | NA |
| 19 | 14 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 20 | 10 | F | 2 | Antro | - | + | - | NA |
| | | | | Antro | - | - | - | NA |
| 21 | 4 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 22 | 14 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 23 | 8 | F | 2 | Antro | - | + | - | NA |
| | | | | Antro | - | + | - | NA |
| 24 | 16 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |



| | | | | | | | | |
|----|----|----|---|----------|---|---|---|-----------------|
| 25 | 8 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 26 | 15 | F | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 27 | 15 | F | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 28 | 3 | F | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | + | - | NA |
| 29 | 8 | F | 1 | Antro | + | + | + | Cla (S) Met (S) |
| 30 | 12 | NR | 2 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| 31 | 11 | M | 1 | Antro | + | + | + | Cla (S) Met (S) |
| 32 | 14 | M | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 33 | NR | NR | 1 | Cuerpo | - | - | - | NA |
| 34 | 16 | F | 1 | Antro | - | - | - | NA |
| 35 | 10 | M | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| | | | | Bulbo | - | - | - | NA |
| 36 | 13 | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 37 | NR | M | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 38 | NR | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 39 | NR | M | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 40 | 8 | M | 1 | Antro | - | + | + | NA |
| 41 | NR | M | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 42 | NR | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 43 | NR | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 44 | 5 | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 45 | NR | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 46 | NR | F | 2 | Antro | + | + | + | Cla (R) |



| | | | | | | | | |
|----|----|---|---|----------|---|---|---|--------------------|
| | | | | Incisura | + | + | + | Met (R) |
| 47 | NR | M | 3 | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Bulbo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 48 | NR | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 49 | 8 | F | 3 | Antro | - | - | - | NA |
| | | | | Cuerpo | - | - | - | NA |
| | | | | Incisura | - | - | - | NA |
| 50 | NR | M | 3 | Antro | + | + | + | Cla (R) Met (R) |
| | | | | Cuerpo | + | + | + | |
| | | | | Incisura | + | + | + | |

NOTA. NR: No Reportado; F: Femenino; M: Masculino; NA: No Aplica; Cla: Claritromicina; Met: Metronidazol; R: Resistente; S: Sensible

Del total de niños que le realizaron biopsia, 15 pacientes salieron positivos a *H. pylori*, esto equivale al **30%** de la población estudiada.

Del total de biopsias (96), 20 fueron positivos para *H. pylori* por cualquiera de los métodos de identificación esto equivale al **20.833%** de total de muestras.

De las 20 biopsias que salieron positivas a *H. pylori*:

| | Número de biopsias | % |
|---|--------------------|----|
| Positivo a cultivo | 10 | 50 |
| Negativo a cultivo, pero positivo por PCR (urec y/o 16SrRNA) | 10 | 50 |

El 100% son las 20 muestras positivas

La siguiente tabla muestra a detalle la distribución de estos resultados:

| Diagnostico | Número de muestras | % |
|---------------------------------------|--------------------|----|
| Cultivo (+), 16S (+), UreC (+) | 10 | 50 |
| Cultivo (+), 16S (+), UreC (-) | 0 | 0 |
| Cultivo (+), 16S (-), UreC (+) | 0 | 0 |
| Cultivo (+), 16S (-), UreC (-) | 0 | 0 |
| Cultivo (-), 16S (+), UreC (+) | 5 | 25 |
| Cultivo (-), 16S (+), UreC (-) | 0 | 0 |
| Cultivo (-), 16S (-), UreC (+) | 5 | 25 |

El 100% son las 20 muestras positivas

Otros datos importantes que se tomaron en cuenta en este trabajo fue el sexo de los pacientes, su edad y de qué región del estómago provenía la biopsia; llegando a estos resultados:



Del total de los 50 niños con DAR del servicio de Gastroenterología del INP se le realizo biopsia gástrica para el diagnóstico de *H. pylori*, 24 niños eran del sexo masculino (48%) y 24 de sexo femenino (48%); las otras dos biopsias restantes no reportaban este dato.

(Grafica 1)

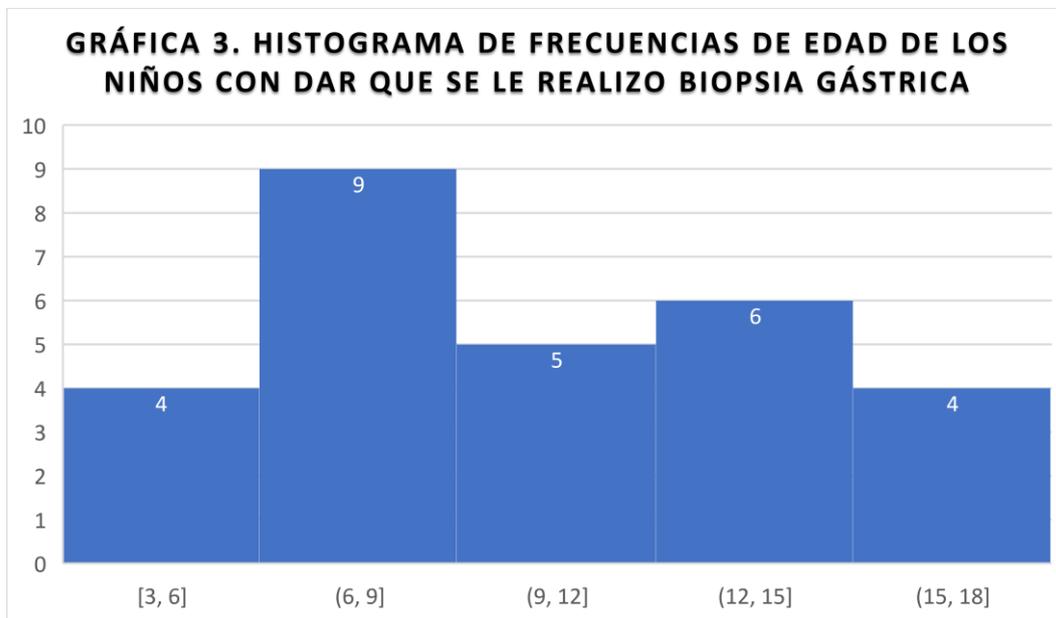


De los 50 pacientes, 15 salieron positivos a *H. pylori*, 9 eran de sexo femenino (60%) y 6 de sexo masculino (40%). **Grafica 2.**

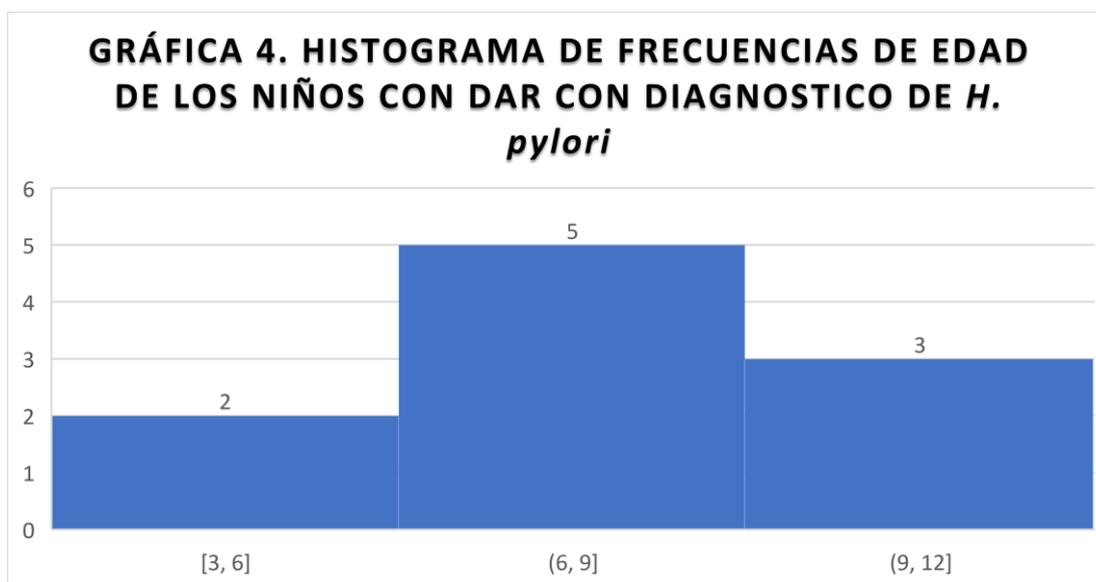




Con los datos obtenidos, no todos los pacientes reportaban el dato de edad, solo 28 del total de niños lo presentaban; el rango de entre 6 y 9 años fue el que tuvo mayor frecuencia en la toma de muestra del servicio de Gastroenterología. Los demás datos se pueden observar en la **Grafica 3**.



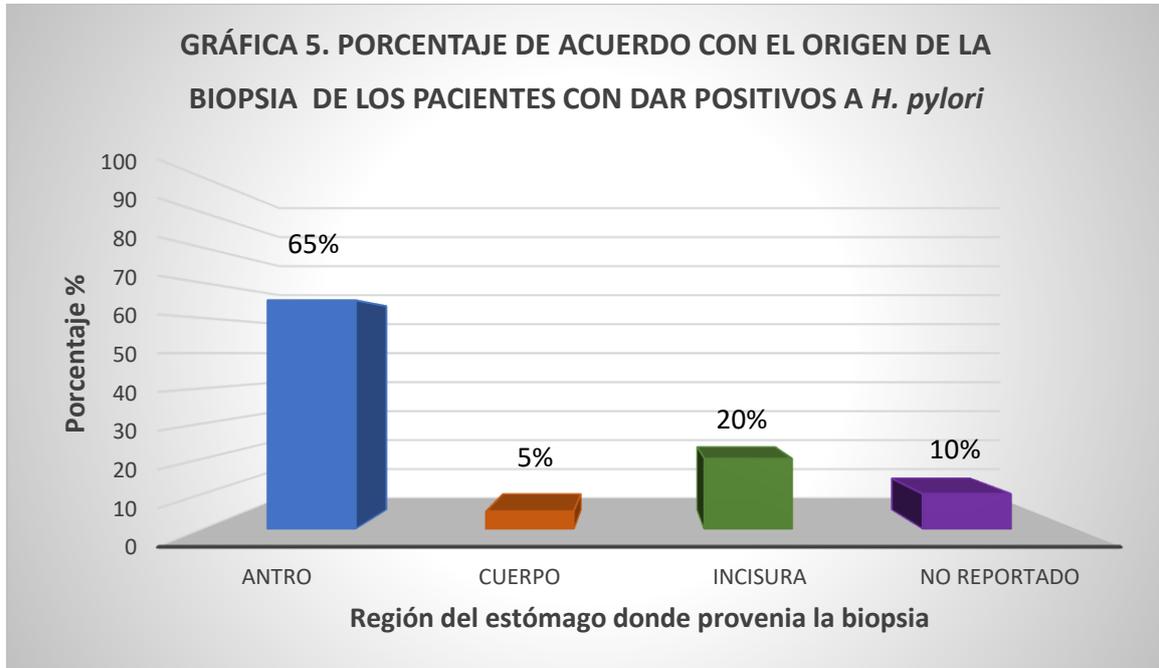
En la **Grafica 4**, se muestra el histograma de frecuencias de edades de los niños con DAR que se le realizaron biopsia gástrica y salieron positivos a *H. pylori*, obteniendo el mayor número de frecuencias en el rango de 6 a 9 años.



El promedio de edad de los pacientes que salieron positivos a *H. pylori* fue de **8±1.84**



La región del estómago de donde provenía la biopsia era un dato importante, de las 20 que salieron positivas a *H. pylori*, el 65% de estas provenían de la región de antro, teniendo el mayor porcentaje que las demás regiones, como se puede observar en la **Grafica 5**.



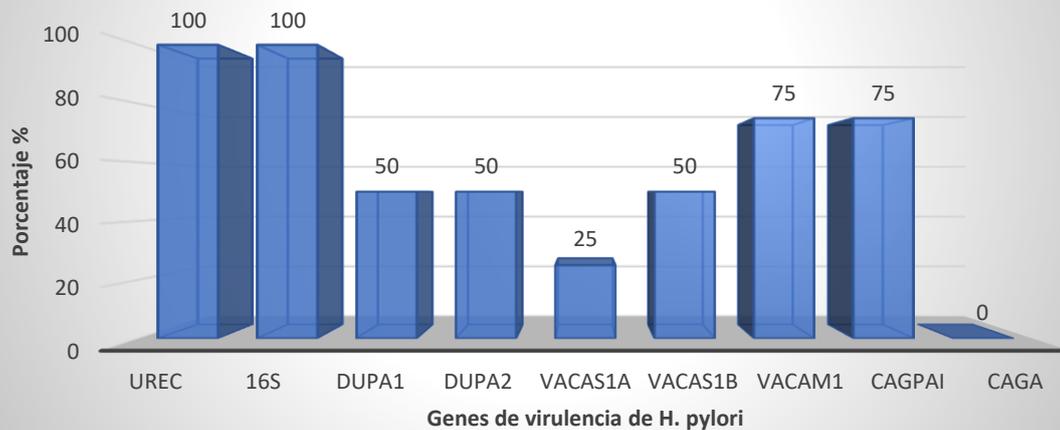


Genotipificación de cepas de *H. pylori* obtenidas de cultivo

De las cepas de *H. pylori* aisladas en niños con DAR el patrón genómico de cada cepa se muestra a continuación:

| PCR | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|--------------------|-------------|
| | <i>UreC</i> | <i>16S</i> | <i>dupA1</i> | <i>dupA2</i> | <i>vacA S1a</i> | <i>vacA S1b</i> | <i>vacA m1</i> | <i>Isla cagPAI</i> | <i>cagA</i> |
| Cepa 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Cepa 2 | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| Cepa 3 | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| Cepa 4 | + | + | - | - | - | + | + | + | - |

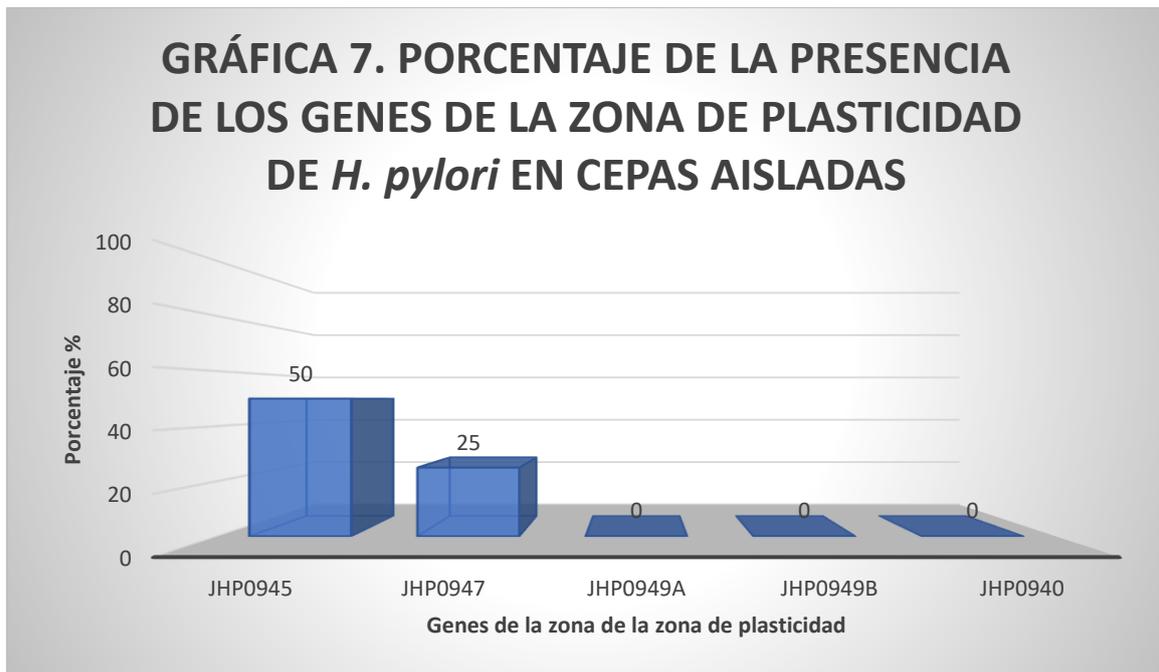
GRÁFICA 6. PORCENTAJE DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE *H. pylori* EN CEPAS AISLADAS





Patrón genómico de los genes de la zona de plasticidad cada cepa:

| PCR | | | | | |
|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | <i>Jhp0945</i> | <i>Jhp0947</i> | <i>Jhp0949a</i> | <i>Jhp0949b</i> | <i>Jhp0940</i> |
| Cepa 1 | - | - | - | - | - |
| Cepa 2 | + | + | - | - | - |
| Cepa 3 | + | - | - | - | - |
| Cepa 4 | - | - | - | - | - |





Sensibilidad a antibióticos

Con los cultivos que salieron positivos, se realizó el antibiograma a las cepas que se lograron aislar, con los antibióticos que se contaban en el laboratorio, los cuales eran Claritromicina y Metronidazol. En las siguientes tablas (**tabla 8 y 9**) se muestran las cepas que se le realizaron la prueba de sensibilidad a antibióticos, mostrando cuales fueron sensibles o resistentes.

Tabla 8. Resultados de la sensibilidad a Claritromicina

| Caja | Dilución (µg/mL) | Interpretación | Cepa 1 | Cepa 2 | Cepa 3 | Cepa 4 | Cepa 5 | Cepa 6 |
|------|------------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 128 | Resistente | | | | X | | X |
| 2 | 64 | Resistente | | | | X | | X |
| 3 | 32 | Resistente | | | | X | | X |
| 4 | 16 | Resistente | | | | X | X | X |
| 5 | 8 | Resistente | | | | X | X | X |
| 6 | 4 | Resistente | | | | X | X | X |
| 7 | 2 | Resistente | | | | X | X | X |
| 8 | 1 | Resistente | | | | X | X | X |
| 9 | 0.5 | Intermedia | | | | X | X | X |
| 10 | 0.25 | Sensible | X | | | X | X | X |
| 11 | 0.125 | Sensible | X | | | X | X | X |
| 12 | 0.06 | Sensible | X | | | X | X | X |
| 13 | 0.03 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 14 | 0.015 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 15 | 0.007 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 16 | 0.0039 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 17 | 0.0019 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 18 | 0.0009 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 19 | 0.0004 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 20 | 0.0002 | Sensible | X | X | X | X | X | X |

X: Crecimiento bacteriano



Tabla 9. Resultados de la sensibilidad a Metronidazol

| Caja | Dilución (µg/mL) | Interpretación | Cepa 1 | Cepa 2 | Cepa 3 | Cepa 4 | Cepa 5 | Cepa 6 |
|------|------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 512 | Resistencia alta | | | | X | | X |
| 2 | 256 | Resistencia alta | | | | X | | X |
| 3 | 128 | Resistencia alta | | | | X | | X |
| 4 | 64 | Resistencia moderada | | | | X | X | X |
| 5 | 32 | Resistencia moderada | | | | X | X | X |
| 6 | 16 | Resistencia baja | | | | X | X | X |
| 7 | 8 | Resistencia baja | X | | | X | X | X |
| 8 | 4 | Intermedia | X | | | X | X | X |
| 9 | 2 | Intermedia | X | | | X | X | X |
| 10 | 1 | Sensible | X | X | X | X | X | X |
| 11 | 0.5 | Sensible | X | X | X | X | X | X |

X: Crecimiento bacteriano

Como se puede observar en los resultados, 3 cepas fueron sensibles a claritromicina (50%) y 3 resistentes (50%); para el caso de metronidazol 2 cepas salieron sensibles (33.3%) y 4 resistentes (66.6%).

Gracias a la técnica que se utilizó se pudo conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas, para el caso de claritromicina de acuerdo con los valores de corte de la CLSI, la cepa 1 tuvo una CMI de 0.5 µg/mL, cepa 2 fue 0.06 µg/mL y la cepa 3 de 0.06 µg/mL. Para metronidazol las cepas 2 y 3 salieron sensibles teniendo una CMI de 2 µg/mL en ambas.



9. DISCUSION

La infección por *Helicobacter pylori* en niños difiere de la infección en adultos, desde el punto de vista epidemiológico, la respuesta del huésped, algunas características clínicas, las enfermedades relacionadas y el diagnóstico, así como las estrategias de tratamiento a seguir.

El estado socioeconómico y las condiciones sanitarias juegan un rol importante en la adquisición de la infección por *H. pylori*, por lo tanto, la incidencia más baja se encuentra en países desarrollados; mientras que en países subdesarrollados o en desarrollo como los países del sur y este de Europa, América del Sur, Asia y África, la incidencia es mucho más alta. **(Marginean et al., 2017)**

En México, la tercera Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, arroja que un 46% de la población infantil presenta infección por *H. pylori*, teniendo mayor prevalencia los niños con un bajo nivel socioeconómico. **(Duque, et. al., 2012)**. Otras cifras acerca de la incidencia de *H. pylori* en niños mexicanos los podemos encontrar en los estudios realizados por el Dr. Javier Torres y colaboradores, donde reportan que la seroprevalencia se encuentra en un rango que fluctúa entre 20 a 40% **(Torres, et al., 1998)**. La frecuencia de infección por *H. pylori* en la población infantil estudiada fue de 30%, esta frecuencia se encuentra dentro de los datos de infección reportados en nuestro país, sin embargo un punto importante es que el diagnóstico de infección para reportar esta prevalencia es en base a cultivo y/o PCR en nuestro caso, ya que se trata de niños que fueron sujetos a endoscopia por indicaciones de un gastroenterólogo de acuerdo a la sintomatología que presentaban, este punto es importante de considerar ya que los datos que se tienen de prevalencia reportados se tratan de seroprevalencia, la cual nos indica que el niño estuvo infectado en algún momento con *H. pylori* ya que puede tratarse de una infección aguda o una respuesta de memoria inmunológica. En cuanto a la edad, datos reportados indican que la adquisición de la infección por *H. pylori* se adquiere en los primeros 10 años de vida, cabe mencionar que el promedio de la edad de los pacientes positivos a *H. pylori* fue de 8 años.

En este trabajo se abordaron tres aspectos el diagnóstico de *H. pylori*, la genotipificación de las cepas y su sensibilidad a antibióticos.

En niños como en adultos, hay dos alternativas para el diagnóstico: métodos invasivos y no invasivos; dentro de los métodos invasivos, el cultivo es considerado como el estándar de oro, ambos métodos pueden ser utilizados en niños con dolor abdominal



crónico recurrente de tipo orgánico, una entidad que puede deberse a la presencia de *H. pylori*, después de descartar otra etiología se procede a saber si se trata de la infección por *H. pylori*. Para esto, se procede a realizar la prueba de aliento con C^{13} y evaluación de la mucosa gástrica mediante una endoscopia donde se obtiene una biopsia gástrica, la cual se procesó en el laboratorio para el diagnóstico por cultivo y molecular de *H. pylori*. El diagnóstico molecular, consistió en la búsqueda de genes conservados de *H. pylori*, el gen de la ureasa (*ureC*) y el gen de la fracción ribosomal (16S *rRNA*), la técnica molecular consiste en la realización de PCR de la biopsia utilizando a estos genes para la identificación de *H. pylori*, el PCR tiene una elevada especificidad y sensibilidad en comparación a otras técnicas de diagnóstico. Se busca el gen *ureC* en lugar de *ureA* debido a que este último tiene baja especificidad y sensibilidad debida a la secuencia de polimorfismo en el locus de este gen (**Lu, et al., 1999**). Desafortunadamente, una simple técnica, no puede cumplir con todos los parámetros requeridos para tener el diagnóstico definitivo de la infección por *H. pylori*, por ejemplo, el cultivo, aunque es el estándar de oro, un aspecto importante es el grado de colonización, el cual en el caso de niños suele ser escaso, y dificulta el aislamiento y crecimiento de esta bacteria en el medio de cultivo. Una solución es la de usar la combinación de resultados de dos o más técnicas que sean confiables (**Moncayo et al., 2006**). Nosotros obtuvimos un mayor porcentaje de resultados positivos a *H. pylori*, con la combinación de la técnica de cultivo y la búsqueda de ambos genes (*ureC* y 16S), con esto se corrobora, que entre más técnicas de diagnóstico se utilicen, mayor será la sensibilidad, especificidad y confiabilidad de dar un resultado certero hacia la infección por *Helicobacter pylori*.

Otro aspecto importante por considerar es la región del estómago donde coloniza *H. pylori*, de acuerdo con la anatomía y fisiología del estómago, las células parietales son las encargadas de la producción de HCl, este tipo de células se encuentran en la región del fondo y cuerpo del estómago. (**Conti, et al., 2010**) *H. pylori* no es un microorganismo acidófilo, no resiste en ambientes ácidos, para ello produce la enzima ureasa para poder neutralizar el ácido del estómago en presencia de urea y poder colonizar. La región de antro, al ser la zona en donde menos ácido produce, es la región donde se presenta la mayor colonización en comparación con las otras regiones. Las muestras de biopsia que llegaban al laboratorio provenían de antro, cuerpo, incisura; con respecto a los resultados obtenidos, las muestras que resultaron con mayor frecuencia positivas a *H. pylori*, eran las biopsias de la región de antro, coincidiendo con lo ya reportado. Sin embargo, en nuestro estudio se observó que la región de incisura era la segunda región más colonizada, algo que resulta ser frecuente en adultos, pero no en niños, ya que en



niños predomina una colonización en antro y/o cuerpo (**Elitsur, et. al., 2002**). Una probable causa de que *H. pylori* colonice otras regiones se podría deber a la gran carga bacteriana que ya presenta el paciente, esto hace que la bacteria migre y colonice las demás regiones del estómago, esto se pudo observar cuando al paciente se le tomaba biopsia de las tres regiones (antro, cuerpo, incisura) ya que resultaban positivas las tres regiones con un cultivo abundante.

Una de las ventajas de poder aislar a *H. pylori* en cultivo es la posibilidad de realizar sensibilidad a antibióticos en este caso se probaron claritromicina y metronidazol a las cepas aisladas.

Las resistencias a estos antibióticos son variables en cada país, ya que esta depende, entre otras cosas, de la cepa bacteriana, el desarrollo de mutaciones y de la utilización de esquemas inadecuados en el tratamiento, tanto en su elección como en el tiempo de administración. Varios estudios han demostrado la resistencia de *H. pylori* a los diferentes antibióticos utilizados para su erradicación, datos reportados se encuentra que en cepas aisladas de pacientes pediátricos, metronidazol presenta un tasa de resistencia del 76.9% y para claritromicina un 24% (**Javier Torres et al., 2001**), estos datos muestran similitud con los resultados obtenidos experimentalmente, aunque difiere por ejemplo con otras partes del mundo, mientras que en México, metronidazol tiene una alta tasa de resistencia, en Europa tiene una tasa más baja de alrededor del 30%, y para claritromicina presenta alrededor del 20%, semejante al dato de aquí de México; en Asia, se presentan datos similares con los reportados aquí en el país. Otro ejemplo, en el caso de África las tetraciclinas presentan una tasa de resistencia del 50%, cuando en nuestro país no se presencia de resistencia a tetraciclinas reportado. (**Ghotaslou, 2015**) Cabe mencionar que la información de resistencia obtenida *in vitro* no necesariamente refleja lo que acontece *in vivo*.

H. pylori tiene factores de virulencia que permiten el establecimiento, colonización y daño al epitelio gástrico. Un importante factor de virulencia secretado por esta bacteria es la proteína VacA, que es una citotoxina, que induce vacuolización y muerte celular en células epiteliales. Este gen es codificado por todas las cepas de *H. pylori*, pero tiene una característica importante, es polimórfico y comprende diferentes regiones variables: la región señal con tres alelos diferentes (s1a/s1b/s2) y la región media y sus alelos respectivamente (m1/m2). En estudios previos realizados en caracterizar el gen *vacA* de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos y niños, se encontró que el alelo s1b/m1 del gen *vacA* fue el más prevalente en México y Latinoamérica. (**Delgado-sapién et al., 2017**). En otro estudio, en donde una parte de la población en estudio eran niños



mexicanos con dolor abdominal recurrente, también el alelo s1b/m1 fue el de mayor prevalencia. **(González-Valencia et al., 2000)**

Comparando los resultados que se obtuvieron en este trabajo, en cuanto a la región señal, el alelo que mayor prevaleció fue s1b, presentándose en la mayoría de la cepas, tal y como lo reportan los estudios anteriores; a todas ellas se le busco solamente el alelo m1, debido a que es el alelo de la región media asociado con citotoxicidad, **(Jones et al., 2010)**, siendo este alelo positivo en todas nuestras cepas de estudio.

Se ha documentado las cepas *vacA* s1 se asocian con mayor frecuencia a la ulceración péptica que las cepas *vacA* s2. Las cepas con un alelo *vacA* de tipo *m1* producen mayores niveles de actividad de la citotoxina de forma *in vitro* y más daño epitelial en el estómago humano de forma *in vivo* que las cepas con un alelo de *m2*. **(González-Valencia et al., 2000)**

En comparación con *vacA*, el gen *cagA* puede estar presente o no en las cepas de *H. pylori*; el gen de la proteína CagA esta codificado dentro de la isla de patogenicidad *cagPAI* y desde su descubrimiento, se ha demostrado que la proteína CagA está asociada a cáncer gástrico. A todas las cepas se le busco la isla *cagPAI*, dando como resultado positivo en el 75% de ellas, pero ninguna presenta el gen *cagA*. Muchos estudios han demostrado una asociación entre las cepas positivas para CagA y úlceras pépticas, MALT y cáncer gástrico. Las cepas *cagA*-positivas inducen la liberación de IL-8 de las células epiteliales gástricas, este efecto depende de la presencia de varios genes en la isla, que hacen a esta isla funcional. Otras actividades asociadas con los genes *cagPAI* incluyen la formación de pedestal para la adhesión bacteriana íntima, la activación del factor de transcripción AP-1 y la expresión de los protooncogenes *c-fos* y *c-jun*. **(Javier Torres et al., 2000)**

Otros genes que se buscaron fueron los que pertenecen a la zona de plasticidad que tiene *H. pylori*, los cuales son: *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, ya que estos se asocian con frecuencia con un mayor riesgo de enfermedades gastroduodenales particulares, como gastritis, ulcera duodenal y cáncer gástrico, además, algunos de estos genes se han asociado con citocinas inflamatorias a través de la vía de activación de NF- κ B. En un estudio reportado de muestras de biopsia de niños, *jhp0949* y *jhp0945* con un 83.7% y 44.9%, respectivamente, fueron los genes más frecuentes entre los aislamientos. **(Romo-González et al., 2015)**. En las cepas del estudio, el gen que prevaleció fue el *jhp0945* con el 50% del total de las cepas, el *jhp0947* fue el que siguió con un 25% y los demás genes no estuvieron presentes.



10. CONCLUSIONES

- La infección por *Helicobacter pylori* estuvo presente en el 30% de los niños con dolor abdominal recurrente durante el periodo 2015-2016 del Instituto Nacional de Pediatría
- En la región de antro se obtuvo el mayor porcentaje de resultados positivos para *H. pylori*, sin embargo; se observó que otras regiones del estómago también pueden colonizarse, observándose que la región de incisura presento un porcentaje considerable de resultados positivos para *H. pylori*.
- El genotipo *vacA s1b/m1* fue el más frecuente, la isla de patogenicidad *cagPAI* está presente entre las cepas, pero no sin el gen *cagA*, estuvo ausente el gen *dupA*, y los genes *jhp0940* y *jhp0949* de la zona de plasticidad.
- El 50% de las cepas fue resistente a claritromicina y el 63.3% para metronidazol.



11. REFERENCIAS

- Abadi, A. T. B., & Perez-Perez, G. (2016). Role of dupA in virulence of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46).
<http://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10118>
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE. (1998) . Analysis of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* ;28:37–53.
- Andersen, L. P., Boye, K., Blom, J., Holck, S., Nørgaard, A., & Elsborg, L. (1999). Characterization of a culturable “*Gastrospirillum hominis*” (*Helicobacter heilmannii*) strain isolated from human gastric mucosa. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1069–1076.
- Arévalo, A., Trespalacios, A. A., & Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev. Col. Gastroenterol*, 24(4), 388–395.
- Backert, S., & Tegtmeyer, N. (2017). Type iv secretion and signal transduction of *Helicobacter pylori* caga through interactions with host cell receptors. *Toxins*, 9(4).
<http://doi.org/10.3390/toxins9040115>
- Bento-Miranda, M., & Figueiredo, C. (2014). *Helicobacter heilmannii* sensu lato: An overview of the infection in humans. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17779–17787. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17779>
- Bergé, C., & Terradot, L. (2017). *Structural insights into Helicobacter pylori cag protein interactions with host cell factors*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 400). http://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6_6
- Biagi, F., Musiani, F., & Ciurli, S. (2013). Structure of the UreD-UreF-UreG-UreE complex in *Helicobacter pylori*: A model study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(5). <http://doi.org/10.1007/s00775-013-1002-8>
- Conti, F., & Battaglini, P. P. (2010). *Fisiología médica*. México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana. Retrieved from <http://www.ebrary.com>
- Delgado-sapién, G., Cerritos, R., González-valencia, G., Mendez, J. L., Cravioto, A., & Morales-espinosa, R. (2017). Novel Vac A S1d Signal Sequence Found in *Helicobacter Pylori* from Mexican Children with Recurrent Abdominal Pain.
- Dong, Q.-J. (2009). Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 15(32), 3984. <http://doi.org/10.3748/wjg.15.3984>
- Dunne, C., Dolan, B., & Clyne, M. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5610–5624. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5610>
- Duque, X., Vilchis, J., Mera, R., Trejo-Valdivia, B., Goodman, K. J., Mendoza, M. -, . . . Correa, P. (2012). Natural history of *Helicobacter pylori* infection in mexican schoolchildren: Incidence and spontaneous clearance. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 55(2), 209-216.
[doi:10.1097/MPG.0b013e318248877f](https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318248877f)



- Elitsur, Y., Lawrence, Z., & Triest, W. E. (2002). Distribution of helicobacter pylori organisms in the stomachs of children with H. pylori infection. *Human Pathology*, 33(11), 1133-1135. doi:10.1053/hupa.2002.129201
- Ghotaslou, R. (2015). Prevalence of antibiotic resistance in Helicobacter pylori: A recent literature review. *World Journal of Methodology*, 5(3), 164. <http://doi.org/10.5662/wjm.v5.i3.164>
- González-Valencia, G., Atherton, J. C., Muñoz, O., Dehesa, M., la Garza, a M., & Torres, J. (2000). Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(5), 1450–4. <http://doi.org/10.1086/315864>
- Guarner, J., Kalach, N., Elitsur, Y., & Koletzko, S. (2010). Helicobacter pylori diagnostic tests in children: Review of the literature from 1999 to 2009. *European Journal of Pediatrics*, 169(1), 15–25. <http://doi.org/10.1007/s00431-009-1033-x>
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., ... Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 202–223. <http://doi.org/10.1128/CMR.00041-08>
- Hassan M. Abu-Almaali Hadi A. Al-Khatibi, Hassan A. Nasr-Allah, Zahra M. Al-Khafaji., (2012). Duplex PCR primers for detection of Helicobacter pylori DNA directly from gastric biopsy samples. *Kerbala Journal Of Pharmaceutical Sciences*, (3), 201-212. Revisado en https://www.researchgate.net/profile/Zahra_Al-Khafaji/publication/321489810_krb_mjlt_alsydalnyt_IIIwm_al_2102_umber_3_Pharmaceutical_Sciences_N_f_Kerbala_Journal_O_Duplex_PCR_primers_for_detection_of_Helicobacter_pylori_DNA_directly_from_gastric_biopsy_samples/links/5a25307d4585155dd41eeb2a/krb-mjlt-alsydalnyt-IIIwm-al-2102-umber-3-Pharmaceutical-Sciences-N-f-Kerbala-Journal-O-Duplex-PCR-primers-for-detection-of-Helicobacter-pylori-DNA-directly-from-gastric-biopsy-samples.pdf
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., ... Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, (June), 1–10. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
- Jones, K. R., Whitmire, J. M., & Merrell, D. S. (2010). A tale of two toxins: Helicobacter pylori CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Frontiers in Microbiology*, 1(NOV), 1–17. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00115>
- de Jonge R, Kuipers EJ, Langeveld SC, Loffeld RJ, Stoof J, van Vliet AH, Kusters JG. (2004) The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947-jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 41:161–7
- Kobayashi I, Murakami K, Kato M, et al (2007). Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. *J Clin Microbiol*; 45: 4006–10.
- Kusters, J. G., Vliet, A. H. M. Van, & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection, 19(3), 449–490. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>



- Kwon, D. H., Kim, J. J., Lee, M., Yamaoka, Y., Kato, M., Osato, M. S., ... Graham, D. Y. (2000). Helicobacter pylori Tetracycline-Resistant Clinical Isolates of Isolation and Characterization of. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11), 3202–3205.
- Lopes, A. I., Vale, F. F., & Oleastro, M. (2014). Helicobacter pylori infection - recent developments in diagnosis, 20(28), 9299–9313.
<http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9299>
- Lu, H., I hsu, P., Graham, D., Yamaoka, Y. (2005). Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 128(4): 833–848. Revisado en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3130061/>
- Lu, J.-J., Perng, C.-L., Shyu, R.-Y., Chen, C.-H., Lou, Q., Chong, S. K. F., & Lee, C.-H. (1999). Comparison of Five PCR Methods for Detection of Helicobacter pylori DNA in Gastric Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 772–774.
- M??graud, F., & Lehours, P. (2007). Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 280–322.
<http://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Maggi, N., Bernasconi, M., Piffaretti, J. (2000). Mechanism of Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori*: Comparison of the *rdxA* Gene Sequences in 30 Strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(8): 2207–2210
- Marginean, M. O., Marginean, C. O., Melit, L. E., Voidazan, S., Moldovan, V., & Banescu, C. (2017). The impact of host's genetic susceptibility on Helicobacter pylori infection in children. *Medicine*, 96(30), 1–8.
<http://doi.org/10.1097/MD.00000000000007612>
- Matsuo, Y., Kido, Y., & Yamaoka, Y. (2017). Helicobacter pylori outer membrane protein-related pathogenesis. *Toxins*, 9(3). <http://doi.org/10.3390/toxins9030101>
- Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Álvarez, A. L., Franco, B., López, M. A., Ángel, A., ... Serrano, H. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por Helicobacter pylori en Quindío, Colombia. *Colombia Medica*, 37(3), 203–212.
- Mucito-Varela, E., Castillo-Rojas, G., Cevallos, M. A., Lozano, L., Merino, E., & López-leal, G. (2016). Complete Genome Sequence of Helicobacter pylori Strain 29CaP. *GenomeA*, 4(1), 4502. <http://doi.org/10.1128/genomeA.01512-15>. Copyright
- Nguyen, L. T., Uchida, T., Murakami, K., Fujioka, T., & Moriyama, M. (2008). Helicobacter pylori virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *Journal of Medical Microbiology*, 57(12), 1445–1453.
<http://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003160-0>
- Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, M?egraud F (2000). Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun*; 68:6240–9
- Pacifico, L., Osborn, J. F., Tromba, V., Romaggioli, S., Bascetta, S., & Chiesa, C. (2014). Helicobacter pylori infection and extragastric disorders in children: A critical update. *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), 1379–1401.
<http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1379>



- Park, Y. H., & Kim, N. (2015). Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20(1), 25–40. <http://doi.org/10.15430/JCP.2015.20.1.25>
- Poon SK, Lai CH, Chang CS, Lin WY, Chang YC, Wang HJ, Lin PH, Lin HJ, Wang WC. (2009). Prevalence of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Taiwan in relation to consumption of antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*; 34(2):162-5. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.02.007. Epub 2009 Mar 25.
- Powers-Fletcher, M. V, & Couturier, M. R. (2015). Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* Species Associated with Human Disease: a Primer for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(12), 93–101. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.05.004>
- Pyburn, T. M., Foegeding, N. J., González-Rivera, C., McDonald, N. A., Gould, K. L., Cover, T. L., & Ohi, M. D. (2016). Structural organization of membrane-inserted hexamers formed by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Molecular Microbiology*, 102(1). <http://doi.org/10.1111/mmi.13443>
- Rajindrajith, S., Devanarayana, N., & de Silva, H. (2009). *Helicobacter pylori* infection in children. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 15(2), 86. <http://doi.org/10.4103/1319-3767.48964>
- Romo-González, C., Consuelo-Sánchez, A., Camorlinga-Ponce, M., Velázquez-Guadarrama, N., García-Zúñiga, M., Burgueño-Ferreira, J., & Coria-Jiménez, R. (2015). Plasticity Region Genes jhp0940, jhp0945, jhp0947, and jhp0949 of *Helicobacter pylori* in Isolates from Mexican Children. *Helicobacter*, 20(3), 231–237. <http://doi.org/10.1111/hel.12194>
- Safavi, M., Sabourian, R., & Foroumadi, A. (2016). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights. *World J Clin Cases*, 4(1), 5–19. <http://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i1.5>
- Sugimoto M, Watada M, Jung SW, Graham DY, Yamaoka Y. (2012). Role of *Helicobacter pylori* plasticity region genes in development of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*; 50:441–8.
- Talebi Bezmin Abadi, A. (2017). *Helicobacter pylori* treatment: New perspectives using current experience. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 123–130. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.11.008>
- Tegtmeyer, N., Wessler, S., & Backert, S. (2011). Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS Journal*, 278(8), 1190–1202. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08035.x>
- Tohidpour, A. (2016). CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis*, 93. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.005>
- Torres, J., Camorlinga-ponce, M., Garza, A. M., González-valencia, G., Muñoz, O., Pe, G., ... Dehesa, M. (2001). Increasing Multidrug Resistance in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children and Adults in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2677–80. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2677>
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, a, Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., ... Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic



study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094. <http://doi.org/10.1086/515663>

Torres, J., Pérez-Pérez, G., Goodman, K. J., Atherton, J. C., Gold, B. D., Harris, P. R., ... Muñoz, O. (2000). A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* Infection in children. *Archives of Medical Research*, 31(5), 431–469. [http://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00099-0](http://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00099-0)

Tummuru, M., T. L. Cover, and M. J. Blaser.(1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* 61:1799–1809.

Windsor, H. M., & O'Rourke, J. (2000). BACTERIOLOGY AND TAXONOMY OF HELICOBACTER PYLORI. *Gastroenterology Clinics of North America*, 29(3), 633–648. [http://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70135-7](http://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70135-7)

Xia, H. X., Keane, C. T., Chen, J. J., Zhang, J. Z., Walsh, E. J., Moran, A. P., ... Omorain, C. A. (1994). Transportation of *Helicobacter-Pylori* Cultures by Optimal Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(12), 3075–3077. Retrieved from <Go to ISI>://A1994PT18700039

Yang, C., & Cui, M.-H. (2017). Virulence factors and pathogenic mechanism of *Helicobacter pylori*. *World Chinese Journal of Digestology*, 25(10). <http://doi.org/10.11569/wcj.v25.i10.857>

Zhang, R.-G. (2016). Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 7(1), 97. <http://doi.org/10.4291/wjgp.v7.i1.97>



12. ANEXOS

1. Tabla 10. Lista de Primers utilizados para la amplificación de los genes

| Gen | Nombre del primer | Oligonucleótidos de PCR | Producto (bp) | Referencia |
|----------|------------------------------|--|---------------|----------------------------------|
| Ureasa | GLMHP_F UreC GLMHP_R UreC | 5' AGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3' 3' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 5' | 294 | (Hasan, et al., 2012) |
| 16S RNAr | 16sHP522_F 16sHP118_R | 5' TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG 3' 3' GCTAAAGAGATCAGCCTATGTCC5' | 522 | (Hasan, et al., 2012) |
| DupA1 | Jhp0917F Jhp0917R | 5' TGGTTTCTACTGACAGAGCGC 3' 3' AACACGCTGACAGGACAATCTCCC 5' | 307 | (Lu, et al 2005) |
| DupA2 | Jhp0918F Jhp0918R | 5' CCTATATCGCTAACGCGCTCGC 3' 3' AAGCTGAAGCGTTTGTAACG 5' | 276 | (Lu, et al 2005) |
| vacAS1a | vacAS1aF vacAS1aR | 5' GTCAGCATCACACCGCAAC 3' 3' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 5' | 190 | (González-Valencia et al., 2000) |
| vacAs1b | vacAs1bF vacAs1bR | 5' AGCGCCATACCGCAAGAG 3' 3' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 5' | 187 | (González-Valencia et al., 2000) |
| vacAm1 | vacAm1F vacAm1R | 5' GGTCAAATGCGGTCATGG 3' 3' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 5' | 290 | (González-Valencia et al., 2000) |
| cagPAI | PAIF PAIR | 5' ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG 3' 3' TCATGCGAGCGGCGATGTG 5' | 360 | (Akopyants, et al, 1998) |
| CagA | cagA5F cagA5R | 5' GATAACAGGCAAGCTTTTTGAGG 3' 3' CTGCAAAGATTGTTTGGCAG 5' | 349 | (Tummuru, et al., 1993) |
| Jhp0940 | Fjhp0940 Rjhp0940 | 5' GAAATGTCCTATACCAATGG 3' 3' CCTAAGTAGTGCATCAAGG 5' | 591 | (Occhialini, et al., 2000) |
| Jhp0945 | Jhp0945F Jhp0945R | 5' CAATGCGACTAACAGCATAG 3' 3' CGCATTTGCTGTCATCTTTG 5' | 1028 | (Occhialini, et al., 2000) |
| Jhp0947 | Jhp0947F Jhp0947R | 5' GATAATCCTACGCAGAACG 3' 3' GCTAAAGTCATTTGGCTGTC 5' | 611 | (Occhialini, et al., 2000) |
| Jhp0949a | Jhp0949aF Jhp0949aR | 5' ATAGGAGTCGGTGCTTACTT 3' 3' AGCAACAACAAAGGCATGTA 5' | 787 | (de Jonge, et al., 2004) |
| Jhp0949b | Jhp0949bF Jhp0949bR | 5' TTCAAAAAGTCCCCGAAATG 3' 3' GGATGTCCTGGCATGTCTCT 5' | 200-300 | (Sugimoto, et al., 2012) |



2. Extracción de DNA cromosomal por el método de GES

1. Adicionar 400 μL de GES sobre el botón celular, mezclar suavemente a temperatura ambiente y colocar en hielo durante 10 min.
2. Agregar 250 μL de acetato de sodio, previamente enfriado en hielo, mezclar y dejar en hielo durante por 5 min.
3. Colocar 680 μL de la solución de Fenol-Cloroformo, mezclar y centrifugar a 14000 rpm durante 5 min.
4. Extraer la fase acuosa (con puntas para DNA) y colocarla en un tubo previamente rotulado.
5. Se repite el paso 3 y 4 pero ahora agregando 680 μL de la solución de Cloroformo-Isoamílico.
6. Adicionar 400 μL de isopropanol, mezclar y deja precipitar toda la noche a -20°C
7. Al día siguiente, centrifugar a 14000 rpm durante 5 min y eliminar el sobrenadante con cuidado de no eliminar el botón de DNA (botón transparente).
8. Lavar el botón de DNA con 800 μL de etanol al 70% frio y centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
9. Decantar el etanol y dejar secar el botón de DNA.
10. Disolver con 100 μL de agua libre de nucleasas y poner 10 a 15 min a 37°C para que el DNA se rehidrate.
11. Almacenar a -20°C hasta su momento de uso.



3. Extracción de DNA a partir de biopsias gástricas por el método de Fenol-Cloroformo

1. Agregar igual volumen de la solución Fenol:Cloroformo:Isoamilico, es decir, si en el tubo tenemos 300 μ L del homogeneizado agregar 300 μ L de la mezcla. Aplicar vortex durante 10 segundo aproximadamente y centrifugar a 14000 rpm durante 10 min.
2. Tomar la fase acuosa y transferirla a otro tubo (con cuidado de no tomar la interfase que contiene restos de proteínas) agregar igual volumen de Cloroformo, centrifugar a 14000 rpm durante 10 min.
3. Tomar la fase acuosa y transferirla a otro tubo, agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y el doble del volumen de isopropanol frio, mezclar suavemente y dejar precipitar toda la noche a -20°C .
4. Al día siguiente centrifugar a 14000 rpm durante 10 min, lavar el botón de DNA con etanol al 70% centrifugando a 14000 rpm por 10 min.
5. Decantar el etanol y dejar secar el botón de DNA.
6. Resuspender el botón en 100 μ L de agua libre de nucleasas y poner 10 a 15 min a 37°C para que el DNA se rehidrate.
7. Almacenar a -20°C hasta su momento de uso.



4. Preparación del master mix para las reacciones de PCR

Para la preparación de las reacciones de PCR para la búsqueda de los factores de virulencia y los genes de UreC y 16S fueron las siguientes:

Gen *UreC* y 16S

| | |
|--------------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.5 µL |
| Primer F y R 50 mM (UreC) | 0.5 µL |
| Primer F y R 50mM (16S) | 0.88 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.15 µL |
| Agua libre de nucleasas (UreC) | 18.35 µL |
| Agua libre de nucleasas (16S) | 17.59 µL |

Gen *dupA1* y *dupA2*

| | |
|-------------------------|---------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.25 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.2 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.15 µL |
| Agua libre de nucleasas | 19.2 µL |

Gen *vacAS1a*, *vacAS1b*, *vacAm1*

| | |
|-------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.5 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.25 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.15 µL |
| Agua libre de nucleasas | 18.85 µL |



Isla cagPAI y CagA

| | |
|-------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.5 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.25 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.15 µL |
| Agua libre de nucleasas | 18.85 µL |

Gen *Jhp0940*

| | |
|-------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.5 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.25 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.15 µL |
| Agua libre de nucleasas | 18.85 µL |

Gen *Jhp0945* y *Jhp0947*

| | |
|-------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.25 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.2 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.2 µL |
| Agua libre de nucleasas | 19.15 µL |

Gen *Jhp0949a* y *Jhp0949b*

| | |
|-------------------------|----------|
| Buffer 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 1.5 µL |
| dNTP's 10 mM | 0.25 µL |
| Primer F y R 50 mM | 0.2 µL |
| Muestra DNA | 1 µL |
| Taq 5 U/µL | 0.2 µL |
| Agua libre de nucleasas | 19.15 µL |

NOTA: todas las reacciones se llevaron a un volumen total de 25 µL



5. Condiciones en el termociclador

Ya hechas las reacciones descritas anteriormente, se procedió a realizar las amplificaciones en el termociclador ARKTIK de Thermo Científico bajo las siguientes condiciones

Genes *UreC* y *16S*

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|--------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 92°C | 30 seg |
| Alinear | 55°C | 40 seg |
| Extender | 72°C | 40 seg |
| 38 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 5 min |

Gen *dupA1* y *dupA2*

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|---------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 1.5 min |
| Desnaturalizar | 95°C | 1 min |
| Alinear | 52°C | 1 min |
| Extender | 72°C | 1 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 7 min |

Gen *vacAS1a*, *vacAS1b*, *vacAm1*

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|---------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 1.5 min |
| Desnaturalizar | 95°C | 1 min |
| Alinear | 50°C | 1 min |
| Extender | 72°C | 1 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 6 min |



Gen CagA

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|--------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 94°C | 1 min |
| Alinear | 52°C | 1 min |
| Extender | 72°C | 1 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 6 min |

Isla cagPAI

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|--------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 94°C | 1 min |
| Alinear | 57°C | 1 min |
| Extender | 72°C | 1 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 6 min |

Gen Jhp0940

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|---------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 92°C | 30 seg |
| Alinear | 56°C | 45 seg |
| Extender | 72°C | 2.3 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 5 min |

Gen Jhp0945 y Jhp0947

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|--------|
| Hold desnaturalizar | 94°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 94°C | 1 min |
| Alinear | 62°C | 1 min |
| Extender | 72°C | 1 min |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 7 min |



Gen *Jhp0949a* y *Jhp0949b*

| Paso | Temperatura | Tiempo |
|---------------------|-------------|--------|
| Hold desnaturalizar | 95°C | 5 min |
| Desnaturalizar | 95°C | 30 seg |
| Alinear | 48°C | 30 seg |
| Extender | 72°C | 30 seg |
| 35 ciclos | | |
| Hold extender | 72°C | 5 min |