



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE ADHERENCIA
babA2 Y DEL GENOTIPO *cagA* DE *Helicobacter pylori*
EN INDIVIDUOS CON GASTRITIS CRÓNICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ CARLOS CAMPERO BASALDUA.

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS.



TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*"Los deseos de nuestra vida
forman una cadena,
cuyos eslabones
son las esperanzas.*

*Debemos agradecer a la vida
por que es ella quien nos guía,
es ella la que nos cuida,
Y nos regala cada día.*

*Cada día, la naturaleza
produce lo suficiente
para nuestras necesidades,
si cada uno tomase lo que
le fuera necesario,
no habría pobreza en el mundo
y nadie moriría de hambre".*

Lucio Anneo Séneca.

AGRADECIMIENTOS.

- A Dios por darme la oportunidad de vivir a lado de las personas que amo y por abrirme el camino del entendimiento y la sabiduría.
- A mis padres por todo el amor y el apoyo incondicional que siempre me brindaron guiándome por el camino correcto.
- A mis hermanos porque siempre que necesite de ellos, me tendieron la mano y nunca me dejaron caer, formaron parte de mi carrera todo el tiempo y se que siempre estarán a mi lado.
- A la UNAM, en especial ala Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de desarrollarme como profesionista, ya que siempre estaré orgullosamente agradecido por haber formado parte de la máxima casa de estudios universitarios.
- A la M. En C. Gloria Luz Paniagua Contreras, por haber aceptado dirigir este proyecto de TESIS, que sirvio para alcanzar mi titulo como Biólogo.
- Al M. En C. Eric Monroy Pérez, por su asesoramiento en el manejo y perfeccionamiento de cada Técnica realizada en este trabajo.
- Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, M. En C. Eric Monroy Pérez, Dr. Diego Julio Arenas Aranda y a la Bióloga Susana Esther González Almazan, por haber aceptado formar parte de mi comité de Sinodales y evaluar estricta y rigurosamente mi Trabajo de Tesis.
- A las biólogas Susana y Paty, encargadas del Laboratorio de Análisis Clínicos de la C. U. S. I. –Iztacala, por el apoyo brindado al realizar mi Servicio Social.

- A todos aquellos profesores que compartieron de su conocimiento a lo largo de la carrera para formarme como Biólogo en esta Facultad.

- A todas aquellas personas que hicieron que estos 4 años de esfuerzo, dedicación y trabajo se amenizaran, por cada palabra que me brindaban y por cada momento de su vida que decidieron compartir conmigo a lo mejor con roces y disgustos pero siempre con ese lazo que nos unió como grupo “la amistad”; en especial a:
 - Chávez Torres Laura
 - De la Garza Padilla Mauricio
 - Espinosa García Maria Guadalupe
 - Flores Pérez José
 - Flores Ramos David Oswaldo
 - Galindo Viveros Josué Jonathan
 - González González Marisol Ibeth
 - Hernández Javier Alma Gabriela
 - Iglesias Sígala Miguel Ángel
 - Macedo Garzón Beatriz Adriana
 - Mayen Ramírez Jimena
 - Mendoza Ledesma Christopher Axel
 - Ortiz Hernández Sarai
 - Pérez Alfaro Pamela y
 - Rivera Valencia Mónica

Índice de Contenido:

Tema: No. de Pág.

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
2.1 Descubrimiento de <i>H. pylori</i>	2
2.2 Características Generales de <i>H. pylori</i>	3
2.3 Epidemiología	5
2.4 Patogénesis y Factores de Virulencia	6
2.5 Pruebas Invasivas	8
2.5.1 Histología.	
2.5.2 Cultivo Bacteriano.	
2.5.3 Prueba Rápida de Ureasa.	
2.6 Pruebas no Invasivas.....	10
3.- Antecedentes	13
4.- Objetivos	16
4.1 Objetivo General.	
4.2 Objetivos Particulares.	
5.- Material y Métodos	17
5.1 Selección de Pacientes y Toma de Productos.	
5.2 Cultivo de <i>H. pylori</i> .	
5.3 Extracción de DNA.	
5.4 Detección de <i>H. pylori</i> por PCR anidado.	
5.5 Detección del Gen de Virulencia <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> por PCR multiplex.	
5.6 Detección del Factor <i>babA2</i> de <i>H. pylori</i> por PCR.	
5.7 Análisis de las Muestras Amplificadas por Electroforesis en Geles de Azarosa.	
6.- Resultados	21
7.- Discusión	27
8.- Conclusiones	33
9.- Bibliografía	34

RESUMEN

Debido a que en México la prevalencia de *H. pylori* es muy elevada, el propósito de este estudio fue determinar la presencia del gene citotóxico *cagA*, así como el factor de adherencia *babA2* de *H. pylori* en biopsias gástricas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 del IMSS, Tlalnepantla, Estado de México, que fueron canalizados al departamento de gastroenterología por presentar cuadro clínico de gastritis crónica. *Helicobacter pylori* fue identificado en los cultivos gástricos de los enfermos por PCR anidado, el genotipo *cagA* por PCR multiplex y el factor *babA2* por PCR convencional. Se cultivaron muestras gástricas de 100 pacientes con gastritis crónica. En el 47% (n = 47) de los cultivos se detectó *H. pylori* por PCR anidado. El genotipo *cagA* se detecto en el 83.5 % (n = 39) y *babA2* en el 16.5% (n = 8). La asociación *cagA/babA2* se detecto en el 25.5% (n = 12) de las cepas de *H. pylori*. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *H. pylori* identificadas en el estómago de los enfermos fueron virulentas. La combinación de los genotipos *cagA/babA2* en las cepas de *H. pylori* que producen altos niveles de citotóxina asociada con ulcera péptica y con cáncer gástrico, reflejo lo grave de la gastritis, por lo que fue necesario la administración de tratamiento médico oportuno, además del seguimiento estricto de los pacientes para evitar patologías más severas.

INTRODUCCIÓN

Descubrimiento de *H. pylori*.

Desde los inicios del siglo XX se habían tenido reportes de un microorganismo en forma de espiral que infectaba los estómagos de animales, estas observaciones fueron realizadas por Bizzozzero, un conocido anatomista que describió a *H. pylori* en 1893 (Bizzozzero G. 1893). Sin embargo fue hasta 1979 cuando Robert Warren observo por vez primera la presencia de bacterias con forma curva en biopsias de pacientes con gastritis crónica, asociando la inflamación de la mucosa gástrica con la bacteria. En 1981 Barry Marshal se une a la investigación de Warren y fue hasta el año siguiente cuando comenzaron un estudio con endoscopias de pacientes para tratar de cultivar la bacteria, hasta que por una cuestión accidental en 1982 logran aislar y cultivar el organismo por primera vez, en el Hospital Royal Perth de Australia (Figura 1) (Warren J. and Marshal B. 1983).



Fig. 1: Warren (Izquierda) y Marshal (Derecha).

En los primeros estudios realizados con esta bacteria se describió como un organismo semejante a *Campylobacter* spp, esto debido a que las condiciones de cultivo y crecimiento eran muy similares a las de este género, además de su apariencia en las tinciones de Gram y del requerimiento microaerofílico, por lo que se le denominó *Campylobacter pyloridis*. Sin embargo existían características atípicas como la presencia de 4 a 6 flagelos y la carencia de filamentos axiales.

Posteriormente estudios moleculares comparativos mostraron las diferencias en la secuencia de RNAr, la producción de ureasa y composición de ácidos grasos, lo que llevo a la proposición del nuevo género *Helicobacter*.

Características generales de *H. pylori*.

Helicobacter pylori, es un microorganismo Gram-negativo de crecimiento lento, curvo, espiralado y microaerofílico, que mide aproximadamente 3.5 por 0.5 micrómetros, posee múltiples flagelos en uno de sus polos cualidad que lo caracteriza por su gran movilidad (Figura 2). *Helicobacter pylori* es considerado el patógeno gástrico en humanos responsable de la gastritis crónica, úlcera péptica y del cáncer de estomago (Figura 3) (Marshall B. 1994).



Fig. 2: *Helicobacter pylori*.



Fig. 3: a) Gastritis crónica, b) Úlcera péptica y c) Cáncer de estómago.

Las colonias de *H. pylori* son pequeñas (2 a 5 mm), el color va de traslucido a amarillento (Figura 4), en cultivos frescos la bacteria es pleomorfica pero la mayoría tiene formas definidas en “U”, mientras que en cultivos con mas de 12 días se verán formas cocoides difíciles de aislar e identificar (Dent J. 1988).

H. pylori es positivo para la oxidasa y catalasa. La oxidasa inhibe la secreción de ácido gástrico y protege al organismo de radicales libres, mientras que la catalasa es una enzima que protege a la bacteria de la acción fagocítica de los neutrófilos (Eaton K A., et al. 1991), ambas enzimas son fundamentales para su identificación.



Fig. 4: *Helicobacter pylori*, las colonias presentan aspecto brillante y transparente.

Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a esta bacteria como carcinogénica Tipo I. Se ha estimado que el 50% de la población a nivel mundial se encuentra infectada por *Helicobacter pylori*, en donde la prevalencia de infección en países desarrollados y en los países en vías de desarrollo varía del 19 al 57%, este porcentaje se ve incrementado con el paso del tiempo. (Mitchell H. M. 1999). En México, la prevalencia de infección por *H. pylori* es de un 66% (Torres J., et al. 1998). Varios autores han reportado la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y han propuesto que ésta podría ser la fuente de la infección y de la reinfección del estómago después de la terapia, así como de la transmisión a otras personas. (Wotherspoon A., et al. 1993).

Recientemente se ha aceptado que la transmisión de *Helicobacter pylori* ocurre de persona a persona por vía oral-oral, fecal-oral y gastro-oral. Existen factores de riesgo para la infección por esta bacteria, como el bajo nivel socio-económico, las prácticas de higiene, el hacinamiento, el tabaquismo, el consumo alto de sal de dieta, el consumo de alcohol, etc. (Cullen D., et al. 1997).

Helicobacter pylori coloniza el estómago del humano en forma de parches en la mucosa gástrica, permaneciendo por años o décadas. Se ha descrito que aproximadamente el 70% a 80% de las personas infectadas, desarrollan inflamación crónica superficial difusa que involucra tanto al antro como al fondo gástrico. (Atherton J. 1998). La distribución de *Helicobacter pylori* en el estómago es al parecer muy

importante, pues podría determinar el resultado patológico de la gastritis atrófica que a su vez tiende a desarrollar ulcera gástrica.

Esta infección produce anomalías importantes en la secreción de hormonas de polipéptidos gastrointestinales, la más importante es la gastrina, hormona peptídica producida por las células G, que se encuentran principalmente en el antro del estómago (Cover T, et al 1995).

Patogénesis y Factores de virulencia

Se ha reportado que la patogenia de *Helicobacter pylori* se debe a factores de virulencia como: la producción de ureasa (codificada por 7 genes del cromosoma *ureA* a *ureG*), que le permite la adaptación al pH del estómago, mediante la hidrólisis de la urea, cuyos productos (amonio y carbamato) se descomponen para producir amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas (Yu J., et al. 2002).

Se han descrito varios factores de virulencia de *Helicobacter pylori*, dentro de los cuales los más importantes son los genotipos citotóxicos *cagA* (cytotoxin associated gene), *vacA* (vacuolization associated gene) y *baba2*. (Yamaoka Y., et al 1993). El factor de adherencia *baba2* es esencial para la inducción de gastritis, y en donde las lesiones ocasionadas son de tipo adhesión-efacelación que se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión.

El gen *cagA* no se presenta en todas las cepas de *H. pylori*, pero forma parte del islote de patogenicidad (*cagPAI*), que contiene 31 genes. Por lo tanto, su detección molecular indica la presencia del PAI en el cromosoma del microorganismo (Gusmão VR., et al. 2000). Las cepas *cag+* (cepas tipo I) se asocian a mayor virulencia, al inducir daño gástrico visible, mientras que las cepas *cag-* (cepas tipo II) se asocian a menor virulencia y se comportan como bacterias comensales más que patógenas. (Queiroz DM., et al. 1998).

La citotoxina vacuolizante *VacA* es secretada por alrededor de 50% de las cepas de *H. pylori* y causa degeneración vacuolar de las células gástricas epiteliales y ulceración de la mucosa gástrica. (Queiroz DM., et al. 1998). La citotoxina es codificada por el gen *vacA*, que puede presentar mosaico genético en base a variaciones alélicas en las regiones media (alelos *m1* o *m2* y subtipos) y de señal (alelos *s1* o *s2* y subtipos) del gen 13 y 14. (Holcambe C., et al. 1992).

Específicamente, se ha demostrado que cepas *vacA s1/m1* poseen más actividad citotóxica en comparación con cepas *s1/m2* y cepas *s2/m2*. Recientemente, se ha demostrado que factores de adherencia bacteriana contribuyen a la patogenicidad de *H. pylori*. Así, la adhesina, codificada por el gen *babA2*, favorece una unión persistente entre el microorganismo y la célula epitelial gástrica por unión de la célula bacteriana a través de su proteína BabA2 con antígeno de grupo Lewis B (LeB), presente en la mucosa gástrica.

Por lo tanto, las cepas de *H pylori babA2* positivas presentan mayor capacidad de adherencia, en cambio, las cepas *babA2* negativas se adhieren débilmente. (Camargo., et al. 2004). Esta adherencia se ha asociado con altos niveles de infiltración linfocitaria, atrofia glandular, metaplasia intestinal e incremento de la proliferación epitelial, reportándose una asociación significativa con úlcera duodenal y cáncer gástrico. (Zambon C. F., et al. 2003). Así la identificación de los genes *cagA* y *babA2* permite diferenciar las cepas con mayor virulencia asociadas con cuadros clínicos más severos. (Yamaoka Y., et al 1993).

Pruebas invasivas.

Existen métodos empleados para el diagnóstico de *H. pylori*, estos métodos tienen gran historia, pues los hay desde aquellos que involucran pruebas invasivas y no invasivas, y cualquiera de estas pruebas arrojan resultados que son de alta especificidad y sensibilidad. Los métodos invasivos son pruebas realizadas en un hospital, donde se emplean biopsias gástricas tomadas en endoscopia para realizar pruebas histológicas, de cultivo bacteriano y la prueba rápida de ureasa. (Cutler A. F., et al., 1995).

HISTOLOGIA:

Las pruebas endoscopias gástricas del antro o del cuerpo se fijan en formalina, se procesan rutinariamente y se tiñen, con hematoxilina y

eosina, Warthin-Starry o tinción modificada de Giemsa. Este método ha demostrado ser sensible y específico en un 90% para la identificación de la bacteria (Hernández F., and Rivera P. 1992).

CULTIVO BACTERIANO:

Las biopsias gástricas se colocan en medios de transporte de Stuart, en caldo de Brucela o solución salina isotónica estéril. Dentro de las horas siguientes se inoculan en medios selectivos suplementados con sangre de caballo, carnero o polienriquecimiento y antibióticos. Las placas se incuban con 5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N (condiciones de microaerofilia) a 37°C durante 5 o 7 días. La identificación del microorganismo se hace a través de su morfología colonial, tinción de Gram y características bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasas positivas). La especificidad y sensibilidad de esta prueba es del 90% y 95% respectivamente. *Helicobacter pylori* es una bacteria difícil de cultivar y este método es prolongado y costoso además de que es un método indispensable para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de la bacteria, y para la extracción de DNA para el uso de técnicas moleculares. (Hernández F., and Rivera P. 1992).

PRUEBA RAPIDA DE UREASA:

Esta técnica depende de la potente enzima ureasa producida por *Helicobacter pylori*, que hidroliza la urea en amonio y CO₂. Se coloca una colonia de *H. pylori* obtenida de cultivo gástrico, en el centro de la prueba CLOtes (disponible comercialmente), un resultado positivo se indica por un cambio en el color indicador de pH, de amarillo a rosa mexicano, en términos de tiempo que van desde unos minutos hasta

una hora máximo. Pueden presentarse resultados positivos falsos por la presencia de otros microorganismos productores de ureasa. (Goodwin C. S. and Worsley B. W. 1993).

Pruebas no invasivas.

Las pruebas diagnosticas no invasivas para *Helicobacter pylori* son métodos disponibles en la primera atención y estas comprenden: a) la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA, es especialmente útil para detectar la infección por esta bacteria en los pacientes. b) la prueba de saliva para *Helicobacter pylori*, esta no es tan sensible ni tan especifica como las basadas en suero y la prueba con jugo gástrico esta en espera de validación adicional y c) prueba de urea en aliento: estas pruebas utilizan isótopos C^{13} y C^{14} , son fáciles de realizar, seguras y de alta sensibilidad (95%) y especificidad (100%). La prueba de urea en aliento implica la recolección de una muestra de aliento antes y después de treinta minutos al término de beber una solución con los dos isótopos. Si *Helicobacter pylori* esta presente su enzima ureasa hidrolizará la urea en CO_2^{13} o CO_2^{14} que finalmente será excretada en el aliento. (Li C. Musich, et al. 1995).

La técnica de **PCR** (Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite seleccionar y amplificar una region en particular del DNA *in vitro*, imitando el fenómeno de la replicación del DNA in vivo, o del RNA en el caso de la RT-PCR. La polimerasa comienza en cada

primero y copia la secuencia de esa cadena. En un tiempo corto se producen réplicas exactas de la secuencia blanco.

En ciclos subsecuentes, las moléculas de doble cadena, del DNA original y de las copias, se separan, los primeros se unen nuevamente a las secuencias complementarias y la polimerasa las replica. Al término de muchos ciclos se han incrementado los pequeños segmentos de DNA que tienen la secuencia blanco, y esta información genética amplificada queda disponible para un análisis posterior (Guyer RL y Koshland DE Jr., 1989). Se puede usar en el diagnóstico de enfermedades genéticas (Saiki RK *et al.*, 1985); la detección de microorganismos fastidiosos o no cultivables (Bernet C *et al.*, 1989; Singh UB 2006; Schild M *et al.*, 2007); identificación de virus VIH (Vazquez Pérez JA *et al.*, 2006); papiloma (Han J *et al.*, 2006); amplificación de DNA a partir de materiales fósiles (Paabo S, 1989); estudios de Biología evolutiva (Paabo S *et al.*, 1989); investigaciones forenses a partir de muestras biológicas en la escena del crimen (Kocher TD *et al.*, 1989); secuenciación de fragmentos específicos de DNA (Scharf S *et al.*, 1986).

Este método ha sido recientemente desarrollado para detectar cepas ulcero-génicas basado en regiones representativas de los genes *vacA baba2* y *cagA* de las cepas de *Helicobacter pylori*, se utilizan indicadores específicos que son generadas de regiones individuales para la caracterización de alelos específicos del gen a estudiar. (Nilsson H. O., et al. 1996).

Debido a que en nuestro país existe muy poca información epidemiológica sobre la prevalencia de *Helicobacter pylori* en la población, el propósito de este trabajo será la detección de *Helicobacter pylori* por PCR anidado, así como la de los genes de virulencia *cagA* y *babA2* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con gastritis crónica.

ANTECEDENTES

- **Donati Manuela y colaboradores en 1997**, detectaron anticuerpos séricos para *vacA* y *cagA*. Los anticuerpos séricos IgG para *vacA* estuvieron presentes en el 69% de los pacientes.
- **Morales R. y colaboradores en 1999**, estudiaron la infección múltiple por *Helicobacter pylori* en pacientes Mexicanos y frecuencia de los genotipos *vacA* y *cagA*. Estos autores estudiaron las cepas aisladas de 20 de pacientes y la mayoría (75%) presentó la asociación *vacA m1/s1* y 5 (25%) el gen *vacA s2/m1*. El 40% de los pacientes presentó el genotipo *cagA* positivo.
- **Wong J., y colaboradores en el 2002**, realizaron un estudio de comparación de los genotipos citotóxicos de *Helicobacter pylori* en estómago y saliva, estudiaron a 31 pacientes con gastritis y úlcera péptica y relacionaron los genotipos *vacA m1*, *vacAm2*, *vacAs1* y *cagA*. Estos autores identificaron un 95% la presencia de estos genotipos en el estómago y el 5% restante en saliva de los pacientes, *vacAm1* fue registrado en un 78%, *vacAm2* en un 64% y *cagA* en un 66.9% en el foco de infección estudiado.

- **Lobo Gatti L. y colaboradores en el 2003**, elaboraron un estudio sobre *Helicobacter pylori* y los genes *vacA* y *cagA* en niños de Brasil con gastritis crónica.
- **Hua Y. y colaboradores en el 2004**, realizaron un estudio de frecuencia de los genotipos *iceA* y *babA2* de *Helicobacter pylori* en la población China, donde detectaron el genotipo *iceA1* en 105 de 141 pacientes equivalentes al 74.5%, el genotipo *iceA2* en 22 de 141 pacientes equivalentes al 15% y *babA2* en 90 de 141 pacientes que equivale al 63.8%.
- **Garcia A. y colaboradores en el 2006**, detectaron los genotipos *cagA*, *vacA* y *babA2* en cepas clínicas de *H. pylori*. Estos autores encontraron que los genes se encontraron asociados con la patología. *cagA* estuvo presente en 16 cepas, *baba2* en una y *vacA* s1, s2, m1 y m2 en 28 cepas.
- **Paniagua G. y colaboradores en el 2007**, realizaron un estudio donde establecieron la prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos citotóxicos *vacA* y *cagA* en la cavidad oral de pacientes con gastritis crónica (n = 102). *H. pylori* fue detectado en la saliva de los pacientes por PCR anidado y las variantes alélicas del gen *vacA* y del gen *cagA* por PCR multiplex. Los

anticuerpos IgG contra *H. pylori* fueron medidos por un método inmunoenzimático. El suero de 76 pacientes (74%) fue positivo para anticuerpos IgG contra *H. pylori*, y la bacteria fue detectada por PCR anidado en 60 de ellos. Los genotipos *vacA* y *cagA* fueron detectados en el 45% (n = 27) de los pacientes positivos para *H. pylori*; 10% *vacA* m2 (n = 6); 8.3% *vacA* s1 (n = 5); 6.6% *vacA* s2/*cagA* (n = 4); 6.6% *vacA* s2 (n = 4) y 6.6% *vacA* m1 (n = 4). Los resultados mostraron que *H. pylori* se encuentra en la cavidad oral, y que ésta puede ser un reservorio para la transmisión oral-oral de esta bacteria.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Detección de los genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* en biopsias de pacientes con gastritis crónica

Objetivos particulares.

- Identificación de *H. pylori* en cultivos gástricos de los pacientes infectados mediante PCR anidado
- Detección por PCR de los genes *cagA* y *baba2* de *Helicobacter pylori* en los cultivos gástricos de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de los pacientes y toma de los productos.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron en el Hospital Regional No. 72 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ubicado en el Municipio de Tlalnepantla Estado de México, pacientes que fueron canalizados al departamento de gastroenterología para estudios endoscópicos por presentar signos y síntomas de enfermedad ácido-péptica (enfermedad por reflujo gastroesofágico, gastritis aguda o crónica, gastroduodenitis, úlcera gástrica, duodenal o ambas). Todos los pacientes en este trabajo firmaron carta de consentimiento informado institucional para utilizar parte de la biopsia obtenida de la zona antral para cultivo y genotipificación. Los pacientes que se incluyeron en este estudio no estaban bajo algún tratamiento con antibióticos o algún otro tipo de medicamento que nos pudiera interferir con los métodos de detección de *H. pylori* en un tiempo mínimo de 3 meses. Una parte de la biopsia de cada paciente fue procesada en el servicio de patología del Hospital Regional No. 72 del IMSS y la otra fue transportada al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Cultivo de *H. pylori*.

Las biopsias gástricas fueron maceradas y homogeneizadas en caldo de Brucella. Una alícuota (100 µl) fue cultivada en agar Casman suplementado con 5% de sangre de caballo e inhibidor de la microbiota acompañante (DENT), a 37°C, en microaerofilia (85% N₂, 10% de CO₂ y 5% de O₂), por cuatro días. Las colonias se identificaron mediante test de ureasa, catalasa y tinción de Gram.

Extracción de DNA.

El DNA de *H. pylori* de los cultivos se extrajo por el método descrito por Chattopadhyay (30). Las colonias de *H. pylori* fueron colectadas y suspendidas en tubos para centrifuga con 125 µl de PBS estéril y agitadas vigorosamente en un vortex por 2 minutos. Posteriormente los tubos se colocaron en agua hirviendo por 15 minutos e inmediatamente fueron colocados en hielo. Al término los tubos se centrifugaron a 12 000 revoluciones por 1 minuto. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20°C hasta su utilización para PCR.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado.

La detección de *H. pylori* por PCR anidado se realizó por el método previamente descrito (Mazurier et al 1992). Para la primera ronda de detección de *H. pylori* se utilizaron los primers EHC-U (5'-CCCTCACGCCATCAGTCCCAAAA-3') y EHC-L (5'-AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAAC-3') homólogos a un fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori* (80076-80492 pb), en donde el tamaño de los amplicones obtenidos fue de 417 bp. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1 µl de cada primer EHC-U (25 pmol) y EHC-L (25 pmol) (los primers fueron de Sigma-Genosys), 2.5 µl de solución buffer para PCR 10x, 10.5 µl de H₂O libre de nucleasa, 10 µl de DNA de templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads).

La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C

por 5 minutos; seguido de 40 ciclos de 94° C por 45 segundos, 59° C por 45 segundos y 72° C por 30 segundos . Finalmente una extensión final a 75° C durante 10 minutos.

Para la segunda ronda de amplificación y basados en la secuencia del fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori*, se utilizaron los primers ET-5U (5'-GGCAAATCATAAGTCCGCAGAA-3') y ET-5L (5'-TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3') complementarios a un fragmento interno de los amplicones EHC-U y EHC-L, en donde el tamaño de los amplicones esperados fue de 230 bp (80198-80427 bp). La amplificación de la segunda ronda fue similar a la primera, excepto que 0.2 µl del producto de la primera ronda se utilizo como DNA templado y únicamente 25 ciclos de amplificación. Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizo el DNA extraído de *H. pylori* ATCC 43629. Como control negativo se utilizo una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el DNA templado.

Detección del gene de virulencia *cagA* de *H. pylori* por PCR multiplex.

Para la detección de *cagA* se utilizaron los primers *cag5c-F* y *cag3c-R* (10 pmol), 5'-AATACACCAACGCCTCCAAG-3' y 5'-TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC-3' a 400 pb. (Letley D. et al., 1999). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1 µl de cada primer, 16 µl de H₂O libre de nucleasa, 3 µl de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del DNA se

realizo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión de 72°C por 10 minutos.

Detección del factor *babA2* de *H. pylori* por PCR.

Para *babA2* se utilizaron los primers *baba1* y *baba2* a una concentración de 12.5 pmol 5'-ATCCAAAAGCAGAAAAGTATGAAA-3' y 5'-TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA-3' a 850 pb. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1 µl de cada primer, 20 µl de H₂O libre de nucleasa, 3 µl de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 45 minutos. Finalmente una extensión de 72°C por 5 minutos.

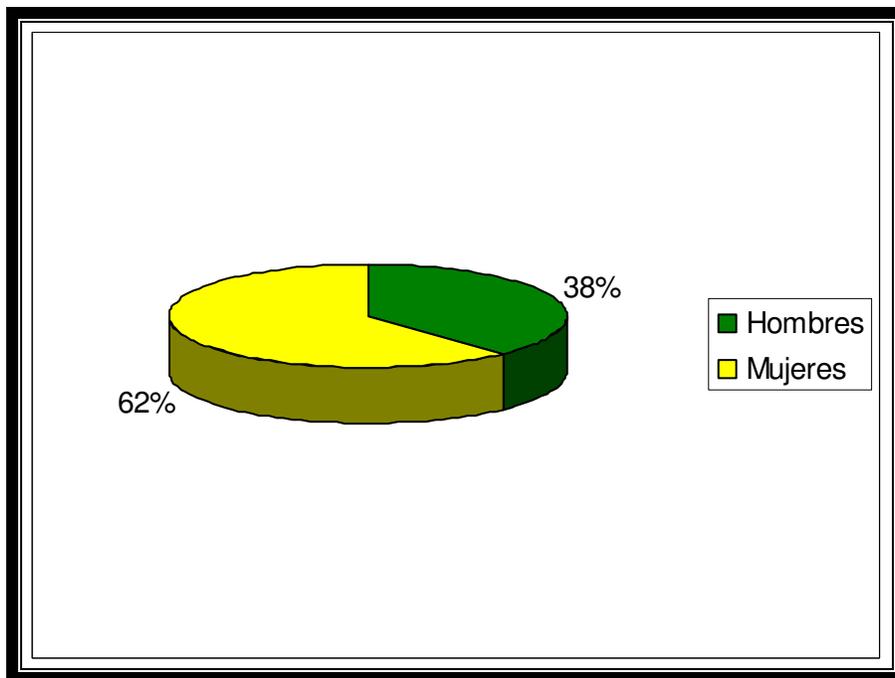
Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa.

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

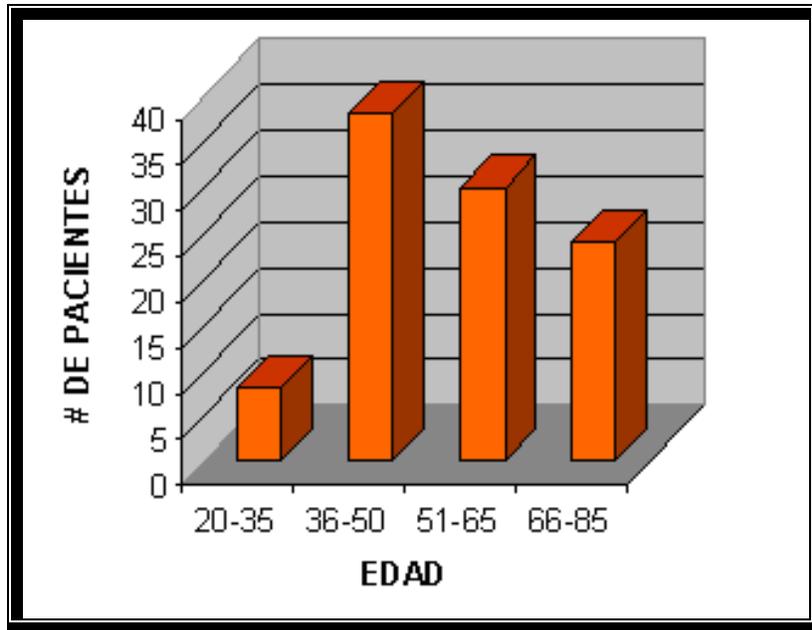
RESULTADOS

Selección de pacientes

En este estudio se analizaron los cultivos de las biopsias gástricas de un total de 100 pacientes, de los cuales el 62% (n = 62) correspondió al sexo femenino y el 38% (n = 38) al sexo masculino. (Grafica 1). Así mismo el rango de edad en el que se encontraban los pacientes era de 20 a 85 años. (Grafica 2).



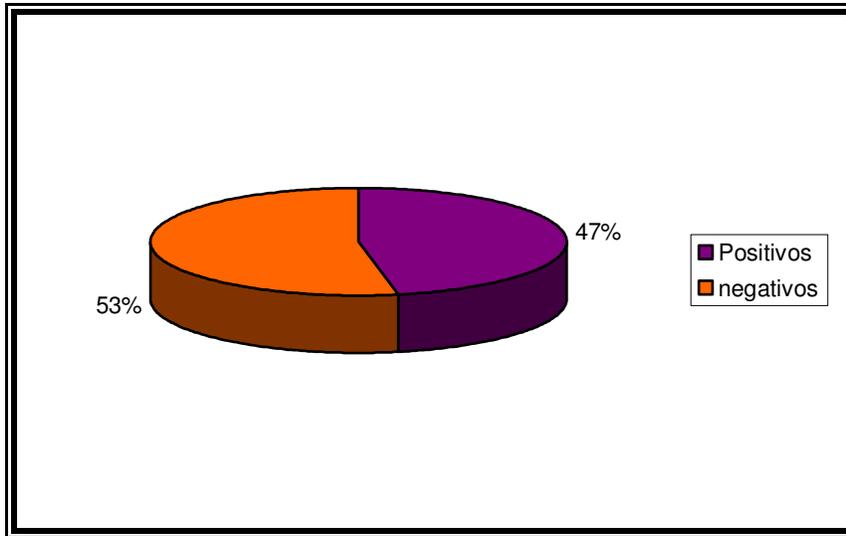
Grafica 1: Distribución de los pacientes analizados por sexo.



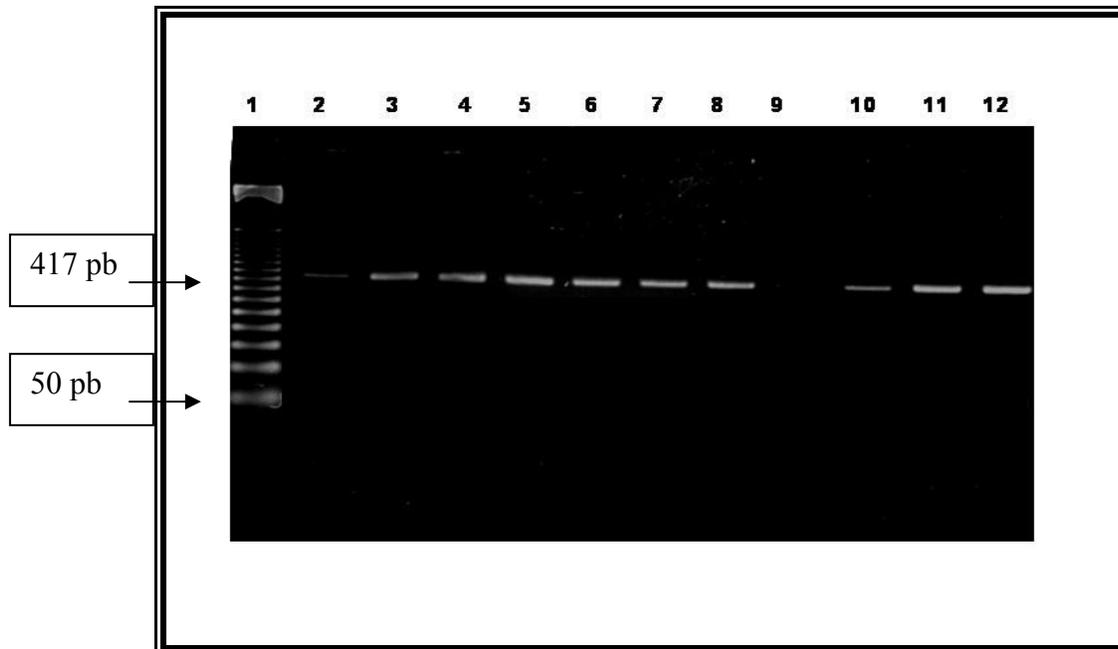
Grafica 2: Edad de los pacientes estudiados.

Detección por PCR anidado de *Helicobacter pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con gastritis.

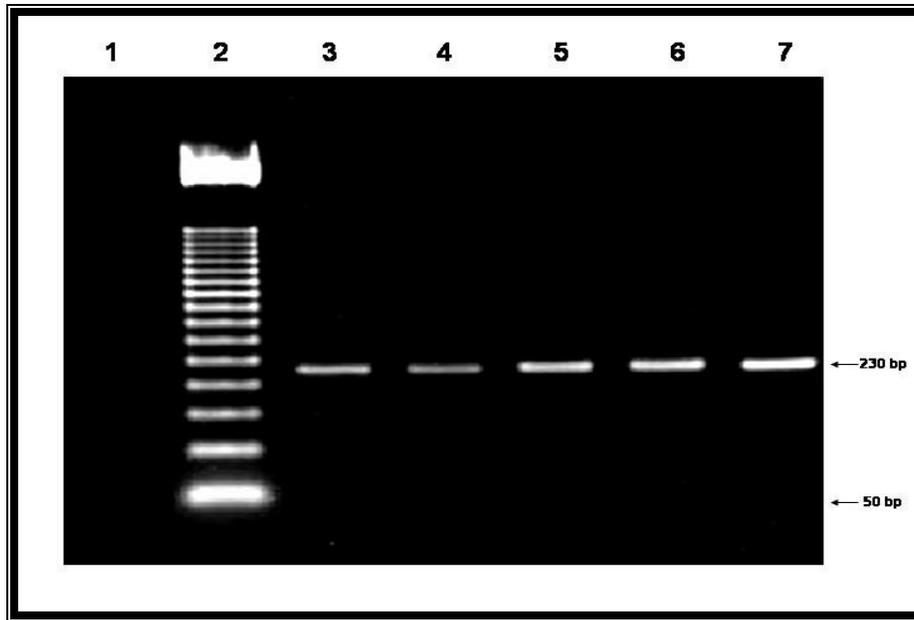
Se cultivaron las muestras gástricas de 100 pacientes con gastritis crónica, de las cuales el 47% (n = 47) de las muestras resultaron positivas y el 53% (n = 53) negativas. (Grafica 3). El tamaño de los amplicones obtenidos para la detección por PCR anidado en la primera ronda fue de 417 pb (Fotografía 1), y el tamaño de los amplicones para la segunda ronda fue de 230 pb (Fotografía 2).



Grafica 3: Grafico que muestra los casos positivos para *H. pylori*.



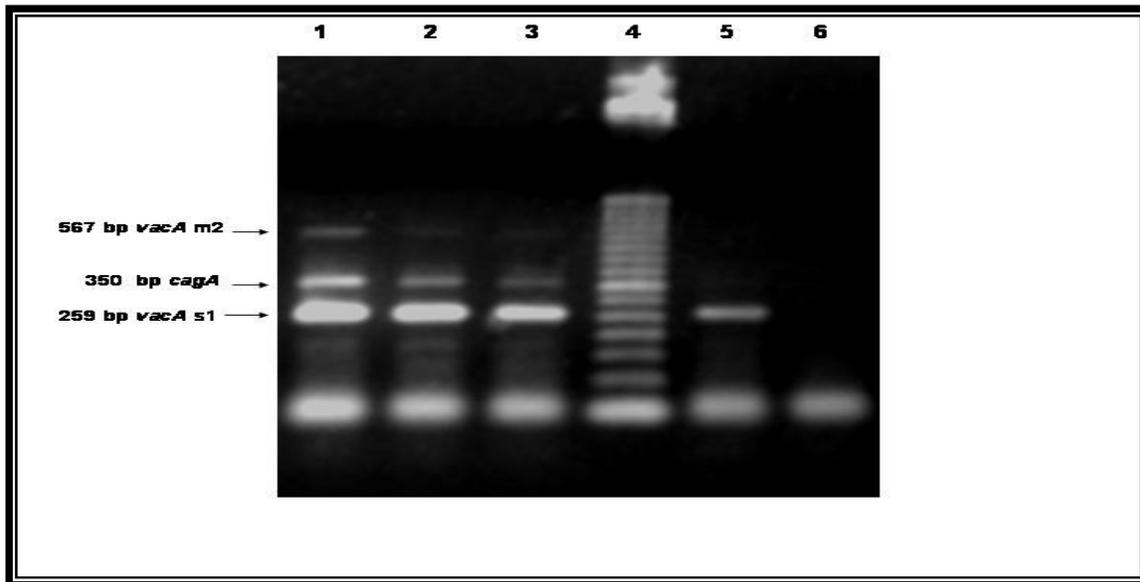
Fotografía 1. Detección por PCR de *H. pylori* Tipo 1 en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes. Línea 1, MWM 50 bp DNA ladder, Línea 2-8, *H. pylori* detectado en biopsias de pacientes, línea 9 control negativo (sin DNA templado). Línea 10, *H. pylori* detectado en biopsias de pacientes, línea 11 y 12 control positivo *H. pylori* ATCC 43629.



Fotografía 2. Detección de *H. pylori* Tipo 2 en las biopsias mediante la amplificación de DNA por PCR anidado. Línea 1, Control negativo (contiene todos los componentes necesarios excepto DNA). Línea 2, 50-pb DNA ladder. Línea 3-5 y 7, *H. pylori* aislado de biopsias gástricas de niños. Línea 6, *H. pylori* ATCC 43629.

Detección del genotipo de virulencia *cagA* de *Helicobacter pylori* por PCR múltiplex en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes.

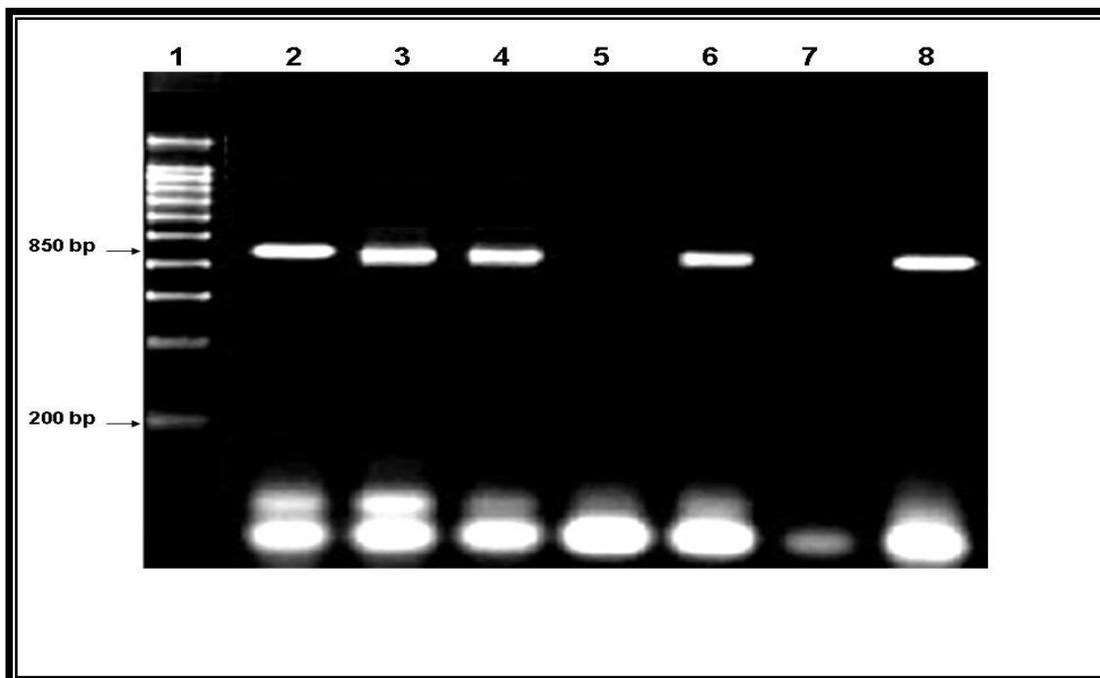
A partir de las 47 (47%) cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con gastritis (n = 100) se sometieron a la detección del genotipo *cagA* por PCR múltiplex, dentro de los resultados encontrados se detectó el genotipo *cagA* en el 83% (n = 39) y el tamaño de los amplicones obtenidos en el PCR fue de 350 pb (Fotografía 3). Observando que la mayoría de los pacientes se encontraban dentro de un rango de edad que va de los 35 a los 50 años (Grafica 2).



Fotografía 3. Amplificación por PCR múltiplex de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* en las cepas obtenidas de los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes. Línea 1 *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo). Líneas 2 y 3, *vacA* s1, *cagA* y *vacA* m2 (cultivo de biopsias). Línea 4, MWM 50-bp ladder. Línea 5, *vacA* s1 (cultivo de biopsia). Línea 6, Control negativo (sin DNA templado).

Detección del factor de adherencia *babA2* de *Helicobacter pylori* por PCR.

De las 47 (47%) cepas de *H. pylori* que resultaron positivas de las biopsias aisladas de los pacientes con gastritis (n = 100) se sometieron a la detección del factor de adherencia *babA2* por PCR múltiplex, el cual fue identificado en el 43% (n = 20). El tamaño de los amplicones obtenidos fue de 850pb (Fotografía 4). Además se encontraron asociaciones del genotipo *cagA* y del factor de adherencia *babA2* en el 25.5% (n = 12) del 100% (n = 47) de las muestras estudiadas (Tabla 1).



Fotografía 4. Detección por PCR del factor de adherencia *babA2* de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica. Línea 1, MWM 200 pb DNA ladder; Línea 2- 4 y 8, pacientes que resultaron positivos para el factor de adherencia *babA2* de *H. pylori* ; Línea 5 paciente negativo al factor de adherencia *babA2*; Línea 6, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 7, Control negativo (sin DNA templado).

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

Genotipo Detectado	Porcentaje	No. de Muestras (n = 47)
<i>cagA</i>	83.5%	39
<i>babA2</i>	16.5%	8
<i>cagA</i> y <i>babA2</i>	25.5%	12

DISCUSIÓN

Pacientes analizados.

En este estudio nosotros analizamos por cultivo bacteriano las biopsias gástricas de 100 pacientes que habían acudido al Hospital General Regional No. 72 del IMSS, ubicado en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México, a realizarse estudios endoscópicos por presentar signos y síntomas de gastritis crónica (62 mujeres y 38 hombres, Grafica 1). La gastritis es una enfermedad que afecta al 50% de la población mundial, y en países en vías de desarrollo éste porcentaje se incrementa hasta el 80% (González G., et al 2000). La causa de la gastritis pueden deberse a una mala alimentación, el consumo de alcohol, el uso prolongados de medicamentos antiinflamatorios, lesiones traumáticas, anemia y principalmente debido a *H. pylori* (Malaty M., et al 1992; Goh L. 1997).

En la infección por *H. pylori* existen diferentes factores de riesgo, como la edad (Banatvala N., et al. 1993), el bajo nivel socioeconómico, diferencias nutricionales y malos hábitos higiénicos (Morris L., 2000). Actualmente se ha aceptado que la transmisión de *H. pylori* ocurre de persona a persona (Mitchel M. 1999), aunque los mecanismos de transmisión todavía no son del todo claros (Goodman J., y Correa P. 2000). En Sudamérica se ha reportado que el agua y los alimentos mal cocinados son la principal fuente de diseminación de la bacteria (Goodman J., et al. 1996).

La edad de nuestros pacientes se encontró comprendida entre los 20 y los 85 años, dentro de los cuales el 38% (n = 38) de los pacientes se encontró en el rango de 36 a 50 años y el 30% (n = 30) entre los 51 y los 65 años (Gráfica 2). Se ha reportado que en países subdesarrollados el porcentaje de infección por *H. pylori* a la edad de 20 años alcanza hasta el 80% (Holcombe C., et al. 1992), mientras que en países de vías de desarrollo el porcentaje de infección es del 21% o menor (Mitchel M., et al. 1992). Estas diferencias han sido atribuidas al índice de adquisición en la niñez, por ejemplo en países desarrollados es del 0.5 al 2.0% y en países de vías de desarrollo del 13 al 60%. (Al- Moagel A., et al. 1990; Graham Y., et al. 1991; Jones M., et al. 1986 y Megraud F., et al. 1989).

El hecho de que en los países desarrollados la infección por *H. pylori* disminuya en el proceso de la niñez a la edad adulta, puede deberse al tratamiento médico adecuado, además de la mejora en las condiciones de vida y en cuestiones de salubridad (Replogle L., et al. 1996 y Andersen P., et al. 1996) lo cual no ocurre en los países subdesarrollados.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado en las cepas aisladas de las biopsias gástricas de los pacientes enfermos.

Con el propósito de detectar *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes se utilizaron los primers EHC-U y EHC-L dirigido a un fragmento de 860 pb del cromosoma de *H. pylori*, lo cual han mostrado tener mayor especificidad que los utilizados para amplificar el gen de la ureasa (gen 16S RNAr) (Song T., et al. 1999).

A partir de los 100 cultivos de biopsias analizadas por PCR en este estudio, describimos que el 47% (n = 47) resultó positivo para *H. pylori* y el 53% (n = 53) negativo (Grafica 3, fotografía 1 y 2). Nuestro porcentaje de identificación de *H. pylori* por PCR fue inferior al descrito en un estudio realizado en el 2007 con 102 pacientes con gastritis crónica, en el cual se detectó *H. pylori* por el mismo método de PCR, pero en la saliva de los pacientes con gastritis, dentro de los cuales el 58% resultó positivo (n =56) (Paniagua G., et al. 2007). La infección por *H. pylori* en nuestro país es muy elevada, por ejemplo en un amplio estudio seroepidemiológico de infección por *H. pylori* realizado en el periodo de 1987 a 1988, en el cual de las 11,605 muestras de suero obtenidas de pacientes que se encontraban en las edades de 1 a 90 años, pertenecientes a distintas zonas geográficas y diferente nivel socioeconómico de 32 estados de México, la seroprevalencia por *H. pylori* fue del 66% (n = 7720) (Camargo C., et al. 2004).

El porcentaje de infección por *H. pylori* encontrado en nuestro estudio es semejante al estudio realizado en Lagos Nigeria, en 189 biopsias gástricas obtenidas de 63 pacientes (3 muestras de cada paciente) con síntomas gástricos, en donde el 40% (n = 76) de los cultivos fue positivo para *Helicobacter pylori* con los tres métodos de PCR utilizados (Smith I., et al. 2004). En otro estudio realizado en la Universidad de Sao Paulo, Brasil, con pacientes que se encontraban entre la edad de 9 y 83 años con síntomas de enfermedad gástrica, se encontró por PCR que el porcentaje de infección fue del 67.7% (n = 75) (Ramos K., et al. 2005). Comparados con Latinoamérica, en México la prevalencia se encuentra por debajo de Chile y Bolivia en donde la población infectada por *H. pylori* se encuentra entre el 73% y 74% respectivamente (Serrano C., et al. 2007 y Santos I., 2005), y también por debajo de Brasil, en donde la prevalencia de infección por *H. pylori* es del 87% (Andreia M., et al. 1999). La prevalencia de infección por *H. pylori* en este estudio se encontró por arriba de las cifras encontradas en países como Australia, en el cual el 21% de la población total se encontró infectada, y al de Estados Unidos, Alemania o Francia en donde la prevalencia no supera el 30% (Megraud F., et al. 1989; Everhart E., et al. 2000 y Breuer T., et al. 1996).

Amplificación del genotipo *cagA* y del factor de adherencia *babA2* de *H. pylori* en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido péptica por PCR multiplex.

En este trabajo describimos que a partir del 47% (n = 47) de los cultivos PCR positivos para *H. pylori* (Gráfica 3), el 83% (n = 39) de las cepas presentó el gen *cagA* (350 pb) (fotografía 2, tabla 1). Este porcentaje resultó superior al descrito en un estudio realizado en el 2006 con 66 pacientes con gastritis crónica, en donde se detectó por PCR el genotipo *cagA* en el 24.2 % (n = 16) de las cepas de *H. pylori* recuperadas de las biopsias gástricas de los enfermos (García A., et al. 2006). El gen *cagA* se encuentra presente en las cepas de *H. pylori* en el porcentaje de 50 a 75% (Aguilar G., et al. 2001). En un estudio realizado en México en 400 pacientes con gastritis, se encontró que la mayoría de las cepas de *H. pylori* identificadas por PCR presentaron los genotipos *vacA* y *cagA* (Morales R., et al. 1999). Nuestro porcentaje de detección de *cagA* (82.97%) en las cepas de *H. pylori* contrasta con el reportado en Arabia, en donde la presencia de *cagA* identificado por PCR multiplex en cepas recuperadas de las heces de pacientes con gastritis fue del 60 % (n = 120) (Shahjahan K. 2004).

En este trabajo describimos que el factor de adherencia *babA2* fue identificado en el 16.5 % (n = 8) (fotografía 4, Tabla 1) de las cepas. Nuestro porcentaje es inferior al encontrado en un estudio elaborado en Alemania, Portugal, Finlandia y Suecia, en el cual se estudiaron 314 pacientes con enfermedad gástrica (92, 91, 57 y 74

respectivamente), y el porcentaje de este genotipo en las cepas de *H. pylori* fue del 35 % (n = 109) (Farzad O., et al. 2004) y también por arriba del reportado en Chile (García A. et al., 2006), en donde de los 41 (de un total de 66) cepas de *H. pylori* aisladas, solamente el 1.5 % (n = 1) de las cepas fue positivo para el factor de adherencia *babA*.. Se ha descrito que las cepas de *H. pylori* que presentan el gen *babA2* se encuentran asociadas con severas lesiones gástricas (Azevedo M., et al 2008).

CONCLUSIONES.

- Aproximadamente la mitad de las biopsias gástricas de los pacientes enfermos fueron positivas para *H. pylori*.
- Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las cepas de *H. pylori* identificadas en el estómago de los enfermos fueron elevadamente virulentas, debido a la asociación de los genes *cagA* y *babA2*
- La identificación de los marcadores de virulencia en las cepas de *H. pylori* reflejó lo agudo de la gastritis, por lo que fue necesario la administración del tratamiento médico oportuno, además del seguimiento estricto de los pacientes para evitar patologías más severas.

Bibliografía.

1. Aguilar G., Ayala G. y Fierros Z. 2001. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Publica Mex* 2001; 43:237-247.
2. Al-Moagel M. A., Evans D. G., Abdulghani M. E., Adam E., Evans D. J. J., Malaty H. M., Graham D. Y. Prevalence of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter pylori*) infection in Saudi Arabia, and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* 1990; 85: 944–948.
3. Andersen L. P., Rosenstock C. V., Bonnevie O., Jorgensen T. Socioeconomic factors in *Helicobacter pylori* infection among Danish adults. *Am. J. Public Health.* 1996; 86: 1539–1544.
4. Andreia Maria Rocha de Oliveira, Gifone Aguiar Rocha, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Maira Tonidandel Barbosa, Sérgio CaetanoSilva Prevalence of *H. pylori* infection in a population from the rural area of Aracuai, Brazil. *Rev Microbiol.* Vol 30 no1 Sao Paolo, 1999;
5. Atherton J. 1998. *H. pylori* virulence factors. *BMB*; 54: 105-20.
6. Azevedo M., Eriksson S., Mendes N., Serpa J., Figueiredo C., Resende L., Ruvo N., Haas R., Bor T., Lependu J and Davids L. 2008. Infection by *Helicobacter pylori* expressing the *babA* adhesin is influenced by the secretor phenotype. *J Pathol* 2008; 215: 308–316.

7. Banatvala N, Mayo K, Megraud F. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. J Infect Dis. 1993; 168:219–21.
8. Bernet C., Garment M., Barbeyra B., Bonnet J. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 27:2492-2496.
9. Breuer T, Sudhop T, Hoch J, Sauerbruch T, Malfertheiner P. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8: 47-52.
10. Camargo MC, Lazcano PE, Torres J, Velasco ME, Quiteio M, Correa P. 2004. Determinants of *Helicobacter pylori* seroprevalence in Mexican adolescents. *Helicobacter*; 9: 106-114.
11. Cover T, Glupczynski Y, Lage A, Burette A, Tummura M, Pérez-Pérez G, Blaser M. 1995. Serologic detection of infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. J Clin Microbiol; 33: 1496-500.
12. Cullen DJE, Collin BJ, Christiansen BJ et al. 1997. When is bacterial *Helicobacter pylori* infection acquired? Gut ; 34:1861-2.
13. Cutler AF, Haustad S, Ma C, et al. 1995. Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infections. Gastroenterology; 109:136-41.

14. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Pérez Pérez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infect Dis* 2000; 181: 1359-63.
15. Farzad O., Oleastro M., Voland P., Bore Thomas., Kertunen R., Rad R., Engstrand L., Prinz C., Gerhard M. y Zheng Q. 2004. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor *babA* with duodenal ulcer disease in four European countries. Department of Medical Biochemistry and Biophysics. 234-239pp.
16. García A., Barra R., Delgado C., Kawaguchi F., et al. 2006. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*. Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. *Rev. Med. Chile*; 134: 981-988.
17. Goh K. L. Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a multi-racial dyspeptic Malaysian population undergoing endoscopy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1997; 12: S29–S35.
18. Goodman KJ, Correa P. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet.* 2000; 355: 358–62.
19. Goodman K. J., Correa P., Aux H. J. T., Ramirez H., Delany J. P., Pepinosa O. G., Quinones M. L., Parra T. C. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes—a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 1996; 144: 290–299.

20. Goodwin CS, Worsley BW. 1993. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clin N Amer*; 22:5-19.
21. Graham D. Y., Adam E., Reddy G. T., Agarwal J. P., Agarwal R., Evans D. J., Malaty H. M., Evans D. G. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig. Dis. Sci.* 1991; 36: 1084–108.
22. Gusmão VR, Mendes EN, Queiroz DM. 2000. *vacA* and *cagA* Genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol*; 38: 2853–2857.
23. Guyer RL., Koshland DE. 1989. The molecule of the year. *Science* 246: 1543-1546.
24. Han J., et al. 2006. Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with templex technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 4157-4162.
25. Hernández F, Rivera P. 1992. A low cost method to produce a gaseous environment for the isolation of *Helicobacter pylori*. *Rev Inst Trop Med Sao Paulo*; 33:80.
26. Holcombe C, Omotara BA, Eldridge J, Jones DM. 1992. *H. pylori*, the most common bacterial infection in Africa: A random serological study. *Am J Gastroenterol*; 87: 28–30.
27. Hua Y., Zhong W., Yin H., y Dong S. 2004. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*. Shanghai Second Medical University Renji Hospital, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai, China; 5; 181-185.

28. Jones D. M., Eldridge J., Fox A. J., Sethi P., Whorwell P. J. Antibody to the gastric campylobacter-like organism ("*Campylobacter pyloridis*")—clinical correlations and distribution in the normal population. *J. Med. Microbiol.* 1986; 22: 57–62.
29. Kocher TD. et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:6196-6200.
30. Letley D, Lastovica A, Louw J, Hawkey C, Atherton J. 1999. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1. *J Clin Microbiol* ; 37: 1203-5.
31. Li C, Musich PR, Ha t, et al. 1995. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol*; 48(7):662-6.
32. Malaty H. M., Evans D. G., Evans D. J., Graham D. Y. *Helicobacter pylori* in Hispanics—comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology.* 1992; 103: 813–816
33. Marshall B. 1994. *Helicobacter pylori.* *Am J Gastroenterol* ; 89: 116-27.
34. Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K. 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol*; 14: 260-2.

35. Megraud F., Brassens Rabbe M. P., Denis F., Belbouri A., Hoa D. Q. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 1870–1873.).
36. Mitchell HM. 1999. The epidemiology of *Helicobacter pylori* *Curr Top Microbiol Immunol*; 241: 11-30.
37. Mitchell H. M., Li Y. Y., Hu P. J., Liu Q., Chen M., Du G. G., Wang Z. J., Lee A., Hazell S. L. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China—identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J. Infect. Dis.* 1992; 166: 149–153.
38. Morales R., Castillo G., González G., et al. 1999. Colonization of Mexican Patient by Multiplex *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology.* 37(9); 3001-3004.
39. Morris L. *Helicobacter pylori*. Epidemiological routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000; 22:283–97.
40. Nilsson HO, Aleljung P, Nilsson I, Tyszhiewicz T, Wadstrom T. 1996. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in human stools. *J Microbiol Meth*; 27:73-9.
41. Paabo S. 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86:1939-1943.

42. Paniagua G., Monroy E., Alcántara M., García O. y Vaca S. 2007. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis. Rev. Med. Hosp. Gen. Mex. 70 (3): 107-114.
43. Paniagua G., Monroy E. y Vaca S. 2007. PCR Manual de Identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en Material Fecal. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 75pp
44. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira NA, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MMDA, Nogueira AMMF. 1998. *cagA* positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. Int J Cancer 78: 135–139.
45. Ramos MLK, Darini E, Carales CF, Merano de CC, Aparicio-Troquez SMC, Heraldo CLL. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polimerase chain reaction in gastric biopsias: correlation with histological findings proliferation and apoptosis. Sao Paulo Med. J. 2005; 23(3): 113-118.
46. Replogle M. L., Kasumi W., Ishikawa K. B., Yang S. F., Juji T., Miki K., Kabat G. C., Parsonnet J. Increased risk of *Helicobacter pylori* associated with birth in wartime and post-war Japan. Int. J. Epidemiol. 1996; 25: 210–214.
47. Saiki RK. et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globing genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis os sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

48. Santos I, Bossio J, Davidsson L, Hernandez M, Huanca E, Camarena S, Janjetic J, Paez-Valery M, Ruiz-Alvarez V, Valencia M, Vargas-Pinto, Solano L Thomas J. *Helicobacter pylori* is not associated with anemia in Latin America: results from Argentina, Brazil, Bolivia, Cuba, Venezuela and México.
49. Scharf SJ. et al. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233:1076-1078.
50. Schild M. et al. 2007. PCR-based diagnosis of *Naegleria* spp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections, *Journal of Clinical Microbiology*. 45(2):564-567.
51. Serrano C; Diaz Ma. Luz; Valdivia A; Godoy Alex; Peña A; Rollan A, Kieberg A, Giebert E, Fierro J; Klapp G; Venegas A; Harris P. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. 2007. *Microbes and Infections*. 9; 428-434.
52. Shahjahan Kabir, 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Feces and Saliva by Polymerase Chain Reaction. Volume 9. Number 2. 23:29pp.
53. Singh UB. et al. 2006. Utility of polymerase chain reaction in diagnosis of tuberculosis from samples of bone marrow aspirate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75:960-963.

54. Smith S I; Oyedeji K S; Arigbabu A O; Cantet F; Megraud F; Ojo O O; Uwaifo A O; Otegbayo J A; Ola S O, Cocker A O. . 2004. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology* 10 (13): 1958-1960.
55. Song, Q.T., Haller, B., Schmid, R.M., Adler, G., Bode, G. (1999). *Helicobacter pylori* in dental plaque. A comparison of different PCR primers sets. *Dig. Dis. Sci.* 44:479-484.
56. Torres J, Leal-Herrera y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A Community-Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis*; 178:1089–1094.
57. Vázquez P. JA. et al. 2006. Human Immunodeficiency Virus Type 1 in seronegative infants born to VIH-1-infected mothers. *Virology Journal.* 3:52-57.
58. Wong J., David S., John J., et al. 2002. Comparison of Cytotoxin Genotypes of *Helicobacter pylori* in Stomach and Saliva. *Digestive Diseases and Sciences.* 47(8): 1850-1856).
59. Wotherspoon A, Doglioni C, Disst T, Pan L, Moschini A, De Boni M et al. 1993. Regression of primary lowgrade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*; 342: 575-7.
60. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. 1999. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*; 37: 2274–9.

61. Yu J, Leung WK, Go MYY, Cjhan MCW, To KF, NG EKW et al. 2002. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions; 51: 480-4.
62. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. 2003. *Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. J Clin Pathol; 56: 287–91.