



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA  
DE *Helicobacter pylori* EN BIOPSIAS GÁSTRICAS POR PCR  
CONVENCIONAL”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
BIÓLOGA  
P R E S E N T A

**ISIS DEYANIRA TRUJILLO GONZÁLEZ**

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

**Los Reyes Iztacala, Junio 2009.**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos, de la Clínica Universitaria para la Salud Integral (CUSI), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección y asesoría de la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras.**

---

---

## Agradecimientos

A la **M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras**; por aceptar la dirección de esta tesis y guiarme en la investigación con paciencia y dedicación, por la formación que me brindo durante la carrera no solo académicamente, pero sobre todo por dejar sus huellas personales en mí.

Al **Dr. Sergio Vaca Pacheco**; por proporcionarme la infraestructura necesaria al inicio de este proyecto e infinitamente le agradezco el haberme permitido acercarme a usted como persona, con mis dudas e inquietudes, gracias por su sensatez y su gran calidad humana.

Al **M en C. Eric Monroy Pérez**, quien con absoluta disposición estuvo presente en todas las etapas de este trabajo, le agradezco todos sus consejos, sugerencias y por enriquecer mi visión en la investigación.

A la **Biol. Susana González Almazán** y a la **Biol. Alina Uribe García** por la revisión de este trabajo.

A **Octavio García González** por regalarme algo muy grande: La duda y la curiosidad.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme una educación gratuita, incluyente y de calidad.

---

---

...que los justos avancen  
aunque estén imperfectos y heridos  
que avancen porfiados como castores  
solidarios como abejas  
aguerridos como jaguares  
y empuñen todos sus noes  
para instalar la gran afirmación  
que la muerte pierda su asquerosa y brutal puntualidad  
que cuando el corazón se salga del pecho  
pueda encontrar el camino de regreso...

M. Benedetti

---

### I. *Helicobacter pylori*

1.1 Descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i> .....	3
1.2 Características generales de <i>Helicobacter pylori</i> .....	5
1.3 El genoma de <i>Helicobacter pylori</i> .....	7
1.4 Patogénesis y factores de virulencia.....	10
1.4.1 Ureasa.....	10
1.4.2 Motilidad.....	12
1.4.3 Catalasa.....	12
1.4.4 Adhesinas.....	12
1.4.5 Citotoxina vacuolizante VacA.....	14
1.4.6 Isla de patogenicidad <i>cag</i> ( <i>cagPAI</i> ).....	16
1.4.7 Gen asociada a la citotoxina ( <i>cag</i> ).....	17
1.5 Epidemiología.....	18
1.6 Diagnostico de infección por <i>Helicobacter pylori</i> .....	21
1.6.1 Pruebas invasivas.....	21
1.6.2 Pruebas no invasivas.....	23
1.7 Patología.....	25
1.7.1 Gastritis asociada a <i>Helicobacter pylori</i> .....	25
1.7.2 Úlcera péptica asociada a <i>Helicobacter pylori</i> .....	26
1.7.3 Linfoma gástrico tipo MALT.....	26
1.7.4 Cáncer gástrico asociado a <i>Helicobacter pylori</i> .....	27

---

---

---

---

1.8 Tratamiento.....	29
II. Antecedentes.....	31
III. Objetivos.....	33
IV. Metodología.....	34
V. Resultados.....	39
VI. Discusión.....	48
VII. Conclusiones.....	56
Bibliografía.....	57

---

---

---

## RESUMEN

Se ha estimado que el 50% de la población mundial se encuentra infectada por *Helicobacter pylori*. Esta bacteria ocasiona gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico entre otras, siendo los factores de virulencia *vacA* y *cagA*, determinantes en el desarrollo de estas patologías. El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de las variantes alélicas s1, s2, m1 y m2 del gen *vacA* y el gen *cagA*, en biopsias provenientes de pacientes mexicanos con gastritis crónica. Se analizaron por cultivo 81 muestras gástricas de los pacientes enfermos. *Helicobacter pylori* fue detectado por PCR anidado y los alelos de *vacA* y el gen *cagA* fueron identificados por PCR multiplex. Los resultados obtenidos mostraron que el 40.7% (n=33) de los pacientes resultó positivo a *Helicobacter pylori*, de los cuales el genotipo *vacA* se detectó en el 100% de las cepas (n = 33) y el genotipo *cagA* en el 18.74% (n = 6). La frecuencia de asociación más elevada de los alelos de *vacA* con *cagA* fue para *vacA* s1/*vacA* m1 con el 54.5% (n =18), seguido de *vacA*s1/*vacA* m2 con el 15.5% (n = 5), *vacA*s2/*vacA* m1/ *cagA* con el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA* m2 con el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA*m1 con el 6.0% (n = 2), *vacA* s1/*vacA* m1/*cagA* con el 3.0% (n = 1) y *vacA* s2/ *vacA* m2/*cagA* con el 3.0% (n = 1). El 18.8% de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes enfermos pertenecieron al tipo 1 (*vacA/cagA*<sup>+</sup>) y el 81% al tipo 2 (*vacA/cagA*<sup>-</sup>). La elevada frecuencia y asociación de los genotipos *vacA* (s1,s2,m1 y m2) y *cagA* identificados en las cepas de *Helicobacter pylori*, evidenció la virulencia y lo agudo de las infecciones por este microorganismo, por lo que fue necesario iniciar el tratamiento médico correspondiente, sobre todo en pacientes con riesgo de desarrollar cáncer gástrico

---



---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. *Helicobacter pylori*.

#### 1.1 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<sup>1</sup>. Sin embargo fue hasta 1979 cuando Robert Warren observó 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 Marshall se une a la investigación de Warren y fue en el siguiente año 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<sup>2</sup> (Figura 1).

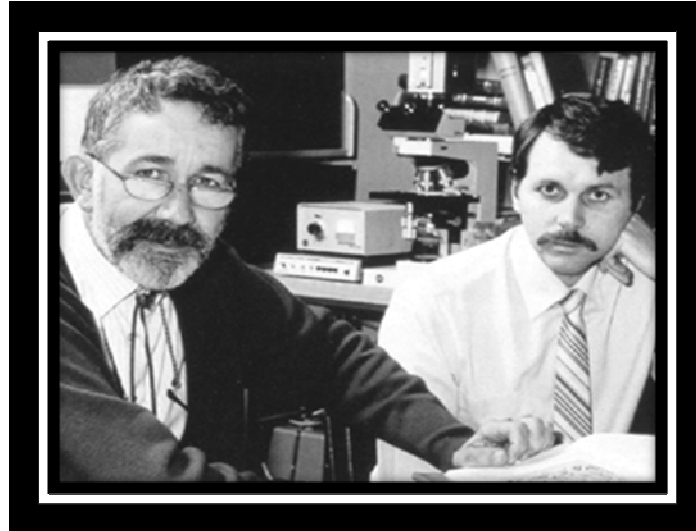


Figura 1. Warren (izquierda) y Marshall (derecha) en su laboratorio de Perth Australia.

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 4-6 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 llevó a la proposición del nuevo género *Helicobacter*.

---

## 1.2 Características generales de *H. pylori*

*H. pylori* es un bacilo Gramnegativo, en forma de S o espiral, mide 0.3-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5-5.0  $\mu\text{m}$  de largo, es un organismo microaerófilico ( $\text{O}_2$  5%,  $\text{CO}_2$  10% y  $\text{N}_2$  85%), lo que lo ubica como un organismo menos tolerante al oxígeno que la mayoría de las especies de *Campylobacter*. Móvil debido a la presencia de 4-6 flagelos en un polo, esta característica que aumenta su patogenicidad (Figura 2). *H. pylori* puede crecer en distintos medios sólidos que estén suplementados con suero y sangre de caballo. La temperatura óptima para su cultivo es de 30 a 37 °C.



Figura 2. *Helicobacter pylori*

---

Las colonias de *H. pylori* son pequeñas (2 a 5 mm), el color va de traslucido a amarillento (Figura 3), en cultivos frescos la bacteria es pleomorfica pero la mayoría tiene formas definidas en “U”, mientras que en cultivos con más de 12 días se verán formas cocoides difíciles de aislar e identificar.<sup>3</sup>

*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<sup>4</sup>, ambas enzimas son fundamentales para su identificación.

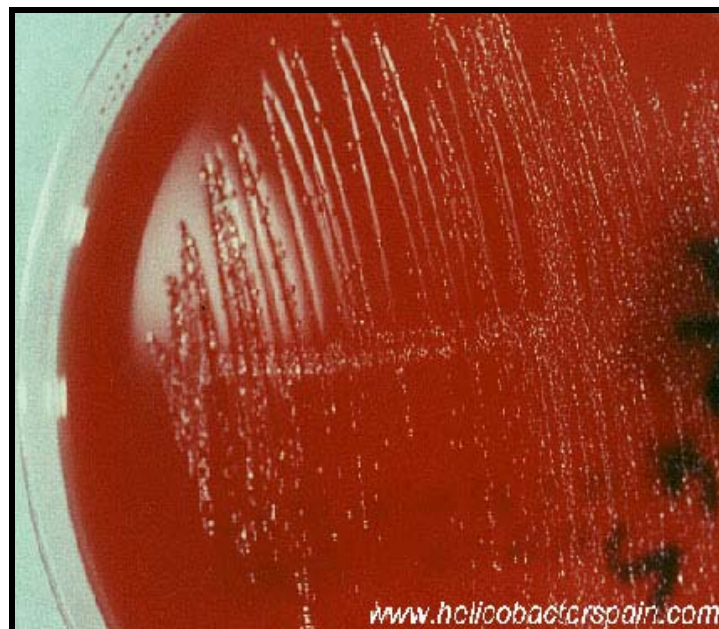


Figura 3. *Helicobacter pylori*, las colonias presentan aspecto brillante y transparente.

---

### 1.3. El genoma de *H. pylori*

El tamaño del genoma de *H. pylori* es de 1,608 a 1,727 Kb dependiendo de las características de cada cepa, tiene un contenido G+C de 35-40%. Actualmente existen un total de tres genomas secuenciados de *H. pylori*, el genoma de la cepa 26695 que incluye 1,587 genes fue aislada en el Reino Unido en 1987, el genoma de la cepa J99 que incluye solo 1,491 genes<sup>5,6</sup> aislada en Estados Unidos en 1994 y la cepa HPAG1 aislada en Suecia en 2006 con un genoma 1,596,366 pb. Se han reportado 43 genes específicos de esta cepa<sup>7</sup> (Figura 4). A pesar de que los aislados de *H. pylori* presentan secuencias genómicas conservadas existe un rango de variabilidad genética que incluye cambios en la secuencia de nucleótidos y variabilidad en el orden de los genes.<sup>6</sup> Esta alteración ha sido atribuida a reacomodos genéticos rápidos dentro de la bacteria debido a la recombinación entre las mismas cepas de *H. pylori* que se encuentran colonizando el estómago del huésped. Otro factor relevante son las deleciones del genoma dadas las secuencias repetidas que permiten los rearrreglos<sup>8,9</sup>. Una de las características más relevantes es la presencia de transposones denominados IS605 e IS606, la primera ha sido asociada a genes de virulencia y es justamente en esta sección

---

en donde se encuentran diferencias entre los 2 primeros genomas secuenciados (Figura.5).

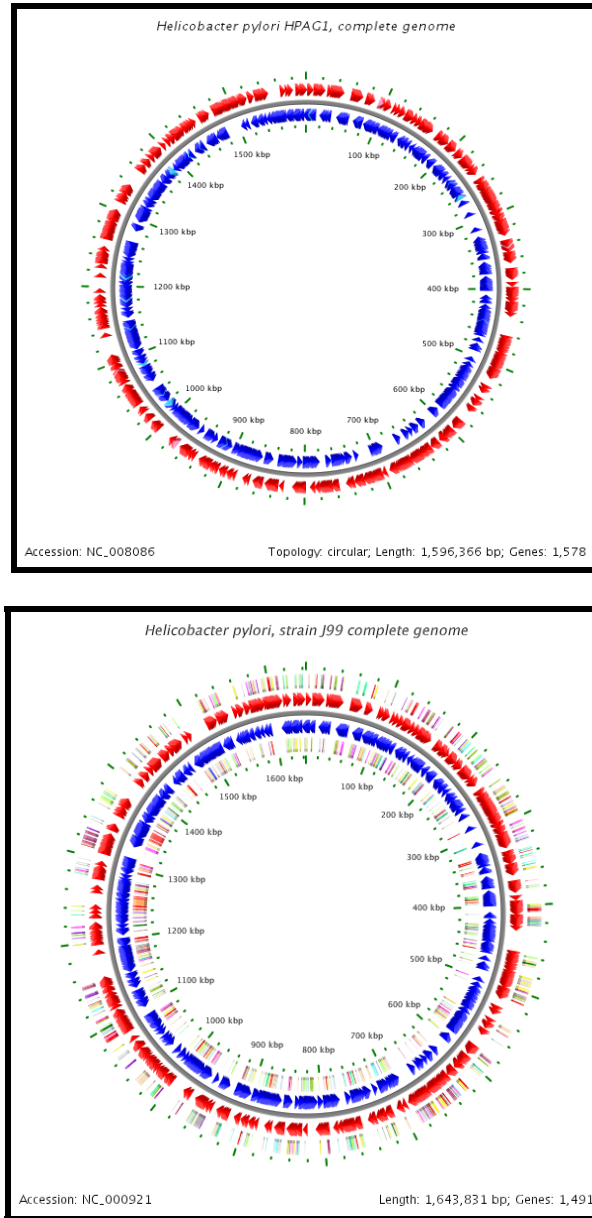


Figura 4. Genoma de **HPAG1** aislado de un paciente con gastritis atrófica crónica (*arriba*), y genoma **J99** (*abajo*).

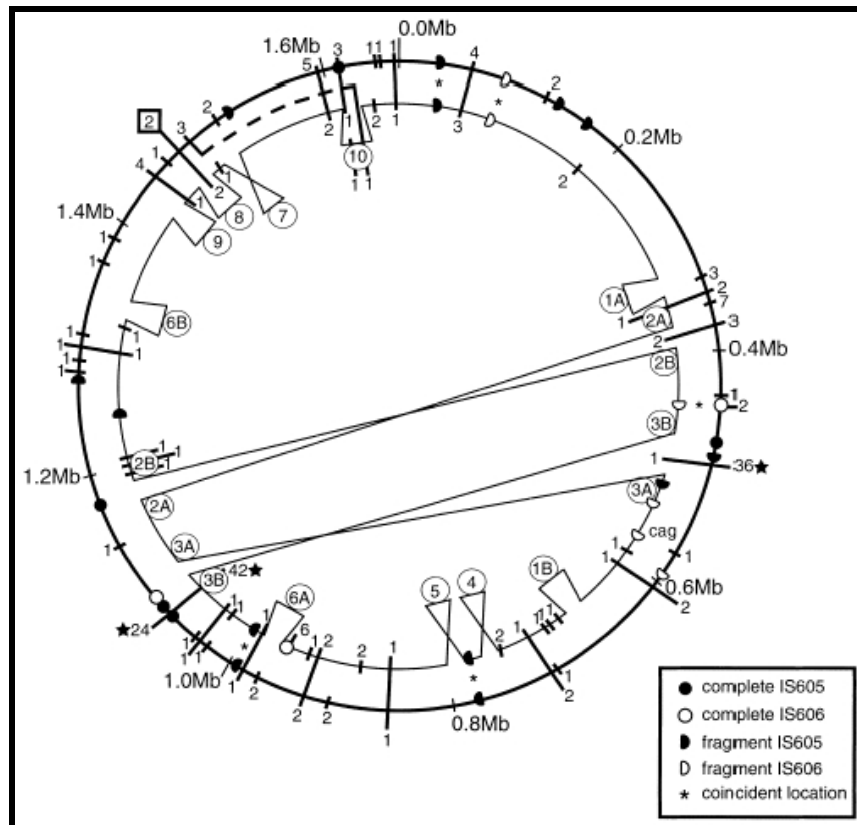


Figura 5. Elementos de inserción en los IS605 e IS606, identificados en las cepas de *H. pylori* **26695** y **J99**. La cepa **J99** no contiene la copia completa del elemento IS605 mientras que la cepa **26695** contiene 5 copias completas. Ambas cepas contienen copias completas del elemento IS606.

---

## 1.4 Patogénesis y Factores de virulencia

La capacidad de *H. pylori* para causar enfermedad se encuentra asociada a la expresión de factores de virulencia que le permiten, la colonización del estómago de su hospedero, daño a los tejidos, pero sobre todo la sobrevivencia de la bacteria. La ureasa, el flagelo, las adhesinas, son algunos de estos factores esenciales<sup>10, 11</sup>.

### 1.4.1 Ureasa

La ureasa presenta un papel central en la colonización y persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica ya que crea un microambiente alcalino en el estómago, además esta enzima es utilizada para la identificación y seguimiento durante el tratamiento contra esta bacteria.<sup>10</sup> La enzima es codificada por un grupo de siete genes denominados desde *ureA* a *ureG*, los dos primeros genes *ureA* y *ureB*, que se encuentran presentes en todas las cepas de *H. pylori*, codifican para un par de subunidades de 26.5 y 60.3 KDa respectivamente (Figura 6), el sitio activo de esta enzima se encuentra en la subunidad *ureB* y requiere de níquel para su activación, el resto de los genes son considerados genes accesorios<sup>12,13</sup>.



---

La ureasa también participa en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección, activando la producción de citocinas proinflamatorias<sup>14</sup>. La mayoría de las personas infectadas con *H. pylori* tienen una respuesta de anticuerpos contra la ureasa de la bacteria. Un mutante negativo a ureasa aislado de una cepa de *H. pylori* I solo presentó en 0.4% la actividad de la enzima, no colonizó ninguno de los ratones a los que se administró, lo cual corrobora la importancia de este factor para la colonización y sobrevivencia de la bacteria<sup>10</sup>

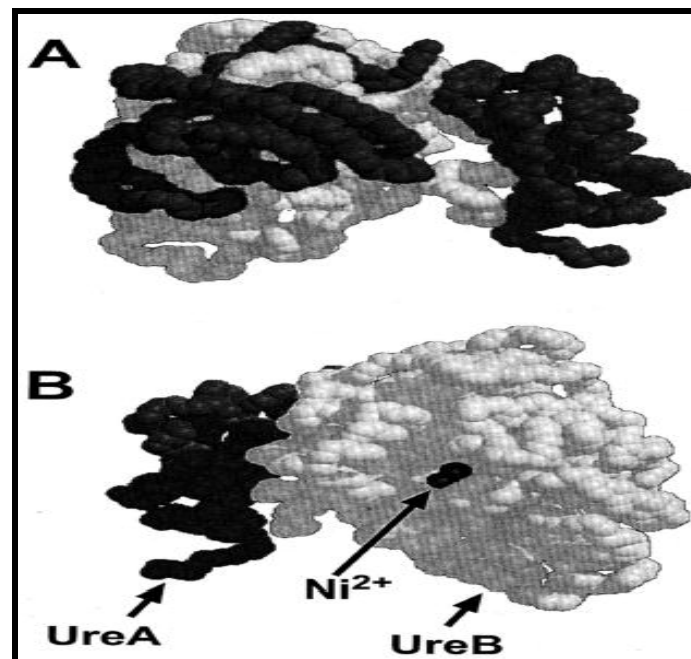


Fig. 6. La estructura de la ureasa en *H. pylori* ha sido dilucidada con la cristalización de esta misma enzima proveniente de *Klebsiella aerogenes* y se ha propuesto que presentan una estructura muy similar debido a la homología entre las bacterias.

---

### 1.4.2 Motilidad

Esta característica se la confieren los flagelos, estos le permiten desplazarse a través de la mucosa gástrica, esta movilidad también le permite no ser expulsado rápidamente por el hospedero.

### 1.4.3 Catalasa

Esta enzima es producida por todas las cepas de *H. pylori*, su masa molecular aproximada es de 64 KDa, su función es degradar en oxígeno y agua al peróxido de hidrógeno que se produce durante la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares (PMN)<sup>15</sup>.

### 1.4.4 Adhesinas

Son estructuras lipoproteínicas altamente específicas que permiten a la bacteria adherirse a la superficie de la mucosa gástrica, en el genoma de *H. pylori* se identificó a un grupo de 32 proteínas de membrana externa, (OMP, outer membrane proteins), de las cuales se identificaron como adhesinas a BabA (blood group antigen binding adhesin), SabA (sialic acid binding adhesin), AlpA y AlpB<sup>16,17,18</sup>.

---

**BabA.** Participa en la adhesión de *H. pylori* a los antígenos de Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) de grupos sanguíneos humanos, existen dos copias del gen *babA*, la diferencia entre estos es el inicio de la región codificadora, la región media de BabA es altamente variable, y puede ser la razón de la variabilidad que tienen las cepas de *H. pylori* para unirse a los antígenos de Le<sup>b</sup> *in vitro*. Se ha especulado que la expresión bacteriana de Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup> los cuales son antígenos idénticos a los de la mucosa gástrica pueden proporcionar camuflaje a *H. pylori* en este nicho, particularmente en las primeras fases de la infección<sup>19</sup>.

**SabA.** La expresión de este gen está regulada por la presencia de dinucleótidos repetidos de CT en la región 5' del gen *sabA*, dependiendo del número de repetidos la proteína puede o no expresarse. Esta proteína participa en la unión de *H. pylori* al ácido salicílico de los antígenos de Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>.<sup>16</sup>

**AlpA y AlpB.** Los genes que codifican para estas adhesinas forman parte de un operón denominado "alpAB", las cepas que son mutantes en estos genes presentan incapacidad para adherirse *in vitro*<sup>17</sup>.

---

### 1.4.5 Citotoxina vacuolizante VacA

La citotoxina vacuolizante (VacA), es uno de los factores de virulencia más ampliamente descrito esta se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori* y es codificada por el gen *vacA*. El gen tiene dos tipos de alelos, para un péptido señal “s” (s1 y s2) que está asociado con inflamación y otro para la región media “m” (m1 y m2) que es responsable del daño al epitelio gástrico. Las cepas s1/m1 producen más citotoxinas y están asociadas a mayor inflamación mientras que las cepas s2/m2 no inducen vacuolización. El 60% de las cepas tiene el genotipo s1/m1 por lo que son capaces de expresar la citotoxina activa e inducir la formación de vacuolas en células HeLa y AGS<sup>20</sup>.

La síntesis de la proteína da como resultado una protoxina de 140 KDa de estructura oligomérica (Figura 7) que no presenta actividad, al disociarse se convierte en una toxina de 87 KDa, el péptido señal y el dominio autotransportador, el péptido conduce a VacA hacia la membrana citoplasmática y el autotransportador la inserta en la membrana externa<sup>20</sup>

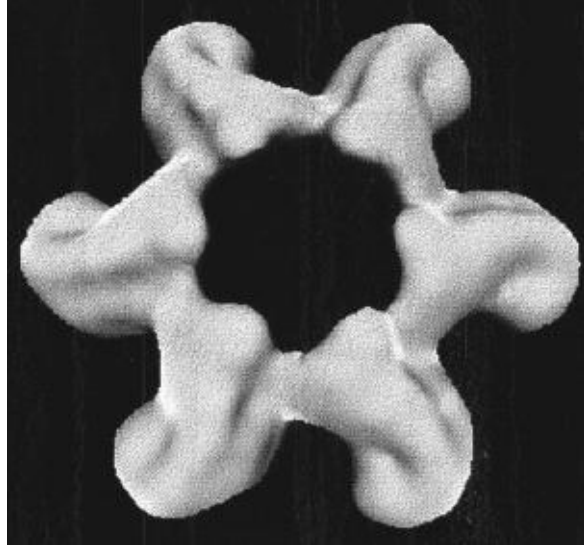


Figura 7. Estructura oligomérica de VacA. Esta consiste en 6 o 7 “petalos” y un anillo central prominente. Cuando VacA se expone a pH ácidos o alcalinos se da la disociación en componentes monomericos.

Además de la vacuolización VacA es capaz de desorganizar el esqueleto de las células epiteliales gástricas, inhibe la migración y la proliferación celular impidiendo el proceso de regeneración del epitelio gástrico e induce apoptosis en células epiteliales mediante la liberación del citocromo C, forma canales selectivos al paso de iones e inmunosuprime la respuesta adaptativa del huésped inhibiendo la proliferación de linfocitos T<sup>21</sup>.

De acuerdo al genotipo de *vacA* las cepas pueden agruparse de acuerdo a su origen geográfico, un estudio en Houston Texas mostró que *vacA* s1 fue predominante en México, España, Portugal, Centro y

---

Sudamérica mientras que el genotipo *vacA* s1b/m1 es el más común en la población afroamericana de Houston coincidiendo con previos estudios que muestran el mismo genoma para sujetos de la raza negra y en la mezcla de razas en Sudáfrica<sup>22</sup>.

#### **1.4.6 Isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*)**

La isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), es una región de 40 kb, adquirida de manera horizontal e insertada en el gen de la glutamato racemasa. Esta isla contiene alrededor de 27 a 31 genes que generan un sistema de secreción tipo IV el cual consiste en translocar proteínas de virulencia a las células del hospedero<sup>23</sup>, otros genes relevantes son *cag E*, *cag G*, *cag H*, *cag I*, *cag L* y *cag M* los cuales liberan citocinas *in vitro*. En algunas cepas esta isla se encuentra como una unidad con dos secuencias de inserción IS605 e IS606, mientras que en otras se encuentra separada en dos partes, *cag I* y *cag II*, por el elemento de inserción IS605 (Figura 5).

*cagPAI* está presente entre el 60% y el 80% de cepas estudiadas en países occidentales y asiáticos respectivamente, su importancia radica en que diversos estudios han sugerido que la presencia de *cagPAI* completa con el desarrollo de úlcera y cáncer gástrico.<sup>24</sup>

---

### 1.4.7 Gen asociado a la citotoxina A (*cagA*)

El gen *cagA* es uno de los 27 genes que se encuentran en *cagPAI*, se localiza en el extremo 3' de la isla y es uno de los genes más grandes, su tamaño varía de 3,500-3,750 pb, la estructura del gen *cagA* tiene una región sumamente conservada en el extremo 5' y la región variable en el extremo 3', lo cual explica la variación del peso molecular de la proteína CagA (120-128 kDa), esto debido a la presencia de secuencias repetidas de aminoácidos Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina, conocidos como motivos EPIYA presentes en la región variable<sup>25</sup>. Cuando *H. pylori* se adhiere a las células epiteliales gástricas la proteína CagA es inyectada mediante el sistema de secreción tipo IV y traslocada al citosol donde es fosforilada por células del hospedero por medio de cinasas c-SRC, al interior se induce la señalización para la expresión de una citocina moduladora de la inducción y activación de neutrófilos en la mucosa infectada y en la señalización de factores de crecimiento<sup>26</sup>. Biopsias de pacientes con daños gástricos severos incluyendo gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico presentan el gen *cagA* en el 90% de los casos, estableciéndose una correlación directa de la presencia del gen con la patología<sup>27,28</sup>. Estudios serológicos han mostrado la distribución

---

de este gen en pacientes en todo el mundo, por ejemplo en Estados Unidos y Holanda es del 80% y el 56%, respectivamente, en pacientes con úlcera, mientras que en Japón y en China la seropositividad en pacientes con cáncer gástrico el porcentaje es del 90-94%<sup>29</sup>.

Diversos estudios muestran una diferencia durante el desarrollo de la enfermedad que se produce cuando se trata de una cepa *cagA* positiva y su asociación con *vacA*, ya que ambos factores de virulencia aumentan el riesgo de que se presente gastritis severa, metaplasia y cáncer gástrico en comparación con los pacientes que presentan una cepa *cagA* negativa, sin embargo la ausencia de *cagA* no afecta la patogenicidad de *vacA*<sup>30</sup>.

## 1.5 Epidemiología

La prevalencia de la infección de *H. pylori* a nivel mundial es de más del 50% de la población total y está relacionada directamente con el estatus socioeconómico, la limpieza, el sistema de salud y hacinamiento, siendo las poblaciones de los países subdesarrolladas las más afectadas (Figura 8)<sup>31</sup>.

No se ha encontrado diferencia de la prevalencia por *H. pylori* en relación al sexo, sin embargo si se ha establecido que la infección



---

ocurre en la infancia, durante los primeros 6 meses de edad<sup>32</sup>, en niños menores de 10 años procedentes de países en vías de desarrollo es del 45-80% y del 1-10% en países desarrollados, en México el 50% de niños de esta misma edad se encuentran infectados. En adultos los porcentajes de infección de países en vías de desarrollo es del 70-90% y del 25-50% en países desarrollados<sup>33,34</sup>.

En un estudio seroepidemiológico realizado en México en 1998 se buscaron anticuerpos IgG específicos contra antígenos totales de *H. pylori* por el método de ELISA, el total de muestras analizadas fue de 11,600 sueros procedentes de un banco de la Secretaría de Salud, las muestras eran de todos los estados de la República Mexicana y las edades fluctuaban de los 0-98 años. En niños menores a 1 año de edad el 20% de los sueros resultaron positivos, alcanzando un 80% de infección en los sueros de mayores de 25 años<sup>35</sup>.

Diversos estudios han propuesto que la adquisición de *H. pylori* se da por una vía común en una fuente ambiental, particularmente el agua y los animales han sido implicados como una fuente potencial de infección. Una vez adquirida la bacteria las vías de transmisión de esta pueden variar, sin embargo se sabe que es de persona a

---

---

persona, particularmente de madres a sus hijos ya que se ha reportado que el riesgo de que un niño se encuentre infectado aumenta 8 veces si la madre posee la bacteria <sup>36</sup>.

Con el desarrollo y la aplicación de nuevas técnicas como PCR (Polimerase chain reaction), se ha detectado la bacteria en heces, saliva, jugo gástrico y placa dental en pacientes positivos, sugiriendo que la ruta de transmisión puede ser oral-oral u oral-fecal<sup>37</sup>.

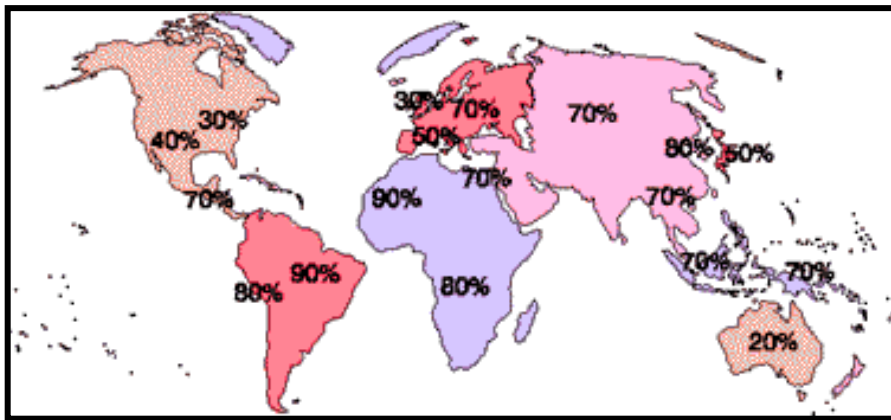


Figura 8. Distribución de *Helicobacter pylori* a nivel mundial. Modificada de *Helicobacter foundation*.

---

## 1.6 Diagnóstico de infección

Para la diagnosis de infección por *H. pylori* diversos métodos con distintas características han sido desarrollados, se han dividido en invasivos y no invasivos. Las pruebas invasivas requieren de la realización de endoscopia para la obtención de biopsias gástricas mientras que las no invasivas son determinaciones indirectas que no requieren de endoscopia.

### 1.6.1 Pruebas invasivas

**Cultivo.** El cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas permite diagnosticar la infección con una especificidad variable, sin embargo las ventajas de este método radican en las pruebas de sensibilidad a antibióticos y la obtención de cepas para su caracterización genética. Para óptimos resultados el procedimiento a seguir comienza con la inoculación en menos de dos horas en medio de transporte Stuart, caldo de Brucella o solución salina estéril, se homogeneiza la biopsia y se siembra en medio de cultivo con sangre de caballo con o sin antibióticos, en atmósfera microaerófila a 37 °C. La identificación de la bacteria se hace de acuerdo a la morfología colonial (Figura 3),

---

tinción de Gram y pruebas bioquímicas a ureasa, catalasa y oxidasa<sup>3,4,10</sup>.

**Histología.** Las muestras obtenidas por endoscopia se tiñen con eosina y hematoxilina, esta prueba va a proveer información sobre la presencia y severidad de la infección de *H. pylori*, sin embargo la posibilidad de reportar un falso negativo existe, esto depende del sitio anatómico donde se tomó la biopsia ya que la bacteria no se encuentra distribuida uniformemente, en el antro central y antro distal es donde se encuentra la mayor densidad mientras que en la región del cuerpo existe la menor colonización<sup>38</sup>

**Prueba rápida de ureasa.** Este es el método más rápido para determinar la presencia de *H. pylori* ya que la actividad de la ureasa se puede medir directamente en las muestras clínicas, esta enzima hidroliza la urea en amonio y CO<sub>2</sub>, lo que aumenta el pH, virando el indicador del reactivo (Figura 9). Es una prueba barata y fácil sin embargo cuando la detección se realiza directamente en el tejido gástrico en un periodo mayor a 2 horas la sensibilidad disminuye hasta un 70%<sup>39</sup>.

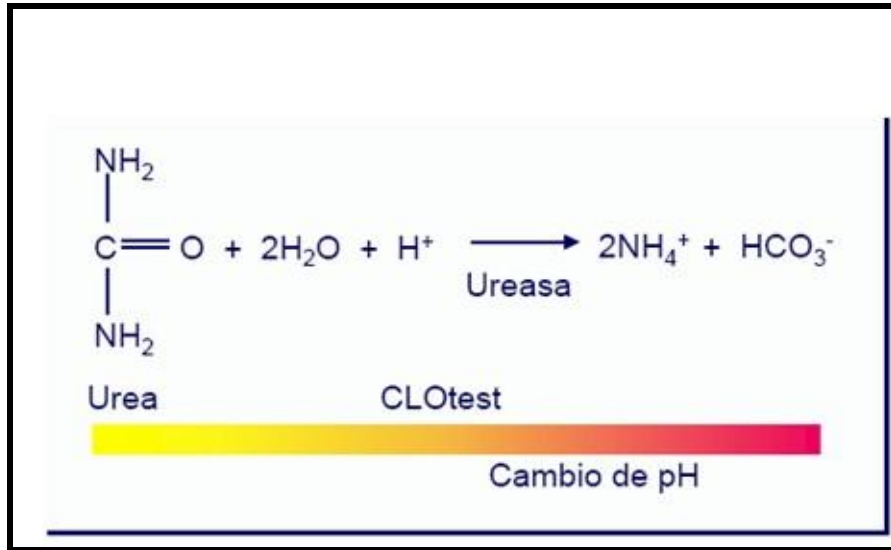


Figura 9. Reacción de la ureasa que permite detectar infección de *H. pylori* por un cambio de pH.

### 1.6.2 Pruebas no invasivas

**Prueba de aliento de la ureasa.** Esta es una prueba *in vivo* que requiere de la recolección de una muestra de aliento antes y después de ingerir urea marcada con  $\text{C}^{13}$  ó  $\text{C}^{14}$ , si hay infección la ureasa producida por *H. pylori* se exhala con el marcador permitiendo la contabilización por medio de un contador de centelleo o con un espectrómetro especial, el fundamento es el mismo de la prueba rápida de ureasa, la sensibilidad es alta, sin embargo es muy importante que la muestra se tome a los 30 min. de haber ingerido el

---

marcador, ya que de excederse el tiempo la prueba pierde sensibilidad.

**Serología.** La prueba detecta anticuerpos IgG contra antígenos de *H. pylori* por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), la sensibilidad y especificidad es alta pero depende directamente de la edad y el estado inmunológico del paciente, sobre todo en individuos inmunocomprometidos que no desarrollan respuesta efectiva ante la infección.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Esta técnica permite la identificación directa de los genes como *vacA*, *cagA* y *ureA*, se trata de una prueba sensible y sumamente específica, ya que los ácidos nucleicos son estables. Las ventajas de esta prueba además de su especificidad es que permite brindar al paciente un diagnóstico certero y con mayor especificidad que lo realizada con los anticuerpos. Por lo general se realiza en estudios de investigación ya que requiere de equipo sofisticado.

---

## 1.7 Patología

Desde su descubrimiento hasta ahora, existe suficiente evidencia de que *H. pylori* es la causa del 90% de las úlceras duodenales y del 80% de las úlceras gástricas<sup>40</sup>. Como ya se mencionó anteriormente, la adquisición de *H. pylori* se da en la niñez, a esta edad los pacientes suelen ser asintomáticos y en casos raros puede provocar vomito y/o dolor abdominal. Sin embargo la adquisición de la bacteria puede inducir el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica, adenocarcinoma ó linfoma gástrico. Todas las patologías tienen como factor fundamental las características del hospedero y las características genéticas de la bacteria.

### 1.7.1 Gastritis asociada a *H. pylori*

Esta bacteria es la causa principal de desarrollo de gastritis crónica, la gastritis es una inflamación severa de la mucosa gástrica, esta inflamación puede originar lesiones precancerosas. La gastritis crónica superficial puede llevar a gastritis atrófica en la cual se puede presentar metaplasia intestinal, lo cual es un factor de riesgo para presentar cáncer gástrico del tipo intestinal mientras que la gastritis no atrófica ha sido relacionada con cáncer gástrico del tipo difuso<sup>41</sup>.

---

### **1.7.2 Úlcera péptica asociada a infección por *H. pylori***

La úlcera péptica se caracteriza por la pérdida de mucus en el tracto digestivo en las zonas que han estado expuestas a ácido clorhídrico y pepsina, se ha considerado que la úlcera es el resultado de un desbalance entre factores agresivos de la mucosa (secreción de ácido y de moco), la regeneración epitelial y la vascularización<sup>42</sup>.

La relación entre *H. pylori* y la úlcera péptica se basa primordialmente por estudios epidemiológicos que relacionan la presencia de cepas *cagA* + y el genotipo *vacA* s1/m1 y en segundo lugar por la disminución de las molestias y patología después del tratamiento contra *H. pylori*<sup>41</sup>.

### **1.7.3 Linfoma gástrico tipo MALT**

Diversos estudios epidemiológicos han observado una significativa prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes afectados con linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), el proceso comienza con la colonización e inflamación de la mucosa gástrica por la bacteria, la inflamación aguda evoluciona a una inflamación crónica con aumento de linfocitos que emigran al territorio gástrico, en el curso de la gastritis crónica pueden aparecer folículos linfoide y agregados



---

linfáticos en la base de la mucosa gástrica, lo que constituye el llamado tejido MALT. Esta neoplasia produce escasas manifestaciones clínicas en sus estadios iniciales, sin embargo con el tiempo puede provocar dolor epigástrico, náuseas y vómitos. Los tumores avanzados producen un cuadro similar al de carcinoma gástrico<sup>43,44</sup>.

#### **1.7.4 Cáncer gástrico asociado a *H. pylori***

*H. pylori* ha sido considerado como carcinógeno Tipo 1, pues está claramente relacionado con la inducción de cáncer gástrico primordialmente de tipo intestinal. Se han propuesto diversos mecanismos carcinogénicos relacionados con la infección por *H. pylori* que actúan sobre la mucosa gástrica tales como incremento en la proliferación de células PMN y en el metabolismo oxidativo de estas células que produce radicales libres, producción de nitritos, nitratos y nitrosaminas y disminución en la cantidad de antioxidantes en la mucosa gástrica.<sup>41,45</sup>

<b><u>Enfermedades asociadas a la infección de <i>Helicobacter pylori</i></u></b>	
<b>a) Asociaciones admitidas</b>	
Úlcera gástrica	
Úlcera duodenal	
Úlcera péptica de otra localización	
Linfoma gástrico tipo MALT	
Cáncer gástrico	
<b>b) Asociaciones discutidas</b>	
1) Digestivas:	2) Extradigestivas
Dispepsia no ulcerosa	
Enfermedad de Menetrick (cardiopatía, migraña)	Vasculares
Pólipos hiperplásticos gástricos dermatológicas	Enfermedades
Pólipos ademomatosos de colon (cefalea)	Neurológicas
Encefalopatía hepática (tiroiditis)	Autoinmunes
	Anemia crónica

Tabla.1 Patologías asociadas a *H. pylori* aceptadas y discutidas

---

## 1.8 Tratamiento

Existen diversos tratamientos para erradicar la infección por *H. pylori*, sin embargo es necesario conocer la sensibilidad a antibióticos *in vitro* para determinar si existe resistencia a tratamiento, lo que pudiera provocar que el tratamiento no fuera efectivo.

Los antibióticos utilizados normalmente son betaláctamidos y macrólidos (amoxicilina, claritromicina, roxitromizina) y nitroimidazoles (metronidazol y tinidazol)<sup>46,47</sup> (Figura 10).

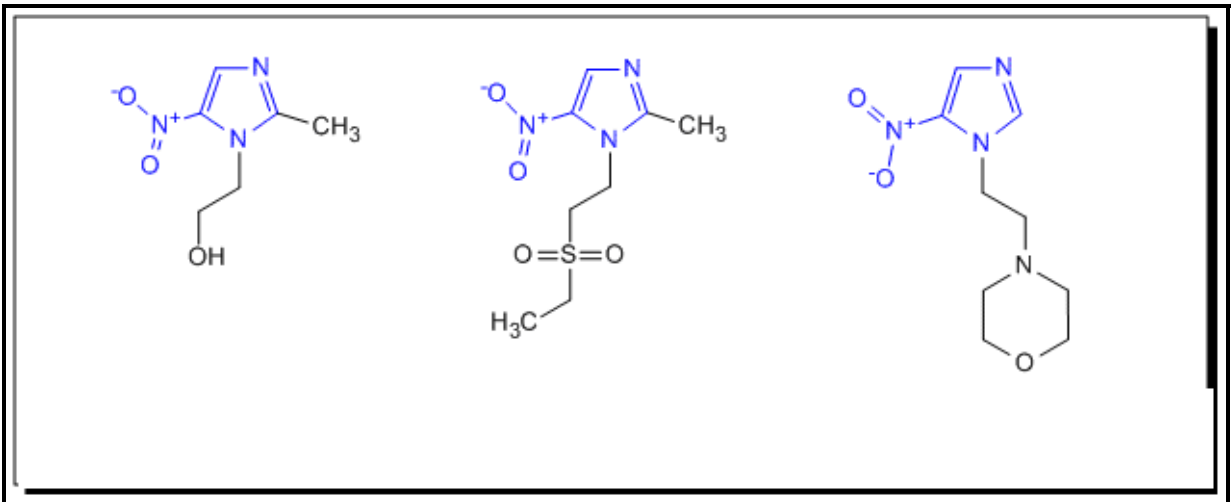


Figura.10 Estructura de nitroimidazoles de izquierda a derecha. Metronidazol, tinidazol y nimorazol

---

También existen otro tipo de tratamientos no antibióticos que incluyen las sales de bismuto, inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, ranitidina, pantoprazol) y antagonistas a los receptores H<sub>2</sub>. Recientes estudios han mostrado que el tratamiento más efectivo para erradicar la infección por *H. pylori* es una combinación de antibióticos y no antibióticos<sup>47</sup>.

---

## II. Antecedentes

-Smith *et al.*, en 2004 compararon tres métodos de PCR para detección de *H. pylori* y de los genes *vacA* y *cagA* en muestras de biopsias gástricas<sup>48</sup>.

- En el año del 2003 Chattopadhyay *et al.*, desarrollaron y evaluaron un método de PCR multiplex para identificar las variantes alélicas de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori* presente en biopsias gástricas de pacientes infectados<sup>49</sup>.

- Beil *et al.*, en el 2000 describieron un posible mecanismo de responsable del incremento de patogenicidad y riesgo de ulcera péptica se podía deber a la presencia del gen *cagA*<sup>50</sup>.

-Lee-Jan Van Doorn en el 2001 realizó un estudio en donde se detectaron los genes de virulencia *cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA*, y *opiA* de *H. pylori*<sup>51</sup>.

---

-Atherton *et al.*, en 1997 realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* demostrando que la citotoxina vacuolizante (VacA) juega un papel primordial en la patogénesis produciendo vacuolización citoplasmica en líneas celulares de mamíferos y en células de la mucosa gástrica en humanos<sup>52</sup>.

-Morales-Espinoza en 1999 realizaron un estudio a 26 pacientes Mexicanos con infección de *H. pylori*, los pacientes presentaban distintas patologías gástricas, se caracterizaron un promedio de 10 colonias individuales aisladas de antro y cuerpo y se reportó por primera vez que los pacientes presentaron infección múltiple de *H. pylori* con distintos genotipos de *vacA*; esto independientemente de la patología y del lugar de aislamiento<sup>53</sup>.

---

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Determinar la distribución de los genes de virulencia en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas del estómago de pacientes con gastritis crónica

#### Objetivos particulares

- Identificación de las variantes alélicas s1, s2, m1 y m2 del gen *vacA* y del gen *cagA* de *Helicobacter pylori* en las biopsias gástricas de los pacientes.
- Caracterización de las cepas de *H. pylori* Tipo 1 y Tipo 2 obtenidas de los cultivos gástricos de los pacientes enfermos.
- Correlación de las cepas de *H. pylori* Tipo 1 y Tipo 2 con la edad y sexo de los pacientes con gastritis crónica.

---

## IV.METODOLOGÍA

### **Pacientes**

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron 81 pacientes de un Hospital de tercer nivel con enfermedad ácido péptica. A cada paciente en estado de ayuno se le realizó una endoscopia digestiva alta, la muestra se colocó en un tubo eppendorf con 1 ml de solución Tris-base y fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI Iztacala, FESI., en donde se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

### **Cultivo**

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% N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>) por cuatro días. Las colonias se identificaron mediante test de ureasa, catalasa y tinción de Gram.



---

## **Extracción de DNA**

A partir de los cultivos se tomó una muestra bajo condiciones estériles y se introdujeron en tubos ependorf de 1.5 ml con 100 µl de agua destilada, se colocaron en vortex por 5 minutos y se llevaron a ebullición por 15 minutos. Al término las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue separado en otro tubo y se mantuvo a -20° C hasta su utilización.

## **Detección de *H. pylori* por PCR anidado.**

La detección de *H. pylori* por PCR anidado fue realizado por el método previamente descrito por Li y cols<sup>38</sup>. 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; 1µl 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

---

H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 10 µl de DNA de templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos de 94° C por 45 segundos, 59° C por 45 segundos y 72° C por 30 segundos . Finalmente una extensión 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 fue utilizado como DNA templado y únicamente 25 ciclos de amplificación fueron utilizados.

Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizó el DNA extraído de *H. pylori* ATCC 43629. Como control negativo se utilizó

---

---

una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el DNA templado.

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

Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers VA1-F y VA1-R (25 pmol, cuadro I), VAG-F y VAG-R (25 pmol) y *cag5c*-F y *cag3c*-R (10 pmol), respectivamente<sup>37</sup>. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1µl de cada primer, 16 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3 µl de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión de 72°C por 10 minutos.

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

Después de la amplificación del DNA, 10 µl de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los

---

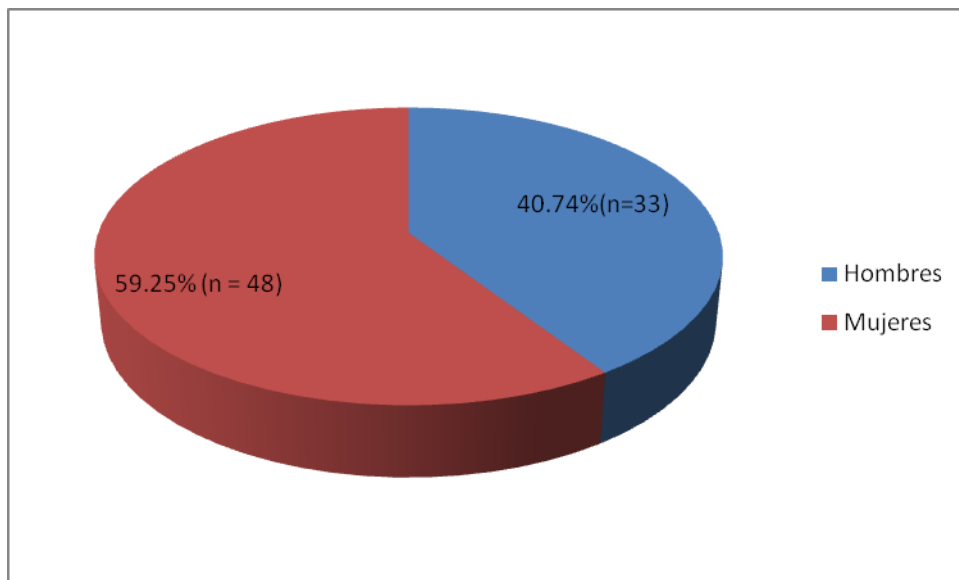
geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de foto documentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

---

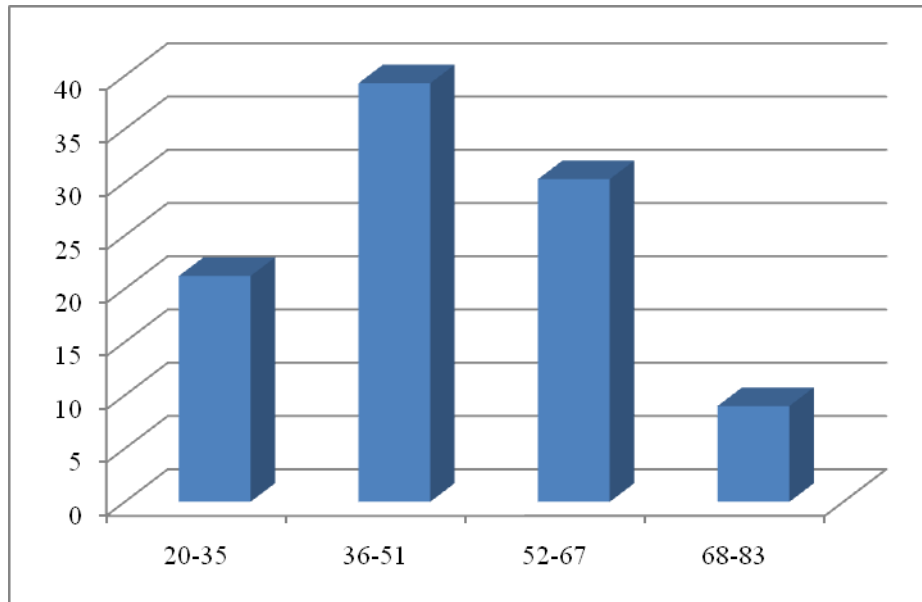
## V. RESULTADOS

### Pacientes estudiados

En este estudio se analizaron los cultivos de las biopsias gástricas de un total de 81 pacientes, de los cuales el 59.25% correspondió al sexo femenino (n=48) y el 40.75% al sexo masculino (n = 33) (Grafica 1). La edad de los pacientes se encontró comprendida en el rango de 20 a 77 años (Gráfica 2).



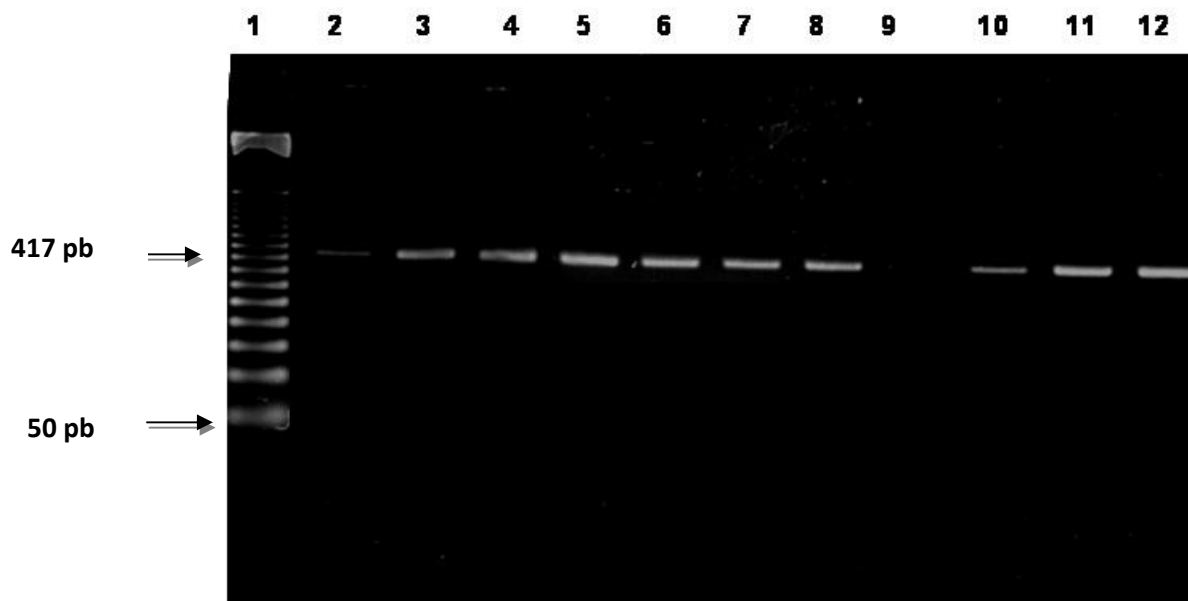
Grafica 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo



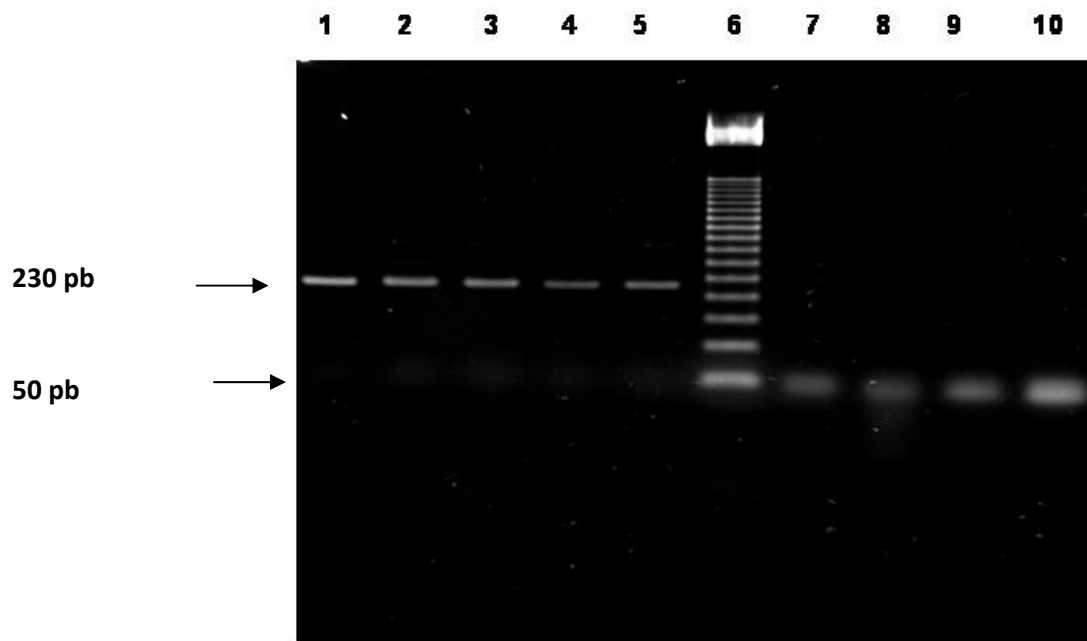
Gráfica 2. Edad de los pacientes estudiados

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

De los 81 cultivos gástricos de los pacientes enfermos, *H. pylori* fue identificado por PCR anidado en el 40.7% (n = 33). El tamaño de los amplicones obtenidos en la primera ronda de PCR fue de 417 pb (Fotografía 1) y el tamaño de los amplicones en la segunda ronda fue de 230 pb (Fotografía 2).



Fotografía. 1. Detección por PCR de *H. pylori* 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



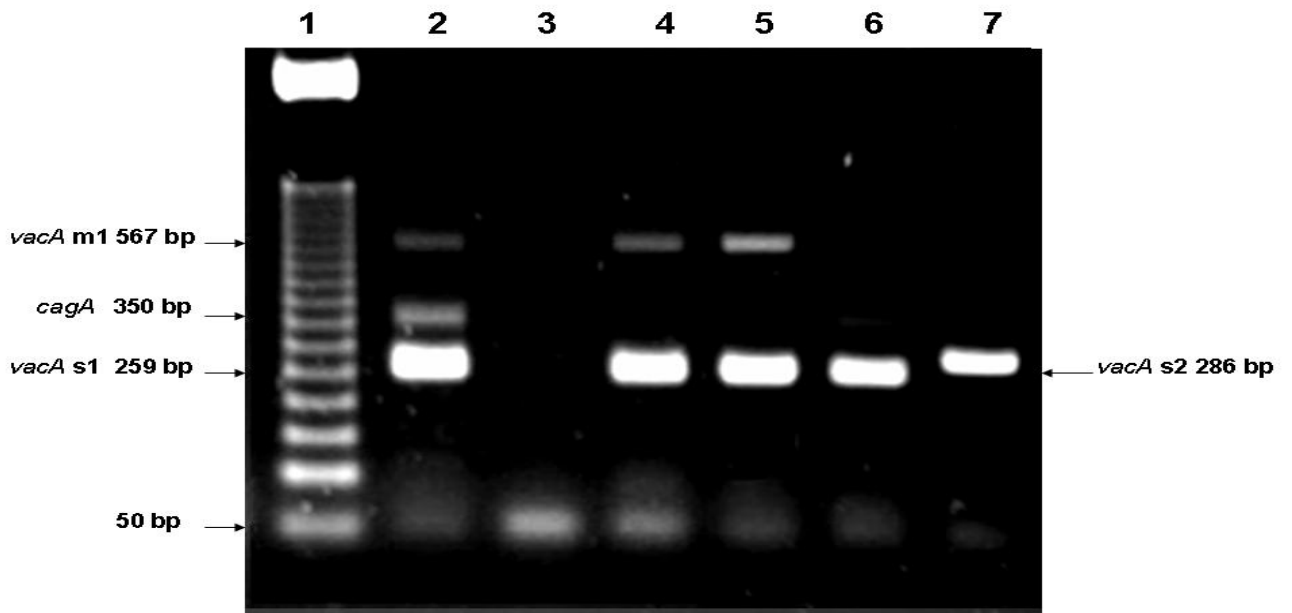
Fotografía 2. Detección por PCR anidado de *H. pylori* en los cultivos gástricos de los enfermos. Línea 1 Control positivo *H. pylori* ATCC 43629. Línea 2-5, *H. pylori* detectado en biopsias de pacientes. Línea 6, MWM 50 bp DNA ladder. Línea 7-10 controles negativos (sin DNA templado)



---

**Amplificación por PCR de *vacA* y *cagA* de *H. pylori* identificada en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes.**

A partir de las 33 (40.7%) cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con gastritis (n = 81), el genotipo *vacA* se detectó en el 100% de las cepas (n = 33) y el genotipo *cagA* en el 18.74% (n = 6) (Fotografía 3). Las frecuencias de asociación más elevada de los alelos de *vacA* con *cagA* (Tabla 2) fue para la asociación *vacA* s1/ *vacA* m1 con el 54.5% (n = 18), seguido de *vacA* s1/ *vacA* m2 con el 15.5% (n = 5), *vacA* s2/ *vacA* m1/ *cagA* con el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA* m2 con el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA* m1 con el 6.0% (n = 2), *vacA* s1/ *vacA* m1/*cagA* con el 3.0% (n = 1) y *vacA* s2/ *vacA* m2/*cagA* con el 3.0% (n = 1)



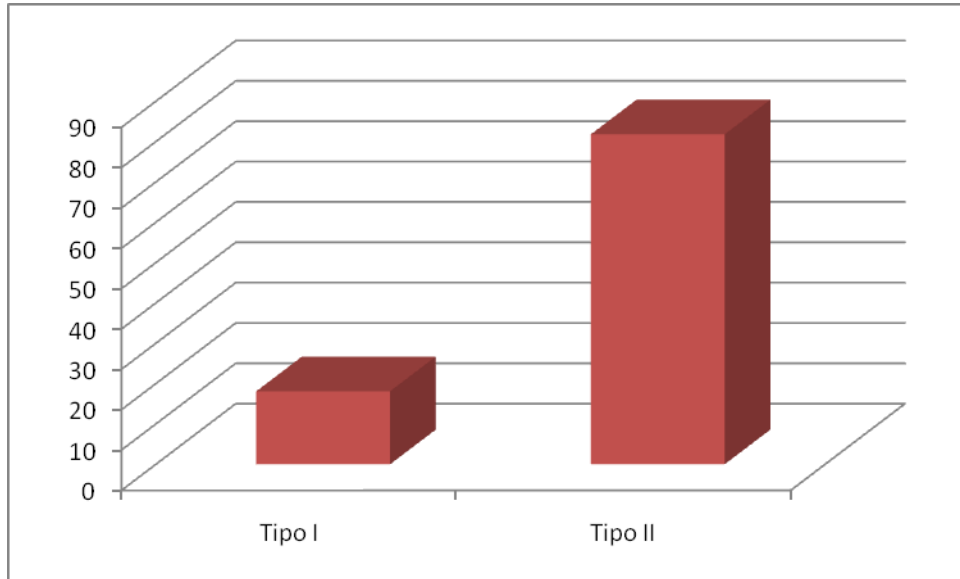
Fotografía 3. Amplificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* y del gene *cagA* en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes. Línea 1; MWM 50-bp ladder; Línea 2; *vacA* s1, *cagA* y *vacA* m1 (biopsia). Línea 3; Control negativo (sin DNA templado). Línea 4 y 5; *vacA* s1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

<b>GENOTIPOS DETECTADOS</b>	<b>No. MUESTRAS (n =33)</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1	18	54.5%
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m2	5	15.1%
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i>	3	9.0%
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2	3	9.0%
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m1	2	6.0%
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i>	1	3.0%
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2/ <i>cagA</i>	1	3.0%

Tabla 2. Frecuencia de los genotipos identificados en las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con gastritis.

### **Identificación de cepas de *H. pylori* Tipo 1 y Tipo 2**

El 18.8% de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes enfermos perteneció al tipo 1 (*vacA/cag A*<sup>+</sup>) y el 81% al tipo tipo 2 (*vacA/cag A*<sup>-</sup>) (Gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de pacientes estudiados y su división en infección Tipo I y Tipo II.

**Distribución de las variantes alélicas de *vacA* y *cagA* de *H. pylori* con relación a la edad de los pacientes estudiados.**

La mayoría de las cepas de *H. pylori* con asociación de los genotipos citotóxicos fueron aisladas de pacientes cuya edad se encontró en el intervalo de 36-51 años (39.3%), seguido por el rango de 52-67 (30.3%) (tabla3).

EDADES PACIENTES INFECTADOS POR <i>H. pylori</i>	GENOTIPOS	No. de muestras (%)
20-35	<i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2 <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2	7 (21.2%)
36-51	<i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i> <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i> <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2	13 (39.3%)
52-67	<i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 <i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m2 <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2	10 (30.3%)
68-83	<i>vacA</i> s1 / <i>vacA</i> m1 <i>vacA</i> s2 / <i>vacA</i> m2/ <i>cagA</i>	3 (9%)

Tabla 3 Relación de los genotipos encontrados a diferentes edades de los pacientes infectados por *H. pylori*

---

## VI. DISCUSIÓN

### Pacientes analizados

En el presente estudio nosotros analizamos por cultivo bacteriano las biopsias gástricas de 81 pacientes que habían acudido a un Hospital de tercer Nivel de atención del Distrito Federal a realizarse estudios endoscópicos por presentar signos y síntomas de gastritis crónica (48 mujeres y 33 hombres) (Gráfica 1). La gastritis es un padecimiento que afecta al 50% de la población mundial, y en países en vías de desarrollo este porcentaje se incrementa hasta el 80%<sup>54</sup>. La causas de la gastritis pueden ser variadas como, una mala alimentación, el consumo de alcohol, el uso prolongado de medicamentos antiinflamatorios no esteroides, lesiones traumáticas, anemia y también debido a *H. pylori*<sup>33,55</sup>.

En la infección por *H. pylori* existen diferentes factores de riesgo, que incluyen; la edad<sup>56</sup>, el bajo nivel socioeconómico, deficiencias nutricionales y malos hábitos higiénicos<sup>57</sup>. Actualmente se ha aceptado que la transmisión de *H. pylori* ocurre de persona a persona<sup>58</sup>, aunque los mecanismos de transmisión todavía no son del todo claros<sup>59</sup>. En Sudamérica se ha reportado que el agua y los

---

alimentos mal cocinados son la principal fuente de diseminación de la bacteria.<sup>60</sup>

La edad de nuestros pacientes se encontró comprendida entre los 20 y los 70 años, dentro de los cuales el 39.3% de los pacientes se encontró en el rango de los 36-51 años y el 30.33% entre 52-67 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<sup>61</sup>, mientras que en países en vías de desarrollo el porcentaje de infección es del 21% o menor<sup>62</sup>. Estas diferencias han sido atribuidas al índice de adquisición en la niñez, por ejemplo en países desarrollados es del 0.5-2-0% y en países en vías de desarrollo del 13-60%<sup>63, 64,65,66</sup>.

El hecho de que en los 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 en la mejoría en las condiciones de vida y en factores de salubridad<sup>67,68</sup> 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 nosotros utilizamos los primers EHC-U y EHC-L dirigidos a un fragmento de 860 pb del cromosoma de *H. pylori*, lo cuales han mostrado tener mayor especificidad que los utilizados para amplificar el gen de la ureasa (gen 16S RNAr)<sup>69</sup>.

De las 81 muestras analizadas en este estudio describimos que el 41% (n=33) resultaron positivas para *H. pylori* (Fotografía 1 y 2) y el 59% (n=48) negativas. Nuestro porcentaje es inferior al descrito en un estudio realizado en el 2007 en 102 pacientes con gastritis crónica, en donde se detectó a *H. pylori* por el mismo método de PCR anidado en la saliva del 58% de los enfermos<sup>70</sup>.

La infección por *H. pylori* en nuestro país es realmente 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 de las 11,605 muestras de suero obtenidas de pacientes (1 -90 años) pertenecientes a distintas zonas geográficas y diferente nivel



---

socioeconómico de 32 estados de México, la seroprevalencia por *H. pylori* fue del 66% (n = 7720) <sup>71</sup>.

El porcentaje de infección por *H. pylori* descrito por nosotros en es semejante al encontrado en un estudio realizado en Lagos Nigeria, en 189 biopsias gástricas obtenidas de 63 pacientes (3 de cada un paciente) con síntomas gástricos, en donde el 35% de los cultivos fue positivo para *Helicobacter pylori* en los tres métodos de PCR utilizados <sup>48</sup>. En otro estudio realizado en la Universidad de Sao Paulo, Brasil, en pacientes con síntomas gástricos en edad de 9-83 años, se encontró por PCR que el porcentaje de infección fue del 67.7% (n=11) <sup>72</sup>. Comparados con Latinoamérica, en México la prevalencia se encuentran por debajo de Chile y Bolivia en donde la población infectada por esta bacteria se encuentra entre el 73% y 74% respectivamente <sup>73,74</sup>, y también por debajo de Brasil, en donde la prevalencia de *H. pylori* es del 87% <sup>75</sup>

La prevalencia de infección por *H. pylori* en nuestro estudio se encuentra por arriba de cifras encontradas en países como Australia, en el cual el 21% de la población total se encuentra infectada, y al de Estados Unidos, Alemania ó Francia en donde la prevalencia no supera el 30% <sup>66,76,77</sup>

---

**Amplificación de los alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori* en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad gástrica por PCR multiplex.**

El gen *vacA* y sus variantes alélicas se utilizan para indicar la capacidad de la citotoxina (VacA) para inducir vacuolización, en nuestro estudio se encontró que el 100% (n=33) de las cepas identificadas en las biopsias gástricas (n=33) de los pacientes, presentó el gen *vacA* (Fotografía 3). Nuestros porcentajes coinciden con el reportado en un estudio realizado en 39 niños con gastritis crónica, en donde el gen *vacA* de *H. pylori* fue detectado en el 92.3% de las cepas (n = 33).<sup>78</sup> La presencia de *vacA* ha sido asociado directamente con úlcera péptica.<sup>79</sup>

El primer gen identificado y considerado como marcador de virulencia fue *cagA* y su presencia ha sido asociada con linfoma de MALT y cáncer gástrico.<sup>80</sup> En nuestro estudio *cagA* se presentó en el 18.74% (n=6) de las cepas. La frecuencia más alta de este gen se encuentra en cepas de países Asiáticos como Japón, China y Taiwán<sup>81</sup>. y es detectado alrededor del mundo en pacientes que presentan úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico. Investigaciones realizadas en Houston, Texas, detectaron que el genotipo *cagA* + es común también

---

en afroamericanos y vietnamitas con un 71% y 91% respectivamente<sup>61</sup>, mientras que en Norte América, Canadá y Europa el porcentaje de esta cepa positiva es menor, por ejemplo en un estudio realizado en la Universidad Católica de Chile en donde analizaron la frecuencia de *cagA* en biopsias gástricas encontraron que se presentó en el 24.2% de las cepas aisladas (n=42)<sup>82</sup>.

La combinación de los alelos *vacA* s1/ *vacA* m1 fue detectado en el 54.5% (n =18) (Tabla 2), esta asociación se ha correlacionado directamente con la infiltración por neutrófilos, severidad de daño epitelial, y mayor riesgo de presentar enfermedad péptica ulcerosa<sup>82</sup>

En un estudio realizado en Houston, Texas se encontró que esta combinación era el más frecuente para la población negra, en Sudáfrica es la región predominante con el 63%<sup>61</sup> y la población hispana<sup>33</sup>, este último dato es importante dado que nosotros pertenecemos a esta comunidad.

Nuestro resultados coinciden con el estudio realizado en 1999 en nuestro país en el cual a 26 pacientes que estaban infectados por *H. pylori*, se obtuvieron colonias individuales y el 70% de las colonias fue *vacA* s1/m1<sup>53</sup>.

---

La asociación predominante *vacA* s1/ *vacA* m2 fue detectada en el 15.1% de las cepas (n=5) (Tabla 2), esta combinación ha sido asociada con actividad citotóxica media,<sup>52</sup> y es predominante para la región del sur y este de Asia. En un estudio realizado por Wang y cols. donde se aislaron 21 muestras, la combinación de los alelos *vacA* s1/ *vacA* m2 fue identificada en el 62% de las cepas analizadas (n=13)<sup>83</sup>

Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* que presentan la combinación de los alelos de *vacA* s1/m1 o s1/m2 son responsables de los altos y medios niveles de producción de la citotoxina<sup>84</sup>

Las combinación de los alelos *vacA* s2/ *vacA* m1/ *cagA*+ se presentó en el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA* m2 con el 9.0% (n = 3), *vacA* s2/ *vacA* m1 con el 6.0% (n = 2), sin embargo se sabe que estas regiones presentan toxicidad baja.<sup>52</sup> Mientras que *vacA* s1/ *vacA* m1/*cagA* con el 3.0% (n = 1) y *vacA* s2/ *vacA* m2/*cagA* con el 3.0% (n = 1) (Tabla 2). Estas combinaciones se ha asociado a patologías severas, tal es el caso de Alemania en donde se realizó un estudio relacionando los genotipos con la patología del paciente encontrándose que en el caso de las cepas *cagA*+ los pacientes presentaron mayor riesgo de desarrollar cáncer.<sup>77</sup>

---

Debido a la patogenicidad que presentan las distintas combinaciones de los alelos y gen de *H. pylori* se ha dividido en Tipo I cuando presentan la combinación *vacA/cagA*<sup>+</sup> que está relacionado con mayor virulencia debido a la inducción de sustancias proinflamatorias y desencadenamiento de vasoespasmos sistémicos<sup>85</sup> y Tipo 2 cuando la combinación es *vacA/cagA*<sup>-</sup> que no presenta alta virulencia, nosotros encontramos que el 18.8% resultaron Tipo I y el 81% Tipo II (Gráfica 4). Estos datos coinciden con estudios en la raza hispanoamericana en donde la presencia de *H.pylori* tipo I se encuentra en 18-24% de la población<sup>82</sup>.

Los resultados obtenidos mostraron que en la gastritis crónica de los pacientes estudiados, se encontró asociado los genotipos citotóxicos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori*, por lo que es necesario establecer el tratamiento adecuado para cada paciente.

---

## VI. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se detectó que el 40.7% de los pacientes presentó infección por *Helicobacter pylori*.
2. La mayoría de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con enfermedad gástrica pertenecieron el Tipo 1.
3. La elevada frecuencia y asociación de los genotipos *vacA* (*s1,s2,m1* y *m2*) y *cagA* identificados en las cepas de *Helicobacter pylori*, evidenció la virulencia y lo agudo de las infecciones por este microorganismo, por lo que fue necesario iniciar el tratamiento médico correspondiente, sobre todo en pacientes con riesgo de desarrollar cáncer gástrico

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bizozzero G. 1983. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Ephetels zu dem Oberflächenepethiel der Schleimhaut. Dritte mitteilung. *Arch Mikroskopische Anat.* 43:82-152.
2. Warren J R., Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.*; 1: 1273–1275.
3. Dent J, McNulty C A M. 1988. Evaluation of a selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 7: 555–568.
4. Eaton K A, Brooks C L, Morgan D R, Krakowka S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immunol.*; 59:2470-5.
5. Alm RA, Ling LS, Moir DPJT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, B. NOONAN BC, Guild BL, DeJonge GC, Tummino PJ, Caruso AM, Uria-Nickelsen DMM, Gibson ICR, Merberg SDQ, Taylor JDE, Vovis GF, Trust TJ. 1999. Genomic-sequence comparision of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Hecobacter pylori*. *Nature.* 397:176-180
6. Dangeruta K, Henrikas C, Douglas EB. 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Molecular Microbiology.* 31:31-43.
7. Jungh D Oh, Bäckhed KH, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Cordum H., Chunyan Wang, Glendoria Elliott, Jennifer Edwards, Elain R. Mardis, Lars G, Engstrand, Jeffrey I. Gordon. 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. *Proceedings of the National Academic of Sciences.* 103:9999-10004

- 
8. Suerbaum Sebastian, Christine Josenhans. 2007. *Helicobacter pylori*: Evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews of Microbiology*. 5: 441-452.
  9. Wang G, M. Zafri Humayun, Diane E. Taylor. 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends in Microbiology*. 7:488-493
  10. Eaton K. A, Morgan D. R, Brooks C. L, Krakowka S. 1991. Essential role of urease in the pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.*; 59: 2470–2475.
  11. Eaton K. A, Morgan D. R, Krakowka S. 1992. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.*; 37: 123–127.
  12. Jabri E, Carr M. B, Hausinger R. P, Karplus P. A. 1995. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes* at 2 Å resolution. *Science.*; 268: 998–1004.
  13. Jabri E, Lee M. H, Hausinger R. P, Karplus P. A. 1992. Preliminary crystallographic studies of ureases from jack bean and from *Klebsiella aerogenes*. *J. Mol. Biol.*; 227: 934–937.
  14. Harris P. R, Mobley H. L, Pérez-Pérez G.I, Blaser M. J, Smith P.D. 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 111:419-425
  15. Odenbreit S; Wieland B; and Hass R. 1996. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and a construction of a catalase deficient mutant strain. *Journal of Bacteriology*. 178:6960-6967
  16. Gerhard Marcus, Norbert Lehn, Nina Neumayer, Thomas Boren, Roland Rad, Wolfgang Scheep, Stephan Miehke, Meinhard Classen, Christian Prinz. 1999.
-



---

Clinical relevance of *Helicobacter pylori* gene a blood group antigen binding adhesion. *Proceedings of the National Academic of Science*. 96:12778-12783.

17. Mahdavi J. G, Sonden F, Hurting F, O. Olfat, L, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, Tenneberg, K. Karlsson, S. Altraja. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesion in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 297: 573.578
18. Odenbreit Stefan, Markus Till, Dirk Hoffreuter, Gerhard Faller, Rainer Hass. 1999. Genetic and Functional characterization of the *alpA/B* gen locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* in human gastric tissue. *Molecular Microbiology*. 31:1537-1548
19. Campbel B. J, Rogerso K. A, Rhode J. M. 1999. Adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by an epithelial cell-surface Lewis<sup>x</sup> carbohydrate-binding protein. *Gastroenterology*.; 116: A131.
20. Atheron Jhon C, Richard M. Peek, Kyi T Tham, Timothy L. Cover, Martin J. Blaser.1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating citotoxin gen of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*.112:92-99
21. Cover Timothy and Martin J Blazer. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*. 267:10570-10575
22. Van Door Leen- Jan, Figueredo, Francis Megraud, Salvador Peña, Peter Midolo, Dulciere Maria; Fátima Carneiro, Bart Vanderborght. 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 116:823-830

- 
23. Christie P. J. 1997. The *cag* pathogenicity island: mechanistic insights. *Trends Microbiol.*; 5: 264–265.
  24. Jenks P. J. F, F. Mégraud, A. Labigné. 1998. Clinical outcome after *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of *cag* Pathogenicity Island. *Gut*. 43: 752-758
  25. Galgani Mario, Immacolata Bussiello, Stefano Censini, Serafino Zappacosta, Luigi Racciopi, Raffaele Zarilli. 2004. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but no monocyte derived dendritic cells: Role of the *cag* pathogenesis island. *Infection and Immunity*. 72:4480-4485
  26. Moese Stefan, Matthias Selbach, Volker Brinkman, Alexander Karlas, Beatrice Haimovich, Steffen Backert, Thomas F. Meyer. 2007. The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by desphosphorylation of vinculin. *Cellular Microbiology*. 9:1148-1161
  27. Covacci A, Falkow S, Berg D. E, Rappuoli R. 1997. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol.*; 5: 205–208.
  28. Covacci A, Rappuoli R. 1998. *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species. *Curr. Opin. Microbiol.*; 1: 96–102.
  29. Mielkhe Stephan, Kirsten Kliber, Jong Kim, Susan Samll, David Graham, Mae Go. 1996. Allelic variation in the *cagA* gen of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared with the United States. *The American Journal of Gastroenterology*. 91:1322-1325

- 
30. Tummuru M. K, Cover T. L, Blaser M. J. 1994. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*; 62: 2609–2613.
  31. Staat MA, Kruszon-Moran D, McQuillan GM, Kaslow RA. 1996. A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. *J. Infect. Dis.* 174:1120–1123.
  32. Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. 1999. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter.* 4:185–197.
  33. Malaty H. M., Evans D. G, Evans D. J, Graham D. Y. 1992 *Helicobacter pylori* in Hispanics—comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology.* 103: 813–816
  34. Parsonnet J. 1995. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:45-51
  35. Torres J, Herrera YL, Pérez-Pérez G; Carmolinga Ponce M; Cedillo Rivera R. 1998. A Community based Seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infections Disease.* 178:1089-1094
  36. Rothenbacher D., Bode G., Berg G., Knayer U., Gonser T., Adler G., Brenner 1999. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J. Infect. Dis.*; 179: 398–402.
  37. Kraiden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, Babida C, Karmali M, Penner J. L. 1989. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*; 27: 1397–1398.

- 
38. Genta R, M. and Graham D. Y. 1994. Comparison on biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *Helicobacter pylori* density and distribution. *Gastrointestinal endoscopy*. 40:342-345
  39. Torres J y Carmolina P. 2001 .Programa de actualización en infectología. Intersistemas SA de CV. pág. 491-517
  40. Otero W. 2000. Cáncer gástrico y *Helicobacter pylori*. *Acta Med. Colomb*. Vol. 33. No.1
  41. Crew K. D and Neugut A. I. 2006. Epidemiology of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 12(3):354-362
  42. Watanebe T.; Tada M; Nagai H, Sasaki S and Nakao M. 1998. *H. pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbics. *Gastroenterology*. 115:642-648
  43. Perkins A., Garcia-Sipido. 1999 Linfoma tipo MALT de localización gástrica- Infección por *Helicobacter Pylori*.;  
[www.helicobacterspain.com/clinica/linfoma\\_MALT\\_revisión.htm](http://www.helicobacterspain.com/clinica/linfoma_MALT_revisión.htm)
  44. Stolte M., Eidt S., Bayerdorffer E., Fischer R 1994. *Helicobacter Pylori* associated gastric lymphoma. En: *Helicobacter Pylori, basic mechanisms to clinical use*. De Hunt R.H., Tytgat G.N. ed. Kluwer Academic Publishers. Lancaster U.K.: 498-503
  45. Matisiak –Bundit T, and Megraud 2006. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *European Journal of Cancer*. 42:708-716
  46. [www.helicobacterfoundation.com](http://www.helicobacterfoundation.com)
  47. [www.helicobacterspain.com](http://www.helicobacterspain.com)
-

- 
48. 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. Comparision of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology* 10 (13): 1958-1960
  49. Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy T, Chowdhury A, Santra A, Dhali GK, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB, Mukhopadhyay AK. 2004. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42:2821-2824.)
  50. Beil MJ; Pérez-Pérez; T L Cover and A Nomura. 2000. *Helicobacter pylori* associated with duodenal ulcer. *J. biol. Chem.* 90:5791-5799.)
  51. Lee-Jan van Doorn. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* virulence - associated genes. *Rev. Mol. Diagn* 1(3): 290-298
  52. Atheron, J C, P Cao; M Peek; MJ Blasser. 1997 Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *H. pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270: 1771-1777.
  53. Morales-Espinoza, Castillo-Rojas, González-Valencia, Ponce de León, Cravioto, Lopez-Vidal. 1999. Colonization of mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 37:3001-3004.
  54. González Valencia G, J.C. Atheron, O. Muñoz, M. Dehesa, A. Marazo-de la Garza, J.Torres. 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *The Journal of Infectious disease.*182:1450-1454.
  55. Goh K. L. 1997 Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a multi-racial dyspeptic Malaysian population undergoing endoscopy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12: S29–S35.

- 
56. Banatvala N, Mayo K, Megraud F. 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis.*168:219–21.
57. Morris Brown L. 2000 *Helicobacter pylori*. Epidemiological routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 22:283–97.
58. Mitchel HM. 1999. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr. Tor. Microbiol Immunol.* 241:11-30
59. Goodman KJ, Correa P. 2000 Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet.* 355: 358–62
60. Goodman K. J., Correa P., Aux H. J. T., Ramirez H., Delany J. P., Pepinosa O. G., Quinones M. L., Parra T. C. 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes—a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.*; 144: 290–299.
61. Holcombe C, Omotora 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.
62. Mitchell H. M., Li Y. Y., Hu P. J., Liu Q., Chen M., Du G. G., Wang Z. J., Lee A., Hazell S. L. 1992. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China—identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J. Infect. Dis.* 166: 149–153.
63. Al-Moagel M. A., Evans D. G., Abdulghani M. E., Adam E., Evans D. J. J., Malaty H. M., Graham D. Y. 1990. Prevalence of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter*) *pylori* infection in Saudi Arabia, and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* 85: 944–948.
-

- 
64. Graham D. Y., Adam E., Reddy G. T., Agarwal J. P., Agarwal R., Evans D. J., Malaty H. M., Evans D. G. 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig. Dis. Sci.* 36: 1084–108.
65. Jones D. M., Eldridge J., Fox A. J., Sethi P., Whorwell P. J. 1986. Antibody to the gastric campylobacter-like organism ("*Campylobacter pyloridis*")—clinical correlations and distribution in the normal population. *J. Med. Microbiol.*; 22: 57–62.
66. Megraud F. Brassens Rabbe M. P., Denis F., Belbouri A., Hoa D. Q. 1989. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1870–1873.
67. Replogle M. L., Kasumi W., Ishikawa K. B., Yang S. F., Juji T., Miki K., Kabat G. C., Parsonnet J. 1996. Increased risk of *Helicobacter pylori* associated with birth in wartime and post-war Japan. *Int. J. Epidemiol.*; 25: 210–214.
68. Andersen L. P., Rosenstock C. V., Bonnevie O., Jorgensen T. 1996. Socioeconomic factors in *Helicobacter pylori* infection among Danish adults. *Am. J. Public Health.* 86: 1539–1544.
69. 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.
70. Paniagua-Contreras Gloria, Monroy-Pérez Eric, Alcantara-Carmona Mayra, García-González Octavio, Vaca-Pacheco Sergio. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos vacA y cagA en la saliva de pacientes con gastritis. *Revista Médica del Hospital General de México.* Vol. 70. No. 3.
-

- 
71. Camargo MC, Lazcano PE, Torres J, Velasco ME, Quiterio M, Correa P. 2004 Determinants of *Helicobacter pylori* Seroprevalence in Mexican Adolescents. *Helicobacter*. 9:106-114.
72. Ramos MLK, Darini E, Carales CF, Merano de CC, Aparicio-Troquez SMC, Heraldo CLL, 2005. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polimerase chain reaction in gastric biopsias: correlation with histological findings proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med. J.* 23(3): 113-118
73. 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. 2007 Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. *Microbes and Infections*. 9:428-434;
74. 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. 2005. *Helicobacter pylori* is not associated with anemia in Latin America: results from Argentina, Brazil, Bolivia, Cuba, Venezuela and México. *BMC Public Health*. 5:118-128
75. Andreia Maria Rocha de Oliveira, Gifone Aguiar Rocha, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Maira Tonidandel Barbosa, Sérgio CaetanoSilva 1999; Prevalence of *H. pylori* infection in a population from the rural area of Aracuai, Brazil. *Rev Microbiol*. Vol 30 no1
76. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Pérez Pérez GI, Tralka TS, McQuillan G. 2000 Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infec Dis*. 181: 1359-63.
-



- 
77. Breuer T, Sudhop T, Hoch J, Sauerbruch T, Malfertheiner P. 1996. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 8: 47-52.
78. Sicinski, L.A., Correa, P., Bravo, L.E., Schneider, B.G. 2003. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Methods.* 52;197– 207
79. Cover T. L., Tummuru M. K., Cao P., Thompson S. A., Blaser M. J. 1994 Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 269: 10566–10573.
80. Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J. E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A. 1996; *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 14648–14653.
81. Chich-Ho; Chu-Horen, Ya-Chi C; Fang-Yu C; Sek-Khownk y Wen-Ching; 2000. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J. Clin. Microbiology.* 40:3860-3862.
82. Garcia Apolinaria, Barra Ricardo, Delgado Carolina, Kawaguchi Fernando, Trabal Natalia, Sonia Montenegro, González Carlos. 2006. Genotipificación de aislados clínicos de HP en base a genes asociados de virulencia *vacA*, *cagA* y *baba2*. *Rev. Med Chile.* 134:981-988.
83. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA Jr, Litchfield P, Thomas E. 2002 Comparison of cytotoxin genotypes Of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig Dis Sci;* 8: 1850-1856.
-

- 
84. Gzyl, A., Berg, D.E., Dzierzanowska, D. 1997. Epidemiology of *cagA/vacA* genes in *H. Pylori* isolated from children and adults in Poland. *J. Physiol. Pharmacol.* 48:333-343.
85. Gazbarrini A, Gabrielli M, Fiore G, Candelli M, Bartolozzi F, De Luca A, Franceschi F, Di Campli, Armuzzi A, Ojetti V, Serricchio M, Pola R, Gasbarrini G, Giacobazzo M, Pola P. 2000 Association between *Helicobacter pylori* type I *cagA*-positive strains and migraine with aura. *Cephalgia.* Jul.20 (6): 561-5.