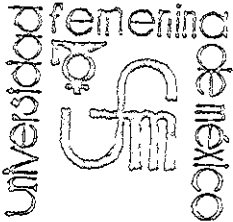


300.927



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
INCORPORADA A LA UNAM.

“CARACTERIZACION GENOTIPICA DE COLONIAS
DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS
CON ENFERMEDAD GASTRODUODENAL”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN QUIMICO
FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

JOSEFINA SANCHEZ URIBE

DIRECTOR DE TESIS: Q.FB. ALMA VIRGINIA TAMES SOTO

MEXICO, D.F.

2000



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

A mis padres por el cariño, paciencia, apoyo
moral y económico a lo largo de mi carrera.

A mis hermanas Ana Luisa y Brenda
por su comprensión.

A mis compañeros y amigos por estar en esos
momentos difíciles y alegres por compartir
todos esos momentos conmigo.

A todas las personas que de alguna forma me apoyaron
y me escucharon a lo largo de mi carrera.

Agradezco al M en C Gerardo González Valencia
por compartir sus conocimientos,
por su paciencia y por su apoyo durante
la realización del presente trabajo

“CARACTERIZACION GENOTIPICA DE COLONIAS
DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE NIÑOS Y
ADULTOS CON ENFERMEDAD
GASTRODUODENAL”

INDICE GENERAL

Capítulo 1	Fundamentos
Capítulo 2.	Planteamiento del problema
Capítulo 3.	Objetivos e Hipótesis
Capítulo 4.	Diseño de investigación
Capítulo 5.	Material, equipo y reactivos
Capítulo 6.	Diagrama de flujo
Capítulo 7.	Método
Capítulo 8.	Resultados
Capítulo 9	Discusión
Capítulo 10.	Conclusiones
Capítulo 11	Anexos
Capítulo 12.	Bibliografía
Capítulo 13	Glosario

INDICE.

	Pag
1- Fundamentos	1-3
2- Epidemiología	3-8
3- Patología gastroduodenal	
Gastritis	8-10
Úlcera péptica	10-11
Úlcera duodenal	11-12
Úlcera gástrica	12
Cáncer gástrico	13
4- Patología en niños	13-14
5- Factores de virulencia	
Citotoxina vacuolizante	14-15
<i>Cag A</i>	15
Ureasa	16
Proteína de choque térmico	16
Movilidad	16
Lipopolisacáridos	16-17
6- Diagnóstico	
Métodos invasivos	
Cultivo de biopsia	7-18
Histología	18
Tinción de Gram	18
Prueba de ureasa	18-19
Métodos no invasivos	
Prueba de aliento	19

Serologia	20
7- Tratamiento	20-22
8- Planteamiento del problema	23
9- Objetivos	24
10- Hipótesis	24
11- Diseño de investigación	
Tipo de estudio	25
Población de estudio	25
Criterios de inclusión	25
Criterios de exclusión	25
Variable dependiente	25
Variable independiente	25
12- Material, equipo y reactivos	
Material	26-27
Equipo	27
Material biológico	28
Reactivos	28-29
13- Diagrama de flujo	30-32
14- Método	
I- Obtención de colonias de <i>H. pylori</i>	33
II- Obtención de paquete bacteriano	34
III- Extracción de DNA	
Método de GES modificado para extracción de DNA	

cromosoma:	35-36
Método de ebullición de DNA cromosoma:	36
IV-. Método de PCR	37-39
V-. Tipos de primers utilizados	40
VI-. Controles	41
VII-. Preparación del gel de agarosa al 2%	41-42
VIII-. Tinción y observación del gel de agarosa al 2%	42
IX-. Análisis estadístico	43- 45
15-. Resultados	
Características de la población estudiada (Tabla 1)	46
Características de las colonias aisladas de adultos (Tabla 2)	47-49
Características de colonias aisladas de niños (Tabla 3)	50-52
Imágenes de muestras positivas para la region <i>cagA</i> 335 y 349.....	53
Imágenes de muestras positivas para las regiones <i>s,m</i> y <i>picB</i> ..	54-56
Genotipos de <i>vacA</i> y <i>cagA</i> encontradas en colonias aisladas de adultos (Tabla 4)	57-60
Genotipos de <i>vacA</i> y <i>cagA</i> encontrados en colonias aisladas de niños (Tabla 5)	61-63
Frecuencia de alelos de <i>vacA</i> en colonias de <i>H. pylori</i> aislados de niños y adultos de México (Tabla 6)	64 -65
Gráficas de distribución y comparación de muestras positivas para region <i>s</i> y region <i>m</i> .	65-68
Frecuencia de infección con aislados de <i>cagA</i> determinados son dos diferentes tipos de primers en colonias de <i>H. pylori</i> aislados de niños y adultos de México (Tabla 7)	69
Gráficas de distribución y comparación de muestras positivas para region <i>cagA</i>	70-71
Relación de la combinación <i>picB</i> y <i>cagA</i> en colonias de <i>H. pylori</i> aislados de niños y adultos de México (Tabla 8)	72

Graficas de distribución y comparación de muestras positivas para la combinación de las regiones <i>picB-cag A</i>	73-74
16-. Discusión	75-77
17-. Conclusiones	78-80
18-. Anexos	
Anexo I: El DNA (Acido desoxirribonucleico)	81
Anexo II: Descripción del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de <i>H. pylori</i> .	82-88
Anexo III: Preparación de soluciones	
Medio selectivo para <i>H. pylori</i> (sin antibiótico)	89
Medio selectivo para <i>H. pylori</i> (con antibiótico)	89
Prueba de Ureasa	90
Anexo IV: Preparación de soluciones	
Solución stock de tris	91
Solución stock de EDTA	91
Buffer de TE	92
Solución de acetato de amonio	92
GES	92
Loading buffers	93
Bromuro de etidio	93
Buffer tris-acetato (TAE 50X)	93
Marcador de peso molecular	94

19- Bibliografía

Bibliografía básica

95-96

Bibliografía complementaria

97-103

20- Glosario

104-107

CAPITULO 1

FUNDAMENTOS

“CARACTERIZACION GENOTIPICA DE COLONIAS DE
Helicobacter pylori AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS CON
ENFERMEDAD GASTRODUODENAL”.

FUNDAMENTOS:

En años recientes se ha reportado y documentado la importancia de una bacteria espiral en el estómago de mamíferos. En humanos esta bacteria se observó por primera vez en material necrótico en la superficie de carcinomas ulcerosos y lesiones gástricas. (Longer 1917) en ese tiempo se le dio poca atención y se pensó que se trataba de un contaminante. En 1939 Donges publico un amplio estudio donde describió la presencia de microorganismos espirales en un 43% de los estómagos procedentes de autopsias, pero no fue sino hasta 1975 que Steer y Colin-Jones asociaron la presencia de esta bacteria curva gramnegativa con las biopsias gástricas procedentes de pacientes con úlcera gástrica y gastritis. (13,38)

En 1982 Warren y Marshall cultivaron con éxito a esta bacteria espiral que colonizaba el estómago humano y describieron una asociación entre su presencia y la gastritis antral en adultos

En 1984 este microorganismo se incluyó en el género *Campylobacter* y se le nombró *Campylobacter pyloridis*. En 1989 se cambio su nombre a *Campylobacter pylori* por razones gramaticales. (9,13,38,44,47)

Helicobacter pylori

El cultivo de la bacteria que fuera primeramente llamada *Campylobacter pylori* fue seguida por un intenso escrutinio de sus características taxonómicas, especialmente comparado con otras bacterias del género *Campylobacter* en ultra estructura, composición celular ácido graso, quinones respiratorios, características del desarrollo, secuencia del ARN y enzima. A diferencia de la mayor parte de los verdaderos organismos del género *Campylobacter* esta posee una potente actividad de ureasa, propiedad que puede tener importantes implicaciones patogénicas. Esta enzima de superficie celular está compuesta por dos subunidades de aproximadamente 30 a 60 KD, los genes por los cuales han sido secuenciados. (38,44,47)

Debido a sus semejanzas morfológicas y culturales con bacterias del género *Campylobacter*, que llevo al principio a incluirla dentro de este género es pertinente destacar algunas diferencias que llevaron a incluirla dentro de un nuevo género, *Helicobacter* (Cuadro 1).

Cuadro 1

Comparación entre *H. pylori* y *Campylobacter*. (15)

Ambos son curvos, gramnegativos, microaerófilos, móviles, oxidasa positiva.

	<i>H. pylori</i>	<i>Campylobacter</i>
Contenido G + C	35 a 44 mol %	30-35 mol %
Flagelos	4 a 5 envainados	único, no envainado
Pared celular	Suave	Rugosa
Crece mejor a	37 °C	42 °C
Catalasa	Positiva	Variable
Ureasa	Positiva	Negativa

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa helicoidal o curvada de 0.5-0.9 μm de largo, es móvil por medio de 3-5 flagelos polares. Su morfología colonial y macroscópica varían de acuerdo a las condiciones del medio de cultivo y requiere de condiciones microaerofílicas para su crecimiento de 37°C, las reacciones de la catalasa, ureasa y oxidasa son positivas, no produce ácido sulfhídrico en medio agar hierro triple azúcar (TSI), no hidroliza el hipurato, es una bacteria sacarolítica. ^(11,20,34,20,42)

La típica forma espiral de la bacteria en cultivos viejos aparece como cuerpos cocoides

Las formas cocoides no son cultivables y se atribuyen al stress ambiental, como a una disminución de nutrientes, incubaciones prolongadas, acumulación de productos metabólicos, alteraciones de pH y a la exposición a agentes antimicrobianos, este último es de gran importancia en la terapia. ⁽⁴⁾

El aislamiento primario de *H. pylori* en agar sangre a 37 °C requiere de 3 a 4 días, pero si no se observa crecimiento debe continuarse la incubación hasta por 7 días. ⁽¹³⁾

Las colonias son pequeñas, circulares, convexas, húmedas y translúcidas de 2 mm de diámetro, alrededor de estas se presenta una ligera hemólisis de color gris en agar sangre.

Crece en medios selectivos y enriquecidos como Skirrow, Marshall, agar infusión cerebro corazón, agar brucella y medios que contengan hemina ó de 5 a 10% de sangre de carnero ó caballo. ^(13,37)

Las condiciones microaerofílicas, se desarrolla mejor en una atmósfera de 5a 6% de O₂, 7 a 12% CO₂, 85% de N₂, 8% de H₂ y alta humedad. ^(20,37)

Una de las características bioquímicas más sobresalientes de *H. pylori* es la producción de ureasa.

Helicobacter pylori

La hidrólisis de la urea por esta enzima produce amonio, el cual neutraliza el ácido clorhídrico del estómago y puede dañar directamente a las células epiteliales gástricas (13,14)

Otras características bioquímicas de *H. pylori* incluyen la capacidad de fermentación de la glucosa e hidrólisis del hipurato. *H. pylori* no produce indol, ni tampoco H₂S (9,34)

H. pylori produce además una citotóxina, que forma vacuolas en cultivos celulares (*VacA*) y fosfolipasas. El contenido en el DNA de *H. pylori* C+G es de un 35 a 44 % mol (5,11)

En cuanto a sensibilidad antimicrobiana la bacteria es sensible *in vitro* a la penicilina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina, metronidazol, tetraciclina y cefalotina. También es sensible a las sales de bismuto. Se ha documentado su resistencia a la vancomicina, sulfonamidas, trimetoprim y el ácido nalidixico. (13,38,34,20,33)

H. pylori se encuentra en la mucosa gástrica debajo y dentro de la capa de moco gástrico, no invade el epitelio. Usualmente es más común en la mucosa antral, pero puede estar presente en otras partes del estómago y pueden ser aislado de otros sitios tales como duodeno, esófago y recto sólo si en estos sitios se produce metaplasia (Cover y Blaser 1989). La bacteria es más comúnmente adquirida en la niñez, se adapta y sobrevive por periodos largos en sitios que en su mayor parte no tienen flora normal microbiana. (13,47)

En primates no humanos como el mono rhesus y el mono japonés se pueden identificar cepas de origen humano de *H. pylori*, las cuales han sido caracterizadas bioquímica y antigénicamente. En un estudio con necropsias de 100 monos rhesus de la India, se observaron en el estómago de un mono erosiones gástricas, un 4% de los animales tenían inflamación gástrica o alteraciones degenerativas en la mucosa gástrica. Se ha descrito que pueden ser especies del género *Helicobacter* que inducen manifestaciones clínicas en animales similares a las que *H. pylori* produce en humanos principalmente por *H. felis* y *H. heilmanii* que puede ser observado en el tejido gástrico de los gatos asociada con la gastritis crónica en un 70% en gatos jóvenes y en un 97% en gatos adultos. Infecciones

Helicobacter pylori

experimentales de *H. pylori* a felinos confirman la colonización interespecífica, ya que el microorganismo se aisló de biopsias y necropsias 7 meses después de la inoculación de todos los gatos. Sin embargo las cepas de *H. pylori* humanas son inofensivas para los gatos. Estos datos indican que *H. pylori* es capaz de colonizar y replicarse en mamíferos no en humanos, lo cual es una información valiosa para entender algo más sobre la epidemiología de *H. pylori*.⁽³⁰⁾

EPIDEMIOLOGIA:

H. pylori ha sido encontrada en el estómago de humanos en todas partes del mundo. En países en vías de desarrollo del 70 al 90% de la población se encuentra infectada con *H. pylori* desde la edad de 10 años. En países desarrollados la prevalencia de infección es baja
(14)

La epidemiología de la infección por *H. pylori* es poco conocida, diferentes estudios en todo el mundo y en especial en poblaciones de países en desarrollo han reportado un incremento de las infecciones con la edad y que ciertos grupos étnicos tienen mayor riesgo de adquirirla. Los Africanos e Hispanoamericanos tienen mayor porcentaje de infección en comparación con Americanos caucásicos, se ha propuesto probablemente que estas diferencias están más ligadas a factores socioeconómicos que a factores raciales^(11,40,53)

Un estudio en Houston en Estados Unidos mostró que la prevalencia de la infección en 485 individuos sanos fue del 52%, 34% de individuos de raza blanca frente al 70% de raza negra. Otro estudio al sur de Gales, en el Reino Unido mostró una infección del 56.9% en 749 individuos con edades comprendidas entre los 30 y 75 años, encontrándose que esta prevalencia crece conforme se incrementa la edad. También se encontró que la infección se asocia más a las clases socioeconómicas más débiles y que la adquisición ocurre más consistentemente en una fase temprana de la vida de la infección por *H. pylori*.^(38,53)

Helicobacter pylori

En Barcelona España, Mones et al encontró mediante el método de serología ELISA, encuentran una seroprevalencia del 60% en 139 individuos asintomáticos con edades entre los 10 y 80 años. La prevalencia entre 1 y 20 años fue del 20% y a partir de los 40 años fue del 80%. En un país del tercer mundo como la India, varios estudios han mostrado que la prevalencia de la infección es del 60% en personas de 1 a 20 años y del 80% a partir de los 20 años. Esto refleja la mayor facilidad de transmisión en los países con condiciones higiénicas más deficientes. ^(38,55)

Se ha observado que el 73.5% de los padres de niños infectados son seropositivos para *H. pylori*, mientras que solo un 24 % de padres de los niños no infectados presentaron anticuerpos (Ac) *H. pylori* ocasionalmente es aislado de diferentes especies animales como mono rhesus, cerdos, perros, gatos y ratas, para otras especies de *Helicobacter* como hurones para *H. mustelae*, gatos y perros para *H. felis*, mono macaco para *H. nemistrinae*, y así como también ratas y ratones para *H. muradarum*. ^(38,11)

Aunque el modo de transmisión es desconocido, se ha sugerido que un patrón de transmisión feco-oral. Un estudio en el que es más plausible se analizó por serología la prevalencia de infección en 98 trabajadores de matadero mostró que el personal administrativo tuvo una seropositividad similar a la de los controles y significativamente menor a la de los matarifes y a los manipuladores de vísceras, lo que sugirió que la infección podría deberse también a una zoonosis. *H. pylori* puede ser transmitida persona a persona. En algunos reportes se ha descrito el aislamiento del organismo de la placa dental y la saliva, lo que sugiere una potencial de transmisión oral-oral. Los dentistas no presentan mayor riesgo de infección en comparación con los controles. Usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un estudio se encontró que un 70% de las personas tenían DNA de *H. pylori* en su saliva y 18 personas tenían *H. pylori* en la placa dental

Helicobacter pylori

Thomal et al aislaron *H. pylori* de las heces de 9 (39%) de 23 niños de Gambia aproximadamente de 5 años de edad, lo que apoyaría una posible transmisión fecal-oral. El consumo de agua contaminada y de vegetales crudos también ha sido propuesto como otro modo de transmisión de *H. pylori*, lo que explicaría en parte la elevada incidencia de infección en países en desarrollo. (26,38,39,40,47)

La contaminación de los endoscopios y pinzas con *H. pylori* ocurre raramente después de exámenes endoscópicos de pacientes positivos para *H. pylori*, estimándose la transmisión en un 4 por 1000 endoscopias, cuando el porcentaje de infección de la población es del 60%, lo cual indica que el endoscopio puede ser un reservorio de *H. pylori*. Fantry y cols. mostraron por la técnica de PCR usando genomas y primers de ureasa que el 6% de los endoscopios se contaminan después de examinar a pacientes infectados por *H. pylori*. Varios estudios muestran que hay una alta prevalencia de *H. pylori* en gastroenterólogos y endoscopistas que están expuestos a secreciones gástricas cuando no usan guantes. (39)

Spacha y cols. De 1966 a 1992 identificaron 28 infecciones transmitidas por endoscopia gastrointestinal, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron identificadas como los agentes causales más frecuentes de infección por endoscopia. La posible razón de la transmisión fue por las diferentes técnicas de lavado y desinfección usadas (39)

Katon y cols, mostraron que el lavado manual con 0.2% de cloruro de benzalconio, como se practica en Japón, es insuficiente para prevenir la transmisión de *H. pylori*. Datos reportados por Kaneko, han mostrado que el lavado del endoscopio con agua corriente y jabón neutro y 30 ml de alcohol metílico al 83%, seguido por enjuagues con una gasa con alcohol metílico es también insuficiente para eliminar *H. pylori*. Una adecuada limpieza y desinfección usando glutaraldehído elimina efectivamente la posibilidad de la transmisión de *H. pylori* de acuerdo con Fantry. Las técnicas convencionales de limpieza y descontaminación, son altamente efectivas con la descontaminación de *H. pylori* de los endoscopios. (39)

Helicobacter pylori

Bunn J. et al estudiaron 65 madres e infantes de Gambia, colectando las muestras de sangre de todas las madres, y del cordón de 34 niños. Se tomaron series de muestras por intervalos de 8 semanas, los anticuerpos IgG fueron medidos por ELISA y en los infantes por medio de la prueba de aliento de la urea mensualmente. Los niveles de anticuerpos maternos y del cordón correlacionaron, incluyendo que las madres transfieren anticuerpos específicos de IgG anti- *H. pylori* a sus infantes, pero estos no confieren una protección contra la colonización de *H. pylori* en los primeros años de vida. ⁽³⁶⁾

Kordecki H et al, evaluaron la frecuencia de las lesiones de la mucosa del tracto digestivo superior y la frecuencia de infecciones de *H. pylori* en pacientes que recibieron ácido acetilsalicílico (ASA) en dosis de 70-300 mg/día, el cual fue administrado para enfermedades cardíacas como isquemia en 60 pacientes, de 31 a 72 años de edad los cuales se les realizó una endoscopia del tracto digestivo superior, en 52 (87%) con isquemia cardíaca que tomaron ASA se observaron erosiones en el estómago y/o en el bulbo duodenal 12 (29%) pacientes tenían úlcera gástrica y por exámenes microscópicos revela que 39 (65%) pacientes tenían una gastritis activa. El 76% de los pacientes que recibieron ASA se infectaron con *H. pylori*. ⁽³⁶⁾

PATOLOGIA GASTRODUODENAL:

GASTRITIS: es una reacción inflamatoria de la mucosa gástrica o gastritis siendo la patología más frecuente en Gastroenterología. Las gastritis se clasifican en agudas y crónicas; las agudas pueden ser erosivas (irritante, alcohol, medicamento “estrés”) corrosión (acidosis, álcalis), infecciones hematógenas (sarampión, escarlatina, etc.).

El alcohol lesiona la mucosa gástrica al incrementar la degradación del moco y la difusión de iones hidrógeno a través de la barrera de moco al reducir la secreción de

Helicobacter pylori

bicarbonato por las células de la mucosa. Las sales biliares tienen efectos similares. La "gastritis por estrés", presente en pacientes graves o lesionados, se atribuye a reducción del aporte sanguíneo a la mucosa, que priva de oxígeno, nutrientes y bicarbonato a las células (19)

Las crónicas pueden ser resultado de gastritis agudas, por fenómenos inmunológicos y secundarios a padecimientos sistémicos. Pueden ser atróficas e hipertrófica. (8)

La infección por *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica B o antral es la más común, afecta en especial el epitelio antral secretor de moco y (en grado variable) el cuerpo secretor de ácido. Numerosos pacientes con dispepsia no ulcerosa también tienen gastritis crónica B y no se relaciona con la gastritis A, que es un trastorno auto inmune que afecta anticuerpos de células parietal e inflamación crónica de la mucosa en el cuerpo del estómago, casi sin afectar el antro, aparte de hipoclorhidria (debida a disfunción de la célula parietal), la secreción afectada de factor intrínseco, con el tiempo causa anemia perniciosa. Los síntomas dispépticos y úlceras gástricas no suelen encontrarse en esta situación. (19,34)

El *H. pylori* es el factor etiológico más importante de la gastritis del antro y del cuerpo gástrico, y la prevalencia de gastritis atrófica en las personas de edad se relaciona con la prevalencia de infección en las primeras décadas de la vida, lo que sugiere que hace progresar la gastritis y con el paso de los años inducir gastritis atrófica. Sin embargo la gastritis atrófica de cuerpo gástrico es baja lo que parece indicar que conlleva a una atrofia y así mismo a la desaparición del microorganismo. (38)

La morfología de la gastritis asociada a *H. pylori* es característica; crónica, con leve o moderada actividad, grado variable a atrofia, presencia de folículos linfoides y de predominio en antro. (27)

La gastritis crónica superficial, la gastritis atrófica y la atrofia gástrica aumentan de frecuencia con la edad, y a veces se asocian con síntomas epigástrico también definido,

Helicobacter pylori

parecido a la úlcera péptica. Las enfermedades que infiltran la pared del estómago.⁽²⁾

Este de gastritis crónica por *H. pylori* no tiene un cuadro clínico característicos, puede haber síntomas vagos como ardor epigástrico, sensación de indigestión, náuseas, intolerancia a los irritantes o un cuadro de mala digestión o dispepsia. Si el paciente desarrolla una úlcera péptica presentará dolor tipo ulcerosa duodenal. Así que podemos decir que su aspecto clínico va desde el paciente asintomático hasta paciente con múltiples síntomas inespecíficos.⁽¹⁾

Las características clínicas de la gastritis agudas son inespecíficas y muchos pacientes pueden estar asintomático. Las náuseas, vómitos y el dolor epigástrico son características clínicas frecuentes. *H. pylori* puede provocar cuadros clínicos de dispepsia, de aparición brusca e histología de gastritis aguda.

ULCERA PEPTICA: Las úlceras pépticas aparecen cuando el ácido clorhídrico y la pepsina del estómago superan las defensas de la mucosa. La protección principal del estómago es una barrera de moco la cual permite que relativamente pocos iones hidrógeno del ácido en el lumen lleguen a la superficie de las células de la mucosa, en el fondo de esta barrera, atrapados contra la superficie de la mucosa, los iones hidrógeno que se diseminan lentamente a través del moco. La eficiencia de esta barrera demuestra mediante la utilización de microelectrodos para observar que el pH de la superficie de la mucosa puede mantenerse de 6 a 7 ante un pH intraluminal de 2.

Otro factor protector es el aporte sanguíneo de la mucosa gástrica (que libera iones bicarbonato así como oxígeno y nutrientes para las células), la capacidad de reparar rápidamente los tejidos lesionados y los elementos ultraestructurales que restringen el promedio de entrada de iones hidrógeno.^(23,41)

Helicobacter pylori

Es la pérdida netamente circunscrita del tejido que reviste las partes del tubo digestivo expuesta al jugo gástrico. Estas son el esófago bajo, la parte superior del intestino, el intestino delgado que contienen glándulas gástricas funcionales. ⁽²⁾

ULCERA DUODENAL: En el duodeno, que carece de barrera de moco, el principal factor protector es el líquido pancreático rico en bicarbonato que es liberado en el duodeno como respuesta a la entrada de material ácido proveniente del estómago.

Las prostaglandinas son esenciales para la defensa de la mucosa ya que incrementa la secreción de moco y de bicarbonato, el riego sanguíneo a la mucosa y retarda la degradación del moco. Al bloquear dichos efectos mediados por prostaglandinas, fármacos como ácido acetilsalicílico y antiinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden lesionar la mucosa. ⁽²³⁾

Esta relacionada con la alteración de la barrera que normalmente impide la irritación y autodigestión de la mucosa por las secreciones gástricas.

Esta asociada en un 95% con la infección por *H. pylori*. Las concentraciones de gastrina en reposo no parecen aumentar. Pero son mayores que las normales y sus células parietales incrementan su respuesta a la gastrina. Este incremento se ha demostrado, por lo menos en parte, debido a la infección de la mucosa antral por *H. pylori*, ya que la hipergastrinemia postprandrial del ulceroso, duodenal disminuye después de la erradicación del microorganismo, pero no existe un descenso en la acidez gástrica. ^(1,38)

H. pylori sólo coloniza en regiones con células mucosas gástricas. Entre un 50% a 70% de individuos sanos y en pacientes con úlcera duodenal se han descrito áreas metaplasia gástrica, es decir, zonas de mucosa gástrica en el bulbo duodenal antecede a la formación de úlcera y *H. pylori* sólo infecta zonas duodenales con metaplasia gástrica. ⁽³⁸⁾

Helicobacter pylori

H. pylori encuentra su hábitat ideal en el moco gástrico en contacto con el epitelio de superficie, que constituye la primera línea de defensa contra los agentes agresivos, principalmente ácido y pepsina. El microorganismo halla en esta barrera sus nutrientes y se defiende de los iones H^+ hidrolizando la urea, logrando así un microentorno alcalino. Además, *H. pylori* degrada el moco gástrico, reduciendo su viscosidad y, por tanto, su capacidad defensiva.

También existen evidencias de que produce citotoxinas que lesionan a las microvellosidades interrumpiendo las uniones intracelulares, lo que debilita la segunda barrera defensiva, y así la posibilidad de aparición de erosiones superficiales y ulceraciones.

Los procedimientos usados en el tratamiento van dirigidos a inhibir la secreción de ácido y a fortalecer la resistencia de la mucosa. Algunos antiácidos son hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio o carbonato de calcio, y el bloqueo de receptores H_2 gástricos con los fármacos cimetidina y ranitidina.

ULCERA GÁSTRICA: Esta asociada en un 75% con la infección por *H. pylori*, pero también tienen relación con la ingesta de aspirinas o antiinflamatorios no esteroideos. Su recesividad es de un 30 % al año y un 50% en dos años. Por lo que se ha propuesto un tratamiento al igual que la úlcera duodenal que es el mantenimiento con bloqueadores H_2 , por lo cual se reduce en un 10% al año y en un 20 % en los dos años.

H. pylori ha sido menos estudiada en úlcera duodenal ya que posiblemente se encuentra en menor porcentaje. ^(1,27,38)

Helicobacter pylori

CANCER GASTRICO: Aunque son muchos factores los que se han asociado con la etiología del cáncer gástrico, incluyendo estado socioeconómico bajo, aumento en la ingesta dietética de sal y alimentos ahumados, aclorhidria crónica por *H. pylori*, alta ingesta de nitratos en la dieta y otros carcinógenos químicos ⁽⁹⁾

Los síntomas del carcinoma gástrico son inespecíficos y aparecen en forma indolente, por lo que su diagnóstico suele ser tardío.

El único tratamiento que puede ser curativo en el adenocarcinoma gástrico es la extirpación quirúrgica, sin embargo en un pequeño porcentaje el paciente con linfomas gástricos la cirugía puede combinarse con quimio y radioterapia. La tasa de éxito del tratamiento para el linfoma es mayor que para el adenocarcinoma. ⁽⁴⁹⁾

PATOLOGIA EN NIÑOS: En países desarrollados la infección es más bien rara en niños y afecta aproximadamente al 20 % de personas menores de 40 años, mientras que en países en vías de desarrollo, la infección es alta desde la niñez, a los cinco años más del 20% de la población está infectada y a los 20 años cerca del 80% de la población ya esta infectada. ⁽³⁵⁾

Los niños infectados con *H. pylori* desarrollan una respuesta inflamatoria y es común encontrar gastritis, que en muchos casos es sintomática. ⁽⁵⁰⁾

La úlcera péptica es muy rara en la niñez y el papel de la infección por *H. pylori* en el dolor abdominal crónico es aún controvertido, sin embargo, algunos reportes recientes sugieren que entre más temprana es la edad de infección, mayor es el riesgo de presentar posteriormente cáncer gástrico. ⁽⁴⁷⁾

Se ha descrito sobre todo en niños, un cuadro clínico de importante pérdida de proteínas por tubo digestivo, asociado a un cuadro histológico de gastritis aguda con presencia de *H.*

Helicobacter pylori

pylori esta asociada con la gastritis crónica especialmente con la antral. La prevalencia de infección aumenta con la edad y las malas condiciones de vida ^(25,55,54)

El dolor abdominal crónico recurrente (DACR), definido por Appley, tradicionalmente se ha considerado como un trastorno funcional y se le ha comparado con síndrome de intestino irritable. En algunos estudios residentes se demostró entre DACR y *H. pylori* en proporción significativa. ^(32,55)

FACTORES DE VIRULENCIA:

Se sabe que la presencia de *H. pylori* en el estómago induce inflamación de la mucosa gástrica y respuesta de anticuerpos locales y sistémicas. No se sabe, sin embargo, mucho sobre la patogénesis de *H. pylori*. El hecho de que sólo unos cuantos de los pacientes infectados desarrollen lesiones gastroduodenales serias, podría deberse entre otras causas a diferencias en la virulencia de las cepas de *H. pylori*. Entre los más sobresalientes son probables factores de virulencia de *H. pylori*.

Es la producción de ureasa, catalasa, proteína "heat shock" de 60 kDa, capacidad de adherirse a mucosa gástrica, presencia del gene *cagA*, lipopolisacáridos, la producción de toxina vacuolizante *vacA* y presencia del gene *cagA*. A continuación se describen en detalle algunos de estos factores. ^(12,31)

CITOTOXINA VACUOLIZANTE: (*VacA*) Un importante factor virulencia de *H. Pylori*, es una citotoxina vacuolizante que induce la formación de vacuolas intracelulares en células eucarióticas *in vitro*. ⁽⁴⁸⁾ La toxina es neutralizada por antisuero (citotoxina associated gene A) específicos de conejo. La actividad citotóxica de *H. pylori* se asocia a la

Helicobacter pylori

presencia de *cagA* un gene que codifica para una proteína antigénica de alto peso molecular designada *cagA*. Aproximadamente del 60 % de las cepas producen esta toxina y esto es correlacionado con la expresión de la actividad de la citotóxina vacuolizante. La toxina generalmente la migra aproximadamente a 120-128kDa. Los pacientes con úlcera péptica tienen cepas de *H. pylori* que tienen una mayor producción de citotoxina que los pacientes con gastritis. ^(8,12)

Esta proteína (prototoxina) incluye una secuencia de señal de 44 aminoácidos en la porción N-terminal la cual es fundamental para la secreción de la toxina.

El dominio señal permanece en la membrana externa una vez que la toxina es secretada resultando en una toxina madura de 95 kDa.

Artherton y colaboradores demostraron que los genes de *vacA* son mosaicos, consistentes de cualquiera de tres secuencias de señal (s1a, s1b, s2) y uno o dos alelos de la región media (m1, m2). Lo anterior es importante pues se sabe que el genotipo *vacA* de una cepa esta asociado con el fenotipo de la citotóxina y su capacidad para inducir úlcera péptica. ⁽⁴⁸⁾ Además se ha mostrado que esta diversidad está relacionada con la función en que los genotipos s1/m1 expresan una incrementada actividad citotóxica *in vitro*, y están asociados con más úlcera péptica en tanto que los genotipos s2/m2 son no citotóxicas ^(2,5,40)

cagA: Otro factor de patogenicidad es el gene asociado con la producción de citotóxina (citotoxin -associated gen *cagA*) que codifica en *H. pylori* una proteína (*cagA*) superficial de un alto peso molecular (120-140 kDa), de función desconocida pero cuya presencia, detectada por la existencia de anticuerpos específicos en suero guarda una fuerte asociación con úlcera duodenal. Un 40 % a 60 % de pacientes con gastritis son asociados con cepas de *H. pylori* *cagA*⁺ comparado con un 80 % en 100 % de pacientes con úlcera duodenal

De esta manera la presencia de cepas *cagA*⁻ es un fuerte marcador de riesgo de enfermedad ulcero-péptica. ⁽⁶⁾

Helicobacter pylori

UREASA: Su actividad se observa en el citoplasma la asociación entre la ureasa y la bacteria es que primero coloniza el moco secretado por la mucosa gástrica, esto es por medio de la hidrólisis de la urea por la producción de amonio con la que neutraliza el pH alrededor de la bacteria esta neutralización hace que *H. pylori* sobreviva. El amonio es tóxico para las células eucarióticas y la enzima tiene un efecto directo, activando leucocitos, monocitos y polimorfonucleares *in vitro*. (6,8,12)

PROTEINA DE CHOQUE TERMICO: Es uno de los factores que inducen la patogénesis de la infección de *H. pylori*. Induce a las células T y Ac al reaccionar con las células humanas y forman un híbrido de 60 HPS y esto puede provocar una reacción autoinmune de las células de la mucosa gástrica. (5,11,12,40)

MOVILIDAD: *H. pylori* cuenta con dos o seis flagelos polares, estos contienen dos tipos de flagelina y genes que codifican (*flaA* y *flaB*) Pero que es esencial en la movilidad es el *flaA*. Además estos flagelos contienen en su membrana proteínas y lipopolisacáridos. Estos también promueven la adhesión. (6,12,14,40,47)

LIPOPOLISACARIDOS: El lipopolisacáridos (LPS) es un componente fundamental de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. En aislados frescos de *H. pylori* se presenta un perfil de LPS liso y en cepas ya con cierto tiempo de colección se presenta un perfil de LPS rugoso. Es una endotoxina inmunomoduladora del sistema inmune, compuesta de una cadena específica y un núcleo de oligosacáridos unido a un lípido. Este último es el responsable de la inmunología y propiedad endotóxica del LPS, en particular el lípido esta involucrado en la adaptación ecológica en la mucosa gástrica por la bacteria, la baja actividad inmunológica del LPS puede dejar a *H. pylori* que sobreviva en la mucosa gástrica. (8)

Helicobacter pylori

El hallazgo de los antígenos Lewis que son expresados sobre una parte de las cadenas laterales de los lipopolisacáridos concuerda con que la molécula de LPS tenga un perfil en su especificidad huésped. ^(12,14)

DIAGNOSTICO:

Los métodos que permiten el diagnóstico de las infecciones por *H. pylori*, se dividen en dos grupos:

Los que requieren de endoscopia y toma de biopsias gástricas (Métodos invasivos) y los que no requieren endoscopias (Métodos no invasivos), que son fundamentalmente técnicas serológicas y prueba de aliento. ^(9,38,47)

Métodos no invasivos	Métodos invasivos
Prueba de aliento	Toma de biopsia ó cultivo de biopsia
Serología	Histología
	Tinción de Gram
	Prueba de ureasa

MÉTODOS INVASIVOS:

Cultivo de biopsia: El cultivo de *H. pylori* de muestras de tejido es un procedimiento especializado de laboratorio; cuando mucho, la sensibilidad es sólo de 80% a 90%. El

Helicobacter pylori

cultivo requiere una atmósfera microaerofílica y medios enriquecidos, agar-sangre ó Skirrow (medio selectivo con antibiótico). El crecimiento es lento apareciendo las pequeñas colonias entre el tercer y séptimo día de incubación. ^(15,38)

Histología: La observación del microorganismo es en los cortes histológicos de biopsias endoscópicas de la mucosa gástrica. La visualización de *H. pylori* se optimiza utilizando tinción de Giemsa o plata de Warthin-Starry esta última es la ideal para evidenciar los gérmenes. Tiene una sensibilidad del 96% ^(15,38)

Tinción de Gram: Esta es mediante una extensión la cual se tiñe, esta es una forma de diagnóstico la cual suele ser sencilla, rápida, económica en cuanto a la presencia de *H. pylori*. Tiene una sensibilidad del 95%. ⁽³⁸⁾

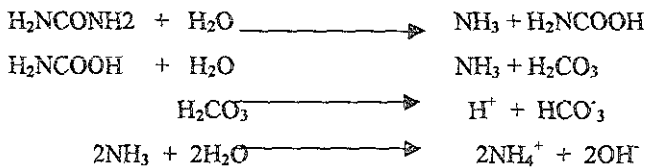
Prueba de ureasa: Una muestra de tejido obtenida con biopsia se coloca en agar gel con urea, buffers (amortiguador) y rojo de fenol (indicadores de pH) En presencia de *H. pylori*, su enzima ureasa degrada la urea del gel a amoníaco y CO₂, el cambio producido es el pH cambia el gel de amarillo a rojo brillante. Tienen una sensibilidad de 89%. ⁽¹⁵⁾

Ya que existen algunos falsos positivos debido a la existencia de otros gérmenes con cierta actividad ureásica. ⁽¹⁵⁾

Hyun Yang et al comparó los altos niveles de amonio en el jugo gástrico y la prueba de CLO test para el diagnóstico de infecciones de *H. pylori*, estudiando 75 sujetos (44 con gastritis crónica, 10 con úlcera gástrica, 6 con úlcera duodenal, 8 con cáncer gástrico y 7 normales) por endoscopia tomaron biopsias para cultivo de *H. pylori* y para la prueba de

Helicobacter pylori

CLO test y jugo gástrico para determinar los niveles de amonio. Los pacientes con cultivo positivo tenían niveles de amonio (13.7 + 5.8 mg/dl) Los cultivos negativos tenían unos niveles de amonio de (4.9 + 2.4 mg/dl), por lo que se consideran que la medición, de los niveles de amonio y jugo gástrico es un método simple, rápido y completo para el diagnóstico de infecciones de *H. pylori*.⁽⁵⁸⁾

**METODOS NO INVASIVOS:**

Prueba de aliento: Un procedimiento menos invasor, basado también en la acción de la ureasa, es la prueba respiratoria de urea. En ayunas, el paciente ingiere una cantidad determinada de urea marcada y con radioisótopos. En presencia de infección estomacal por *H. pylori*, la urea se descompone y el CO₂ marcado se detecta en muestras respiratorias tomadas a intervalos de 30 min. En ausencia de infección, la urea marcada pasa a la orina.⁽⁵⁸⁾

La prueba de aliento con urea marcada con C¹³ y C¹⁴ ofrece un excelente diagnóstico sin la necesidad de toma de biopsia endoscópica. Los pacientes toman una solución conteniendo C¹³ o C¹⁴ de urea marcada, y toma de muestra de aliento por isótopos clasificados, la liberación de CO₂ por *H. pylori* por activación de ureasa, con sensibilidad y especificidad de 90%-100%.⁽²⁹⁾

Helicobacter pylori

Serología: La exposición a *H. pylori* produce la formación de anticuerpos valorables con la técnica del ensayo de inmunoadsorbencia unida a enzima (ELISA). No obstante, ya que los anticuerpos persisten después de erradicado el microorganismo, el resultado positivo no diferencia entre infección pasada o presente. En pacientes asintomáticos, el diagnóstico por serología podría bastar para iniciar el tratamiento, pero se requieren otros métodos (por ejemplo la prueba respiratoria, biopsia) para confirmar la curación. ⁽¹⁵⁾

También se compara con una prueba de seroaglutinación mediante látex (Pyloriset, Orion) pero esta tiene una sensibilidad de 46% y la prueba de ELISA de un 100%. ⁽³⁸⁾

TRATAMIENTO:

La erradicación de *H. pylori* desde el punto de vista la interpretación de los estudios del tratamiento antimicrobiano, su erradicación no es fácil. El tratamiento ideal de erradicación de *H. pylori* aún no se ha conseguido.

Ninguno de los agentes terapéuticos estándar para la úlcera (por ejemplo antagonistas receptores H₂ y el sucralfato) tienen algún efecto sobre *H. pylori*.

Administrado sólo, el bismuto suprime el microorganismo pero provoca una erradicación a largo plazo en más o menos 10% de los pacientes. Se han probado numerosos antibióticos como monoterapia, incluyendo eritromicina, amoxicilina, fluoroquinolonas, tinidazol y metronidazol, pero ninguno ha sido aceptable. El uso de tinidazol o de metronidazol solos ha conducido hacia la resistencia al medicamento en un número sustancial de microorganismos.

Cuando uno de estos nitroimidazoles se combinan con cualquier componente de un bismuto u otro antibiótico (por ejemplo. amoxicilina), la frecuencia de resistencia

Helicobacter pylori

disminuye (pero no desaparece) y los índices de erradicación son de aproximadamente 75%

Algunos investigadores sugieren un triple tratamiento con metronidazol, bismuto y amoxicilina o tetraciclina, aunque no es claro que dicho esquema sea más eficaz que el doble tratamiento. ^(15,44)

Los medicamentos actualmente utilizados son los siguientes:

a)-Bloqueadores de la acidez

1.-Benzoimidazoles sustituidos

-Pantoprazol

-Lanzoprazol

-Omeprazol

2. -Bloqueadores H₂:

-Ranitidina

-Nizatidina

-Famotidina

b)- Antimicrobianos

-Metronidazol

-Tinidazol

-Bismuto

-Tetraciclinas

Helicobacter pylori

- Amoxicilinas
- Claritromicina

La combinación bismuto- amoxicilina- metronidazol es menos eficaz que bismuto-metronidazol- tetraciclinas La sustitución de tetraciclinas con doxicilina compromete la eficacia. ⁽¹⁵⁾

Amoxicilina 1g-Claritromicina 500mg-Pantoprazol u Omeprazol 1 tableta diaria esta combinación se administra cada 12 horas durante 12 días ó Ranitidina 300-150 mg (por día durante 2 años)

Una vez lograda la curación, los índices de reinfección son sorprendentemente bajos. Para úlceras resistentes, sólo la inhibición máxima de ácido con un tratamiento como 20 mg de Omeprazol dos veces al día. ⁽⁵⁰⁾

Actualmente se usan cuatro medicamentos los cuales son tetraciclinas, pantoprazol, metronidazol, y sales de bismuto Un método terapéutico nuevo sugiere que la presencia de adhesinas que se unen a carbohidratos (fructuosa, ác. siálico, etc.) ingiriendo preparados que contengan monosacaridos y disacaridos reconocidos por las adhesinas, pueden ser usados para prevenir el ataque de la bacteria y reducir la colonización. ⁽¹²⁾

Generalmente, los tratamientos consisten en la inhibición de la acidez con un bloqueador de la bomba de hidrogeniones como el Pantoprazol, administrado en una sola dosis por la mañana en ayunas y dos antimicrobianos, como Bismuto más amoxicilina ó Bismuto más tetraciclina ó Metronidazol más Amoxicilina.

Algunos de los esquemas publicados combinan dosis mayores de Omeprazol (hasta 80 mg o 4 cápsulas) y en ocasiones tres antibióticos Estos tratamientos logran una erradicación que varía entre 80 y 95% con duración de la terapéutica entre 10 y 15 días.

CAPITULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios en México han mostrado que la infección múltiple por cepas de *H. pylori* en pacientes con enfermedad ulcero-péptica no es evento raro. La caracterización genotípica de los genes *vacA* con sus respectivos alelos y *cagA* en aislados múltiples de *H. pylori* han contribuido a demostrarlo. Sin embargo es necesaria la confirmación de este hallazgo mediante la genotipificación de estos genes en colonias aisladas

CAPITULO 3

OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS

1) Determinar los genotipo de *cagA*, *vacA* y *picB* en colonias aisladas de *H. pylori* de niños y adultos

2) Determinar la utilidad de la genotipificación de *cagA*, *vacA* y *picB* en colonias aisladas *H. pylori* de niños y adultos para identificar la infección mixta por *H. pylori*.

3) Determinar la frecuencia de los alelos de *vacA* y la presencia de *cagA* y *picB* en colonias aisladas de *H. pylori* de niños y adultos con enfermedad ácido péptica.

HIPOTESIS

La expresión de los genotipos *cagA*, *vacA* y *picB* serán diferentes en colonias aisladas de *H. pylori* de niños y adultos.

CAPITULO 4

DISEÑO DE INVESTIGACION

DISEÑO DE INVESTIGACION

Tipo de estudio

Transversal, comparativo y descriptivo

Población de estudio

Se estudiarán colonias aisladas de *H. pylori* de niños con dolor abdominal recurrente hospitalizados en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI IMSS y colonias aisladas de *H. pylori* de adultos con úlcera duodenal atendidos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS.

Criterios de inclusión

Colonias provenientes de cultivos de biopsias tomadas por endoscopias del tracto digestivo superior por enfermedad ácido péptica, de niños de 1 a 17 años y de adultos de 18 a 90 años.

Criterios de exclusión

Pacientes que hayan recibido algún tipo de antibiótico en el último mes previo a la toma de la endoscopia

Variable dependiente

Frecuencia de infección con colonias aisladas de *H. pylori* de *cagA* positivas determinadas con dos diferentes tipos de primers (335 y 349), frecuencia de alelos de *vacA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos.

Variable independiente

Colonias aisladas de niños y adultos

CAPITULO 5

MATERIAL , EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS**MATERIAL**

- Asas bacteriológicas
- Aplicadores
- Algodón
- Barras magnéticas
- Bolsas de papel
- Cajas petri desechables (Technicare)
- Cajas de plástico para puntas
- Criotubos de 1.5 ml
- Espátulas
- Frascos de diferentes volúmenes
- Gasas
- Gradillas
- Guantes
- Hisopos estériles
- Homogenizadores
- Hielera
- Lápiz diamante
- Matraz Erlenmeyer de 2 L (Pyrex)
- Marcador
- Mechero Bunsen
- Mechero automático (Fireboy)
- Micropipetas automáticas de 10µl, 20µl, 100µl, 200µl (Pipetman)
- Micropipetas automáticas de 0.5-10µl (Labsystems)
- Palillos

Helicobacter pylori

- Pipetas graduadas
- Pinzas de disección
- Porta objetos
- Propipetas (Pipetaid)
- Probetas graduadas (Pyrex)
- Puente de tinción
- Puntas para micropipetas con / sin filtro (Labsystems)
- Tubo eppendorf (Elkay)
- Tubos para PCR (Bio-Rad)
- Vasos de precipitado de 100,250,500,1000 ml (Pyrex)

EQUIPO

- Autoclave (Fehlmex)
- Balanza analítica (Mettler)
- Balanza granataria (Scienteh)
- Campana de flujo laminar (Nuaire)
- Congelador de -20°C (Fisher Scientific)
- Congelador de -70°C (Freezer)
- Estufa con atmósfera microaerofílica (Nuaire)
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech)
- Microscopio óptico (Nikon)
- Microcentrifuga refrigerada
- Parrilla de agitación (Huefer)
- Refrigerador de 2-8°C (Revco)
- Termociclador (Perkin Elmer)

MATERIAL BIOLÓGICO

- Biopsias de antro y cuerpo
- Sangre de carnero

REACTIVOS

- Alcohol al 70% (Merck)
- Agar Brucella (Becton Dickson)
- Agar sangre al 10% con / sin antibiótico
- Solución salina al 0.9%
- Caldo urea
- Caldo brucella con glicerol (Difco)
- Agarosa (Eastman Cámara fotográfica Company)
- Buffer TE (Tris base-EDTA)
- Cloroformo
- Etanol absoluto
- Tris base 1M, pH 8
- Acido clorhídrico
- EDTA (Ácido etilendiamino tetraacético)
- NaOH
- Acetato de amonio 7.5 M
- Tiocianato de guanidina 5M
- Agua inyectable (Pisa)
- Buffer de PCR 10X-MgCl₂ 15 mM
- Mezcla de dNTP 10 mM
- Primers (25µM c/u)

Helicobacter pylori

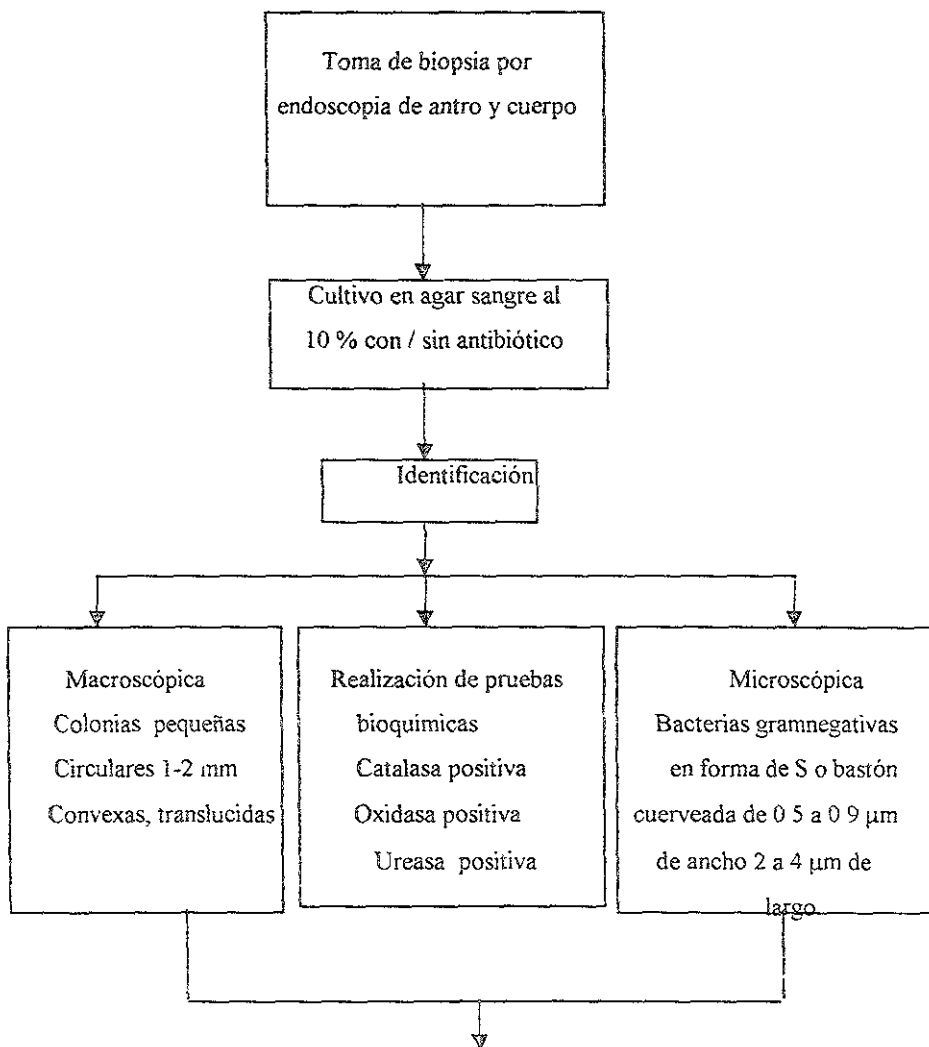
- Taq DNA Polimerasa (5U/ μ l)
- N-Lauroyl-Sarcosine (Sarkacil)
- GES (Isotiocianato de guanidina-EDTA-N-Laurul-Sarcosine)
- Isopropanol (Sigma)
- Bromuro de etidio (1mg/ml)
- TAE (Tris acetatos EDTA)

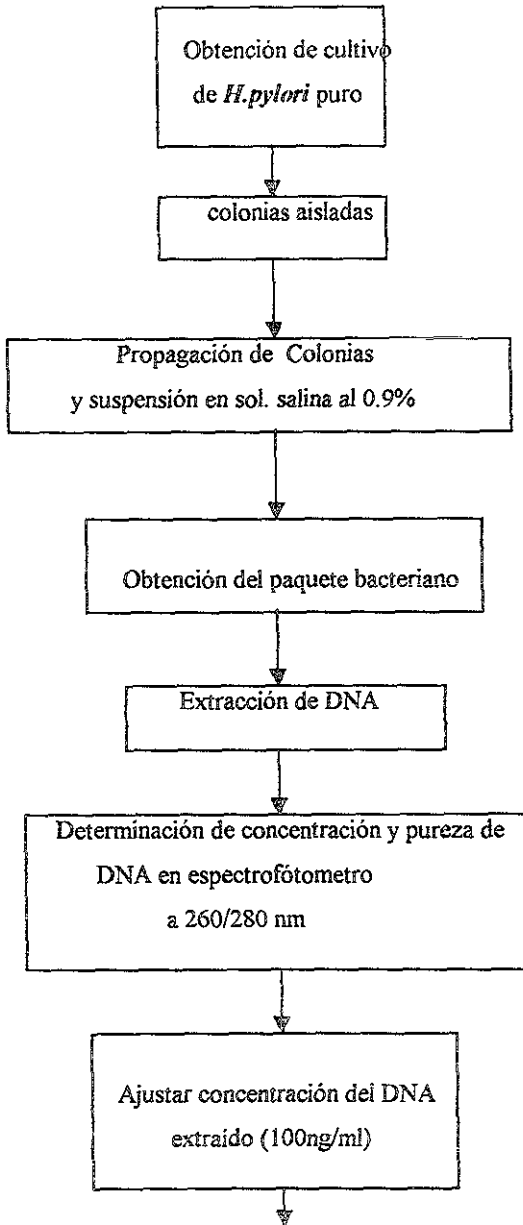
CAPITULO 6

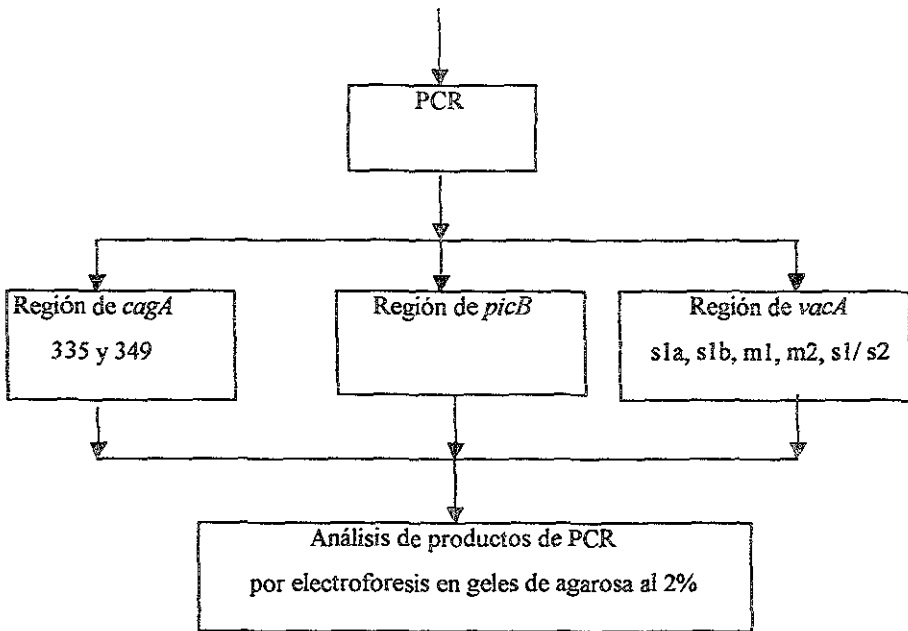
DIAGRAMA DE FLUJO

DIAGRAMA DE FLUJO

Genotipificación de colonias aisladas de *H. pylori* de niños y adultos con enfermedad ácido-péptica.



Helicobacter pylori

Helicobacter pylori

CAPITULO 7

METODO

METODO

I. Obtención de colonias de *H. pylori*.

a)- Obtención de biopsias de antro y cuerpo de pacientes adultos (Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI) y de niños (Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI) con enfermedad gastroduodenal.

b)- Cultivar las biopsias en agar sangre de carnero al 10 % con y sin antibiótico a 37°C, con condiciones microaerofílicas (5 a 6 % de O₂, 7 a 12 % CO₂, 85% de N₂, 8% de H₂ y alta humedad) de 3 a 10 días.

C)- Identificación de *H. pylori*

-Morfologías macroscópicas: *H. pylori* se presenta como colonias pequeñas convexas, translúcidas en agar sangre.

-Morfología microscópica por medio de tinción de Gram:

El procedimiento que el mismo que el utilizado para otras bacterias se describe a continuación:

En un portaobjetos limpio colocar una gota de agua (desionizada) o solución salina posteriormente colocar una colonia con la que se hará una suspensión y extenderla, dejar secar y fijar a calor, colocar el portaobjetos en el puente de tinción, agregar el cristal violeta por un minuto, lavar con agua corriente, agregar lugol por 30 segundos, lavar con agua corriente, decolorar con alcohol acetona y lavar con agua corriente, adicionar safranina durante un minuto y lavar con agua corriente, dejar secar y observar al microscopio con el objetivo de 100X, se observan bacilos gramnegativos en forma de S ó también se observan cocos gramnegativos cuando son cultivos viejos.

*Helicobacter pylori***II.- Obtención de paquete bacteriano.**

- a)- Una vez comprobada la presencia de cultivo puro de *H. pylori* se procede a “ picar ” colonias. Estas se siembran masivamente en agar sangre al 10%, se incuban en condiciones microaerofilicas durante 3 a 10 días.
- b)- Transcurrido este tiempo se comprueba la pureza del crecimiento de *H. pylori* mediante pruebas microscópicas y macroscópicas así como también por pruebas bioquímicas las cuales deben ser catalasa positiva, ureasa positiva y oxidasa positiva
- c)- Una vez comprobada la pureza del cultivo
- d)- Se hace propagación masiva en otras cuatro placas de agar sangre al 10 %.
- e)- Se cosecha el crecimiento de una placa con ayuda de un hisopo y se resuspende en 1.0 ml de solución salina al 0.9%.

III)-. Extracción de DNA**Procedimiento No.1****Métodos de GES modificado para extracción de DNA cromosomal**

- 1)-. Cosechar y resuspender en 1000 μ l de solución salina una placa de un cultivo en sangre de *H. pylori* de 48 a 72 horas ($\sim 1 \times 10^9$ UFC).
- 2)-. Centrifugar en una microcentrifuga a máxima velocidad por 5 minutos.
- 3)-. Desechar sobrenadante y resuspender paquete celular en 100 μ l de TE
- 4)- Adicionar 500 μ l de GES, mezclar gentilmente a temperatura ambiente y colocar en hielo.
- 5)-. Adicionar 250 μ l de la solución de acetato de amonio, previamente enfriada en hielo, mezclar y dejar en hielo por 5 minutos
- 6)- Adicionar 850 μ l de cloroformo, mezclar y centrifugar en microcentrifuga a máxima velocidad por 5 minutos
- 7)- Remover la fase acuosa
- 8)- Adicionar 320 μ l de isopropanol, mezclar, dejar precipitar 5 minutos
- 9)- Centrifugar en microcentrifuga a máxima velocidad por 1 minuto
- 10)- Lavar paquete celular con 800 μ l de etanol al 70%. Centrifugar por 1 minuto.

Helicobacter pylori

11)- Dejar secar 10 minutos en una incubadora a 43 °C

12)- Disolver con 100 µl de TE.

13)- Verificar pureza de DNA mediante electroforesis

Mezclar 5 µl de la muestra con 1 µl de buffer de muestra (Loading buffer), cargar en un gel de agarosa al 2 % y correr a 100 volts sólo el tiempo necesario para observar bandas

14)- Almacenar a -20°C hasta su uso

Procedimiento No.2**Método de ebullición para extracción de DNA cromosomal.**

1)- Preparar una placa de cultivo de *H. pylori* de 48 horas

2)- Preparar una suspensión bacteriana de una placa del cultivo en 500 µl agua desionizada estéril.

3)- Hervir por 10 minutos

4)- Centrifugar en una microcentrífuga a máxima velocidad por 10 minutos

5)- Transferir sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo

6)- Usar inmediatamente o almacenar el sobrenadante de la muestra a -20°C hasta su uso

Helicobacter pylori

IV-. Método de PCR (Método de la reacción en cadena de la polimerasa).

Preparación de la mezcla maestra

1)- Adicionar los siguientes componentes a tubos para PCR estériles colocados en hielo.

Mezcla muestra

Componentes	Volumen por tubo/ μ l	Concentración
Agua desionizada estéril (inyectable)	36 μ l	
Buffer de PCR 10X + MgCl ₂ 15mM	2.5 μ l	1 X - 1.5 mM
Mezcla de dNTP 10 mM	2 μ l	0.2 mM c/u
Mezcla de primers 25 mM c/u	0.5 μ l + 0.5 μ l	0.5 mM
Taq DNA polimerasa (5U/ μ l)	0.25 μ l	0.5 mM
Subtotal	24 μ l	
Templete de DNA	1 μ l	
Total	25 μ l	

Helicobacter pylori

2)- Mezclar los componentes.

3)- Tapar los tubos y centrifugar brevemente (por pulso ~ 3 segundos) en una microcentrifuga para colectar contenidos en el fondo.

4)- Efectuar ciclos de amplificación por PCR como sigue:

a)- Regiones *cagA* 349.

Efectuar 35 ciclos de amplificación.

Modificar	94°C por 1 minuto
Alinear	55°C por 1 minuto
Extender	72°C por 2 minutos
2 holds	
Extender	72°C por 6 minutos
Enfriar	4°C tiempo necesario

b)- Regiones de *cagA* 335

Efectuar 25 ciclos de amplificación.

Desnaturalizar	94°C por 1 minuto
Alinear	46°C por 1 minuto
Extender	72°C por 1 minuto
1 hold	
Enfriar	4°C tiempo necesario.

Helicobacter pylori

c).- Regiones de *vacA*

Efectuar 35 ciclos de amplificación.

Desnaturalizar	94°C por 1 minuto
Alinear	52°C por 1 minuto
Extender	72°C por 1 minuto
2 holds	
Extender	72°C por 6 minutos
Enfriar	4°C tiempo necesario

5).- Mantener la reacción a 4°C. Las muestras pueden ser almacenadas a -20°C hasta su uso.

6).- Analizar los productos de amplificación a través de electroforesis en geles de agarosa al 2 % y visualizarlos por tinción con bromuro de etidio

V)- Tipos de primers utilizados.

Primers oligonucleotidos usados para la tipificación de *cagA*, *vacA* y *picB*.

Gene y región amplificada	Genotipo identificado	Designación de los primers	Secuencia de los primers	tamaño de los productos de PCR
<i>VacA</i> r media	m1	VA3-F VA3-R	5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3' 5'CCATTGGTACCTGTAGAAAAC3'	290
<i>VacA</i> r media	m2	VA4-F VA4-R	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3' 5'CATAACTAGCGCCTTGACAC3'	352
<i>VacA</i> sec señal	s1/s2 ^a	VA1-F VA1-R	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3' 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	259/286 ^a
<i>VacA</i> sec señal	s1a	SS1-F VA1-R	5'GTCAGCATCACACCGCAAC3' 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	190
<i>VacA</i> sec señal	s1b	SS3-F VA1-R	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3' 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	187
<i>VacA</i> sec señal	S2	SS2-F VA1-R	5'GCTAACACGCCAAATGATCC3' 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	199
<i>CagA</i>	<i>CagA</i> ⁻ 349	F1 B1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG3' 5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA3'	349
<i>CagA</i>	<i>CagA</i> ⁻ 335	238 239	5'AAGAAAGGCAAGCAAGCAGAAAA3' 5'ACACAGAAGACAGAGCGTTATT3'	335
<i>PicB</i>	<i>PicB</i> ⁻	101-F 102-R	5'AAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC3' 5'GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC3'	508

*Helicobacter pylori***VI.- Controles.**

Se utilizan controles positivas y negativas dependiendo de la región que se este trabajando, estos controles son de DNA de cepas tipo

Cepa	<i>CagA</i>	<i>sla</i>	<i>s1b</i>	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>s2</i>
8822	-	-	-	-	+	+
8823	+	+	+	+	-	-
84183	+	+	+	-	-	+

VII.- Preparación del gel de agarosa al 2%

- 1)- Se utiliza el buffer TAE a una concentración 1X
- 2)- Se pesa 1 g de agarosa y se agregan 50 ml de buffer (TAE)
- 3)- Se calienta durante 30 minutos agitar y volver a calentar 30 minutos, esto se hace hasta que se observe transparente
- 4)- Se deja enfriar
- 5)- Se vacía en la cámara previamente preparada
- 6)- Se deja hasta formación del gel

Helicobacter pylori

- 7)- Se quita el peine.
- 8)- Se adiciona buffer (TAE 1X) a la cámara hasta que se cubra el gel completamente.
- 9)- Se preparan las muestras se colocan 5µl de los productos de PCR y se mezclan con 2 µl de loading buffer.
- 10)- Se empiezan a cargar las muestras.
- 11)- En el primer pozo se colocan 5 µl de marcador de peso molecular.
- 12)- Se corre el gel a los 100 volts sólo el tiempo necesario para observar bandas.

VIII)- Tinción y observación del gel de agarosa al 2%.

- 1)- Se tiñe el gel con una solución de TAE 1000 ml al cual se le adicionan 150 µl de bromuro de etidio durante 10 minutos
- 2)- Se observa el gel por medio de luz ultravioleta.
- 3)- Se analizan las bandas esto es dependiendo del peso molecular que tenga cada una de las muestras así como también comparándolos con los controles positivos para cada una de las regiones.

Helicobacter pylori

IX)-. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la comparación de la presencia de los alelos de *vacA* y presencia de *cagA* entre las colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos se utilizará el método de chi cuadrada (X^2) dado que nuestra variable es nominal (+ ó -) y tuvimos dos grupos de comparación y nuestras celdillas tuvieron una frecuencia mayor de 5 Utilizamos la chi cuadrada para buscar diferencias, y considerándose significancia estadística con una $p \leq 0.05$.^(5,14)

EJEMPLO.-

Juegos de primers	Niños n=10		Adultos n=9		pX ²
	No.Col. 103	No. (%)	No.Col. 102	No. (%)	
335	76	(74)	83	(81)	0.19
349	59	(57)	97	(95)	<0.001
Cualquiera	78	(76)	102	(100)	<0.001
Ambos	57	(55)	78	(76)	0.0015
No tipificable	25	(24)	0	(0)	<0.001

FORMULA-

$$X^2 = \frac{N(ad - bc - N/2)^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

Helicobacter pylori

Tabla de contingencia de 2 X 2 tenemos que

Para la región de *cagA 335*:

	NIÑOS	ADULTOS	TOTAL
+	76	83	159
-	27	19	46
TOTAL	103	102	205= N

$E = \frac{\text{Total fila} \times \text{total columna}}{\text{Gran total}}$

Gran total

Ejemplo

$$E = \frac{159 \times 103}{205} = 79.888$$

$$E = \frac{159 \times 102}{205} = 79.112$$

$$E = \frac{103 \times 46}{205} = 23.112$$

$$E = \frac{102 \times 46}{205} = 22.888$$

Helicobacter pylori

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$X^2 = \frac{(76 - 79.888)^2}{79.888} + \frac{(83 - 79.112)^2}{79.112} + \frac{(27 - 23.112)^2}{23.112} + \frac{(19 - 22.888)^2}{22.888}$$

$$X^2 = 0.1916 + 0.1910 + 0.6445 + 0.6604$$

$$X^2 = 1.6875$$

SUSTITUYENDO-

$$X^2 = \frac{205 \left(\frac{|(76)(19) - (83)(27)| - 205/2}{(76+27)(83+19)(76+83)(27+19)} \right)^2}{76840884}$$

$$X^2 = \frac{205 (797 - 102.5)^2}{76840884}$$

$$X^2 = \frac{98877781}{76840884}$$

$$X^2 = 1.2868$$

X^2 con valores corregidos de Yates = 1.2868 < X^2 calculada = 1.6875 con un grado de libertad. $P = 0.194$ ^(5,14)

CAPITULO 8

RESULTADOS

RESULTADOS

Características de la población estudiada.

En la tabla No. 1 se muestra las características de la población estudiada, los 10 niños seleccionados presentaron una sintomatología de dolor abdominal recurrente, la edad promedio para este grupo fue de 11 ± 3 años y el radio de mujeres y hombres fue uno a uno. En cuanto a la población de adultos se estudiaron 9 individuos, todos con una sintomatología de úlcera duodenal. Su edad promedio fue de 48 ± 7 años y al igual que en adultos el radio de mujeres y hombres fue uno a uno.

Tabla 1

CARACTERISTICAS	NIÑOS n=10 Dolor abdominal recurrente	ADULTOS n=9 Úlcera duodenal
Edad (Promedio \pm DS)	11 \pm 4	43 \pm 18
Radio F:M	1:1	1:1

F: femenino

M: masculino

Helicobacter pylori

Características de las colonias aisladas de Adultos.

En la tabla No 2 se muestran de manera detallada las características genotípicas de las colonias aisladas de adultos estudiados. También se describen algunas características de los pacientes, como el origen, no de colonia, presentación clínica, edad, sexo, así como si son positivos o negativos para cada una de las regiones estudiadas, *cagA349*, *cagA336*, *picB*, *s1a*, *s1b*, *s2*, *M1*, *m2*, *s1/s2*.

Tabla 2

ID	aislado	origen	colonia	PC	EDAD	SEXO	<i>cagA349</i>	<i>cagA336</i>	<i>picB</i>	<i>s1a</i>	<i>s1b</i>	<i>s2</i>	<i>M1</i>	<i>m2</i>	<i>S1/S2</i>
1	57	A	1	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
2	57	A	2	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
3	57	A	3	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
4	57	A	4	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
5	57	C	1	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
6	57	C	2	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
7	57	C	3	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
8	57	C	4	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
9	57	C	5	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
10	57	C	6	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
11	57	C	7	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
12	57	C	8	UD	35	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
13	59	A	1	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
14	59	A	3	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
15	59	A	4	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
16	59	A	5	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
17	59	A	6	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
18	59	A	7	UD	61	M	+	+	-	-	+	-	+	-	
19	59	A	8	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
20	59	A	9	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
21	59	A	10	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
22	59	A	11	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
23	59	A	12	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
24	59	A	13	UD	61	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
25	65	A	1	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-	
26	65	A	2	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-	
27	65	A	3	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-	
28	65	A	4	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-	

Helicobacter pylori

29	65	A	5	UD	50	F	-	+	+	-	+	-	+	-
30	65	A	6	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
31	65	C	1	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
32	65	C	2	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
33	65	C	4	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
34	65	C	7	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
35	65	C	8	UD	50	F	+	+	+	-	+	-	+	-
36	60	A	1	UG	47	F	+	+	+	+	-	-	-	-
37	60	A	3	UG	47	F	+	+	+	+	-	+	-	-
38	60	C	1	UG	47	F	+	+	+	+	-	-	-	-
39	60	C	2	UG	47	F	+	+	+	+	-	-	-	-
40	60	C	4	UG	47	F	+	+	+	+	-	-	-	-
41	60	C	5	UG	47	F	+	+	+	+	-	+	-	+
42	44V4	A	1	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
43	44	A	2	UD	47	M	+	+	+	-	+	+	+	-
44	44	A	3	UD	47	M	+	-	+	+	+	+	+	-
45	44	A	4	UD	47	M	+	+	+	-	+	+	+	-
46	44	A	6	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
47	44	C	1	UD	47	M	+	+	+	+	+	+	+	-
48	44	C	2	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
49	44	C	3	UD	47	M	-	+	+	+	+	+	+	-
50	44	C	4	UD	47	M	-	+	+	+	+	+	+	-
51	44	C	5	UD	47	M	+	+	+	+	+	+	+	-
52	44	C	6	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
53	44	C	7	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
54	44	C	8	UD	47	M	+	+	+	+	+	-	+	-
55	60V4	A	1	UG	48	F	+	-	+	-	-	-	-	s2
56	60	A	4	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
57	60	A	7	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
58	60	A	8	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
59	60	A	11	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
60	60	A	13	UG	48	F	+	-	-	-	-	+	-	-
61	60	A	14	UG	48	F	+	-	-	-	-	+	-	-
62	60	A	15	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
63	60	A	16	UG	48	F	+	-	-	-	-	+	-	+
64	60	A	19	UG	48	F	+	-	-	-	-	+	-	-
65	60	A	20	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
66	60	C	1	UG	48	F	+	-	+	+	-	+	-	-
67	60	C	3	UG	48	F	+	-	+	+	-	+	-	-
68	60	C	11	UG	48	F	+	-	+	+	-	+	-	-
69	60	C	13	UG	48	F	+	-	-	-	-	+	-	-
70	60	C	22	UG	48	F	+	-	+	-	-	+	-	-
71	87	A	1	GC	40	M	+	+	+	+	+	-	+	-
72	87	A	2	GC	40	M	+	-	-	-	+	-	+	-
73	87	A	3	GC	40	M	+	+	+	+	-	-	+	-
74	87	A	4	GC	40	M	+	+	+	-	+	-	+	-
75	87	A	5	GC	40	M	+	+	+	+	+	-	-	-
76	87	A	6	GC	40	M	+	+	+	+	+	-	+	-
77	87	C	3	GC	40	M	+	+	+	+	-	+	+	-
78	87	C	5	GC	40	M	+	+	-	-	-	-	+	-
79	87	C	7	GC	40	M	+	+	+	-	+	+	+	-
80	87	C	8	GC	40	M	+	+	+	-	+	-	+	-

Helicobacter pylori

81	69	A	1	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
82	69	A	2	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
83	69	A	3	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
84	69	A	4	UD	46	M	-	+	+	+	-	+	+	-	
85	69	A	5	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
86	69	A	6	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	-	-	
87	69	A	7	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
88	69	A	8	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	-	-	
89	69	A	9	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
90	69	A	10	UD	46	M	+	+	+	+	-	+	+	-	
91	69	A	11	UD	46	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
92	69	A	12	UD	46	M	-	+	+	+	-	-	+	-	
93	113	A	2	UD	54	F	+	+	+	+	-	-	-	+	
94	113	A	4	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	-	+	
95	113	A	5	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	-	+	
96	113	A	6	UD	54	F	+	+	+	-	-	-	-	+	s1
97	113	A	7	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	-	-	
98	113	A	8	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	-	-	
99	113	C	1	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	-	+	
100	113	C	5	UD	54	F	+	+	+	-	-	-	-	+	s1
101	113	C	6	UD	54	F	+	+	+	-	-	+	+	-	
102	113	C	7	UD	54	F	+	+	+	-	-	-	-	+	s1

ID- Número consecutivo

Aisla- Número de que se le da al aislado o paciente

Orige-. Origen de la muestra [antro (A) y cuerpo (C)].

Col-. Número de la colonia estudiada

PC-. Presentación clínica

Se- Sexo

ED- Edad

cagA349- Región de cagA 349

cagA335- Región de cagA 335

pic- Alelo de la región de vacA (picB).

s1a- Alelo de la región de vacA (s1a).

s1b- Alelo de la región de vacA (s1b)

s2- Alelo de la región de vacA (s2)

m1- Alelo de la región de vacA (m1)

m2- Alelo de la región de vacA (m2)

s1/s2- Alelo de la región de vacA (s1/s2)

+ - Cuando se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para cada una de las regiones estudiadas

- - Cuando no se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para cada una de las regiones estudiadas

V4- Son colonias de pacientes reinfectados

Helicobacter pylori

Características de colonias aisladas de Niños.

En la tabla No 3 se muestran de manera detallada las características genotípicas de las colonias aisladas de niños estudiados. También se describen algunas características de los pacientes como el origen, no de colonia, PC, edad, sexo, así como si son positivos o negativos para cada una de las regiones estudiadas, cag349, cag335, picB, s1a, s1b, s2, m1, m2, s1/s2.

la edad, sexo, etc

Tabla 3

ID	aislado	PC	origen	colonia	EDAD	SEXO	cagA349	cagA335	PicB	s1a	s1b	s2	m1	m2	S1/S2
1	281	DA	C	1	12	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
2	281	DA	C	3	12	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
3	281	DA	C	8	12	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
4	281	DA	A	1	12	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
5	281	DA	A	2	12	M	+	+	+	+	-	-	+	-	
6	281	DA	A	3	12	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
7	281	DA	A	4	12	M	+	-	+	-	+	-	+	-	
8	307	DA	A	1	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
9	307	DA	A	2	11	M	-	+	+	-	+	-	+	-	
10	307	DA	A	3	11	M	+	-	+	-	+	-	+	-	
11	307	DA	C	1	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
12	307	DA	C	2	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
13	307	DA	C	3	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
14	307	DA	C	4	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
15	307	DA	C	5	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
16	307	DA	C	6	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
17	307	DA	C	7	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
18	307	DA	A	8	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
19	307	DA	A	6	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
20	263	DA	A	4	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
21	263	DA	A	5	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
22	263	DA	A	6	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	-
23	263	DA	A	7	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
24	263	DA	A	8	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
25	263	DA	A	9	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
26	263	DA	A	10	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
27	263	DA	A	11	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1
28	263	DA	A	12	9	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s1

Helicobacter pylori

29	263	DA	A	14	9	F	-	+	+	-	-	-	-	-	s1
30	262	DA	C	2	15	F	-	-	-	-	-	-	+	-	s1
31	262	DA	C	8	15	F	-	-	-	-	-	+	+	-	s2
32	262	DA	C	10	15	F	-	-	-	-	-	-	+	-	s1
33	262	DA	C	11	15	F	-	-	-	-	-	-	+	-	s1
34	262	DA	C	12	15	F	-	-	-	-	-	-	+	-	s1
35	262	DA	C	13	15	F	-	-	-	-	+	-	+	-	
36	92	DA	A	1	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
37	92	DA	A	2	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
38	92	DA	A	3	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
39	92	DA	A	4	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
40	92	DA	A	5	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
41	92	DA	A	6	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
42	92	DA	A	7	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
43	92	DA	A	8	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
44	92	DA	A	9	14	F	-	+	+	-	+	-	+	-	
45	92	DA	A	10	14	F	-	+	+	-	-	-	+	-	s1
46	72	DA	A	1	14	F	-	-	-	+	-	-	-	+	
47	72	DA	A	2	14	F	-	-	-	+	-	-	-	+	
48	72	DA	A	3	14	F	-	-	-	-	-	-	-	+	s1
49	72	DA	A	4	14	F	-	+	+	-	-	-	-	+	s1
50	72	DA	A	5	14	F	-	-	-	+	-	-	+	+	
51	72	DA	A	6	14	F	-	-	-	+	-	-	-	+	
52	72	DA	A	7	14	F	-	-	-	+	-	-	-	+	
53	72	DA	A	8	14	F	-	-	-	+	-	-	-	+	
54	72	DA	A	9	14	F	-	-	-	+	-	-	-	-	
55	72	DA	A	10	14	F	-	-	-	-	-	-	-	+	s1
56	64	DA	C	1	10	F	+	+	+	-	-	-	-	-	s1
57	64	DA	C	2	10	F	-	+	+	-	-	-	+	-	s1
58	64	DA	C	3	10	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s2
59	64	DA	C	4	10	F	+	+	+	-	-	-	+	-	s2
60	64	DA	C	5	10	F	+	+	+	+	-	-	-	-	
61	64	DA	C	6	10	F	-	+	+	+	-	-	+	-	
62	64	DA	C	7	10	F	+	+	+	+	-	-	+	-	
63	64	DA	C	8	10	F	+	+	+	+	-	-	+	-	
64	64	DA	C	9	10	F	-	+	+	+	-	-	+	-	
65	64	DA	C	10	10	F	-	+	+	+	-	-	+	-	
66	64	DA	C	11	10	F	-	+	+	+	-	-	+	-	
67	64	DA	C	12	10	F	-	+	+	+	-	-	+	-	
68	128	DA	A	1	15	F	-	-	-	-	-	-	+	+	s1
69	128	DA	A	2	15	F	-	-	-	-	-	-	-	+	s1
70	128	DA	A	3	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
71	128	DA	A	4	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
72	128	DA	A	5	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
73	128	DA	A	6	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
74	128	DA	A	7	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
75	128	DA	A	8	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
76	128	DA	A	9	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
77	128	DA	A	10	15	F	-	-	-	-	-	+	-	+	
78	329	DA	A	1	11	M	+	+	+	+	+	+	+	-	
79	329	DA	A	2	11	M	+	+	+	+	+	+	+	-	
80	329	DA	A	4	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	

Helicobacter pylori

81	329	DA	A	6	11	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
82	329	DA	A	7	11	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
83	329	DA	A	8	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
84	329	DA	A	9	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
85	329	DA	A	10	11	M	+	+	+	+	+	+	+	-	
86	329	DA	A	11	11	M	+	+	+	+	+	+	+	-	
87	329	DA	A	12	11	M	+	+	+	-	+	+	+	-	
88	329	DA	A	13	11	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
89	329	DA	A	14	11	M	+	+	+	-	+	+	+	-	
90	329	DA	A	15	11	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
91	345	DA	A	1	8	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
92	345	DA	A	2	8	M	+	+	-	-	+	-	+	-	
93	345	DA	A	3	8	M	+	+	-	+	+	-	+	-	
94	345	DA	A	5	8	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
95	345	DA	C	1	8	M	+	+	+	-	+	-	-	-	
96	345	DA	C	2	8	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
97	345	DA	C	3	8	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
98	345	DA	C	5	8	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
99	345	DA	C	6	8	M	+	+	+	+	+	-	+	-	
100	323	DA	C	1	7	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
101	323	DA	C	2	7	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
1020	323	DA	C	3	7	M	+	+	+	-	+	-	+	-	
103	323	DA	C	5	7	M	+	+	+	-	+	-	+	-	

ID- Número consecutivo.

Aisla- Número de que se le da al aislado o paciente.

Orige- Origen de la muestra [antro (A) y cuerpo (C)].

Col- Número de la colonia estudiada.

PC- Presentación clínica.

Se- Sexo

ED- Edad

cagA349- Región de cagA 349.

cagA335- Región de cagA 335.

pic- alelo de la región de vacA (picB).

s1a- Alelo de la región de vacA (s1a).

s1b- alelo de la región de vacA (s1b).

s2- Alelo de la región de vacA (s2).

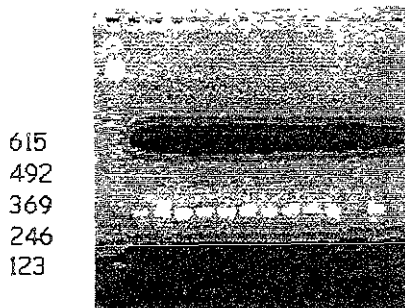
m1- Alelo de la región de vacA (m1).

m2- Alelo de la región de vacA (m2).

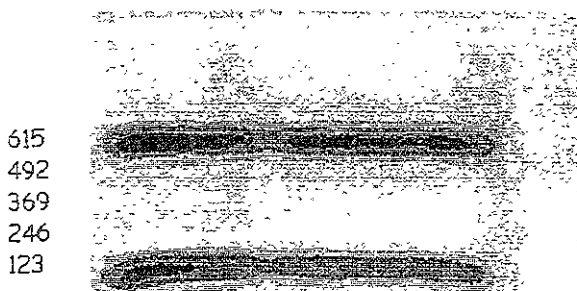
s1/s2- Alelo de la región de vacA (s1/s2).

+- Cuando se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para cada una de las regiones estudiadas.

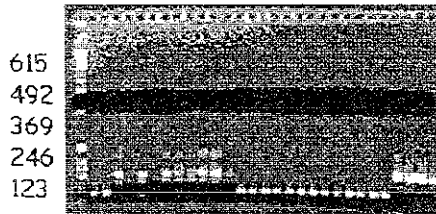
- - Cuando no se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para cada una de las regiones estudiadas.

Helicobacter pylori

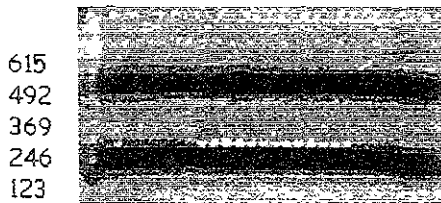
Muestras positivas para la region cag A 335 ya que presentan un tamaño de producto de 335 bp



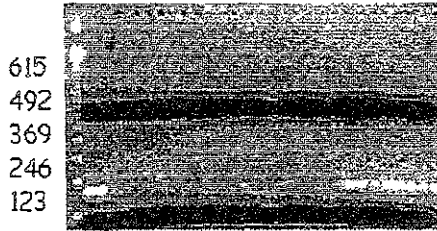
Muestras positivas para la region cag A 349 ya que presentan un tamaño de producto de 349 bp

Helicobacter pylori

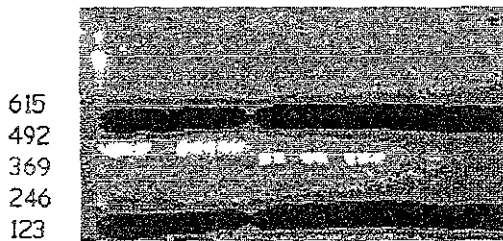
Muestras positivas para la region s el alelo s1a ya que presentan un tamaño de producto de 190 bp



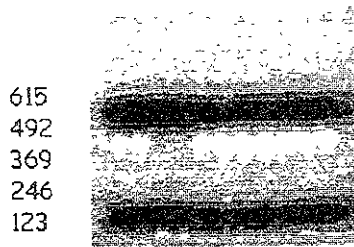
Muestras positivas para la region s el alelo s1b ya que presentan un tamaño de producto de 187 bp

Helicobacter pylori

Muestras positivas para la region s el alelo s2 ya que presentan un tamaño de producto de 199 bp



Muestras positivas para la region m el alelos m1 y m2 ya que presentan un tamaño de producto de 290 para m1 y 352 para m2

Helicobacter pylori

Muestras positivas para la region picB ya que presentan un tamaño de producto de 508 bp

*Helicobacter pylori*Genotipos de *vacA* y *cagA* encontrados en colonias aisladas de adultos.

En la tabla No 4 se describen los diferentes patrones de genotipos que se encontraron en los nueve pacientes con colonias aisladas de adultos se encontraron alrededor de 2 a 8 patrones diferentes por paciente

Tabla 4

No	Paciente	Patrón	CagA349	CagA335	pitB	s1a	s1b	s2	m1	m2
1	57	1	+	+	+	-	+	-	-	-
		2	+	+	+	-	+	-	+	-
2	59	1	+	+	-	-	+	-	+	-
		2	+	+	+	-	+	-	+	-
		3	+	+	+	-	+	-	-	+
3	65	1	-	+	+	-	+	-	+	-
		2	+	+	+	-	+	-	+	-
4	44v4	1	+	-	+	+	+	-	+	-
		2	+	+	+	-	+	+	+	-
		3	+	-	+	+	+	+	+	-
		4	-	+	+	+	+	+	+	-
		5	+	+	+	+	+	-	+	-
		6	+	+	+	+	+	+	+	-
5	60	1	+	+	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	+	-	+	-	-
		3	+	+	+	+	-	+	-	+
6	60v4	1	+	-	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	+	-	-
		3	+	-	+	-	-	+	-	-
		4	+	-	-	-	-	+	-	+
		5	+	-	+	+	-	+	-	-
7	87	1	+	+	+	+	+	-	+	-
		2	+	-	-	-	+	-	+	-
		3	+	+	+	+	-	-	+	-
		4	+	+	+	+	-	+	+	-

Helicobacter pylori

		5	+	+	+	+	+	-	-	-
		6	+	+	+	-	+	+	+	-
		7	+	+	+	-	+	-	+	-
		8	+	+	-	-	+	-	+	-
8	69	1	+	+	+	+	-	+	+	-
		2	-	+	+	+	-	+	+	-
		3	+	+	+	+	-	+	-	-
		4	+	+	+	+	-	-	+	-
		5	-	+	+	+	-	-	+	-
9	113	1	+	+	+	+	-	-	-	+
		2	+	+	+	-	-	+	-	+
		3	+	+	+	-	-	-	-	+
		4	+	+	+	-	-	+	-	-
		5	+	+	+	-	-	+	+	-

No- Numero consecutivo

Paciente- Número correspondiente del paciente.

Patron- Número que se presentan en los pacientes y las colonias.

cagA349- Región de cagA 349 positivo o negativo.

cagA335- Región de cagA 335 positivo o negativo

pic- alelo de la región de vacA (picB) positivo o negativo

s1a- alelo de la región de vacA (s1a) positivo o negativo

s1b- alelo de la región de vacA (s1b) positivo o negativo.

s2- alelo de la región de vacA (s2) positivo o negativo.

m1- alelo de la región de vacA (m1) positivo o negativo

m2- alelo de la región de vacA (m2) positivo o negativo.

s1/s2- alelo de la región de vacA (s1/s2) positivo o negativo.

+- Cuando se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para cada una de las regiones estudiadas

-- Cuando no se presenta el mismo peso molecular con respecto ala muestra positiva para

V4- Son colonias de pacientes reinfectados

Helicobacter pylori

En esta tabla No 4A se muestra el número del paciente el número de colonias aisladas de ese paciente (adultos) así como también el número de patrones que se presentaron para ese mismo pacientes.

TABLA 4A

No.	Paciente	No. Col.	PATRÓN
1	57	12	2
2	59	12	3
3	65	11	2
4	60	6	6
5	44V4	13	3
6	60V4	16	5
7	87	10	8
8	69	12	5
9	113	10	5

No. Número consecutivo

Paciente- Número del paciente

No.col- Número de colonias aisladas por paciente

Patrón - Número de patrones encontrados

Helicobacter pylori

En la tabla No. 4B se presenta el número de paciente (adultos) así como también el número de colonias aisladas por cada paciente de los cuales fueron 9 pacientes estudiados y en total se estudiaron 103 colonias, por cada paciente se tienen alrededor de 6 a 16 colonias y el número de patrón es de 2 a 8 diferentes patrones y el número de colonias que presentan el mismo patrón encontrado.

TABLA 4B

No	Paciente (No.)	Patrón	No Col
1	57(12)	1	1
		2	11
2	59(12)	1	1
		2	9
		3	2
3	65 (11)	1	1
		2	10
4	60(6)	1	4
		2	1
		3	1
5	44(13)	1	1
		2	2
		3	1
		4	2
		5	5
		6	2
6	60V4 (16)	1	1
		2	4
		3	7

No	Paciente (No.)	Patrón	No Col
7	87 (10)	4	1
		5	3
		1	2
		2	1
		3	1
		4	1
8	69(12)	5	1
		6	2
		7	1
		8	1
		1	7
		2	1
		3	2
		4	1
		5	1
		6	1
9	113(10)	1	1
		2	3
		3	3
		4	2
		5	1

No.-. Número consecutivo.

Paciente.-. Número correspondiente del paciente.

Patrón.-. Número que se presentan en los pacientes y las colonias

No. Colo.-. Número de colonias que presenta cada patrón

V4- Son colonias de pacientes reinfectados

NOTA: Los números encerrados en paréntesis, significan el número de colonias estudiadas en el paciente

*Helicobacter pylori***Genotipos de *vacA* y *cagA* encontrados en colonias aisladas de niños.**

En la siguiente tabla se describen los diferentes patrones de genotipos que se encontraron en los diez pacientes con colonias aisladas de niños, se encontraron alrededor de 2 a 6 patrones diferentes por cada paciente.

Tabla 5

No.	Paciente	patrón	CagA349	CagA335	picB	s1a	s1b	s2	m1	m2
1	281	1	+	-	+	-	+	-	+	-
		2	+	+	+	-	+	-	+	-
		3	+	+	+	+	-	-	+	-
2	307	1	+	-	+	-	+	-	+	-
		2	+	+	+	-	+	-	+	-
3	263	1	+	-	+	-	-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-	+	-
4	262	1	-	-	-	-	-	-	+	-
		2	-	-	-	-	+	-	+	-
5	92	1	-	+	+	-	-	-	+	-
		2	-	+	+	-	+	-	-	-
		3	-	+	+	-	+	-	+	-
6	72	1	-	-	-	-	-	-	-	+
		2	-	-	-	+	-	-	-	-
		3	+	-	+	-	-	-	-	+
		4	-	-	-	+	-	-	-	+
		5	-	-	-	+	-	-	+	+
7	64	1	-	+	+	-	-	-	+	-

No.	Paciente	patrón	CagA34	CagA	picB	s1a	s1b	s2	m1	m2	
		2	-	+	+	+	-	-	+	-	
		3	+	+	+	-	-	-	-	-	
		4	+	+	+	-	-	-	-	+	-
		5	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		6	+	+	+	+	-	-	-	+	-
		8	128	1	-	-	-	-	-	+	-
		2	-	-	-	-	-	-	+	+	
		3	-	-	-	-	-	-	-	+	
		9	329	1	+	+	+	+	+	+	-
		2	+	+	+	+	+	-	+	-	
		3	+	+	+	-	+	-	+	-	
		4	+	+	+	-	+	+	+	-	
10	345	1	+	+	+	-	+	-	+	-	
		2	+	+	-	-	+	-	+	-	
		3	+	+	-	+	+	-	+	-	
		4	+	+	+	+	+	-	+	-	
		5	+	+	+	-	+	-	-	-	

No.- Número consecutivo

Paciente- Número correspondiente del paciente

Patrón-. Número que se presentan en los pacientes y las colonias

cagA349- Región de cagA 349 positivo o negativo

Helicobacter pylori

cagA335- Región de cagA 335 positivo o negativo
pic- alelo de la región de vacA (picB) positivo o negativo.
s1a- Alelo de la región de vacA (s1a) positivo o negativo.
s1b- alelo de la región de vacA (s1b) positivo o negativo.
s2- Alelo de la región de vacA (s2) positivo o negativo.
m1- alelo de la región de vacA (m1) positivo o negativo
m2- Alelo de la región de vacA (m2) positivo o negativo.
s1/s2- Alelo de la región de vacA (s1/s2) positivo o negativo

En la tabla No. 5A se muestra el número del paciente, el número de colonias aisladas de ese paciente (niños) así como también el número de patrones que se presentaron para ese mismo pacientes.

Tabla 5A

No.	Paciente	No. Col.	No. patrones
1	281	7	3
2	307	12	2
3	263	10	2
4	262	6	2
5	92	10	3
6	72	10	5
7	64	12	6
8	128	10	3
9	329	13	4
10	345	9	5

No. Número consecutivo

Paciente- Número del paciente

No.col- Número de colonias aisladas por paciente.

No. Patrones número de patrones encontrados por pacientes.

Helicobacter pylori

En la tabla No 5B se presenta el número de paciente (niños) los cuales fueron 10, así como también el número de colonias aisladas las cuales fueron 102 colonias, se tienen de 6 a 13 colonias por cada paciente, el número de patrón es de 2 a 6 diferentes patrones y el número de colonias que se presentan el mismo patrón encontrado

TABLA 5B

No	Paciente (No. colonias)	Patrón	No. colonias
1	281 (7)	1	1
		2	1
		3	5
2	307(12)	1	2
		2	10
3	263(10)	1	1
		2	9
4	262(6)	1	5
		2	1
5	92(10)	1	1
		2	1
		3	8
6	72(10)	1	2
		2	1
		3	1
		4	4
7	64(12)	5	2
		1	1

No	Paciente (No. Colonias)	Patrón	No. colonias
		2	5
		3	1
		4	2
		5	1
		6	2
		8	128(10)
9	329(13)	2	1
		3	1
		1	3
		2	4
10	345(9)	3	4
		4	2
		1	3
		2	1
		3	1
		4	3
		5	1

No- Número consecutivo

Paciente- Número correspondiente del paciente

Patrón-. Número que se presentan en los pacientes y las colonias

No. Colo.- Número de colonias que presenta cada patrón

Frecuencia de alelos de *vacA* en colonias de *H. pylori* aislados de niños y adultos de México.

En la tabla No. 6 se presenta la frecuencia de los alelos de *vacA* en colonias aisladas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos, para la región de s1a y s1b, en las colonias aisladas de niños y adultos se presentan casi de igual forma no se encuentra significancia, para la región de s2 se presenta significancia en colonias aisladas de *H. pylori* de adultos que de colonias aisladas de *H. pylori* de niños (región s2 $p < 0.001$). Para la región de s1/s2 se presenta significativamente con mayor frecuencia el s1 de colonias aisladas de *H. pylori* de niños que en colonias aisladas de *H. pylori* de adultos y casi de igual forma se presenta la frecuencia para la región de s2 para los dos casos, la región de s1/s2 solo se realizó para colonias aisladas que no se tipificaron con los otros tipos de primers y no para todas las colonias, sin embargo no todas las colonias se pudieron tipificar, en las colonias aisladas de niños dos colonias que no tipificaron, para el caso de colonias aisladas de adultos todas las colonias se pudieron tipificar

En cuanto a la región media el alelo de m1 se presenta casi de igual forma para colonias aisladas de niños y de adultos, solo que persiste la incidencia en colonias aisladas de niños, para el alelo de m2 las colonias aisladas de niños es significativamente más frecuentes que en colonias aisladas de adultos, y con lo que respecta a las no tipificables es significativamente más frecuente en colonias aisladas de adultos

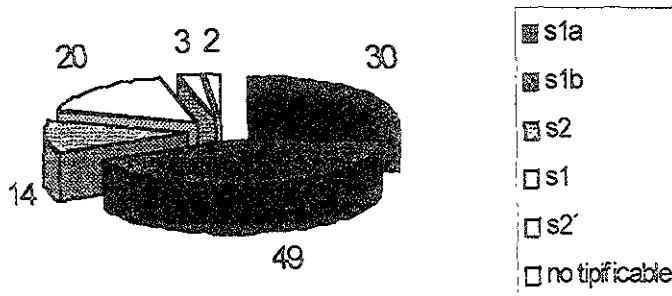
Helicobacter pylori

Tabla 6

Alelos	Niños n=10		Adultos n=9		pX ²
	No.Col. 103	No. (%)	No.Col. 102	No. (%)	
region s					
s1a	31	(30)	38	(37)	0.28
s1b	50	(49)	56	(55)	0.36
s2	14	(14)	42	(41)	<0.001
s1/s2	21/3	(20)/(3)	3/1	(3)/(1)	<0.001/0.32
s No tipificable	2	(2)	0	(0)	0.16
region m					
m1	80	(78)	64	(63)	0.02
m2	19	(18)	12	(12)	<0.001
m no tipificable	6	(6)	26	(25)	<0.001

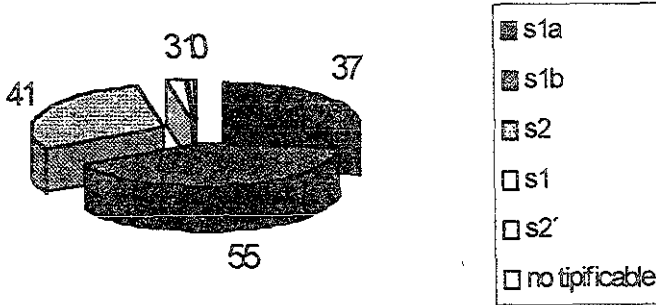
X² chi cuadrada $\alpha \leq 0.05$

COLONIAS DE NIÑOS PARA LA REGION S

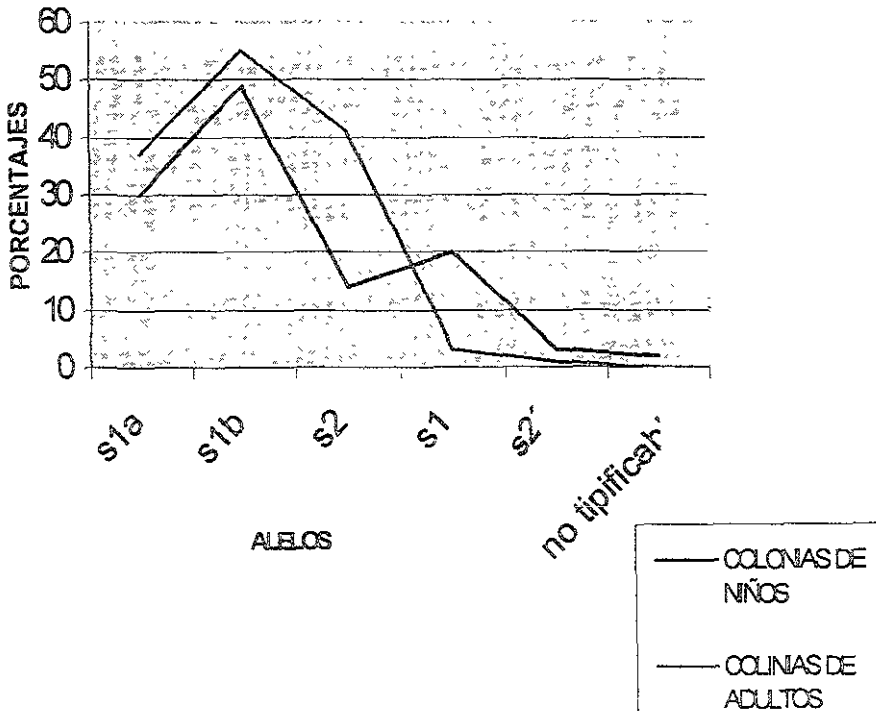


Helicobacter pylori

COLONIAS DE ADULTOS PARA LA REGION S

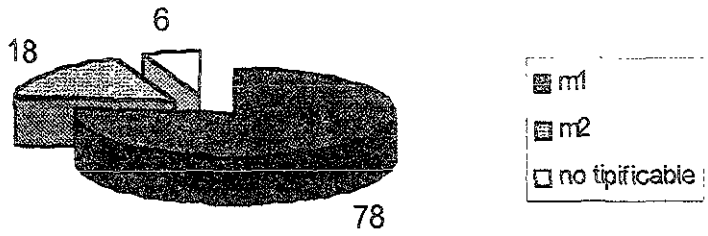


COMPARACION PARA LA REGION S



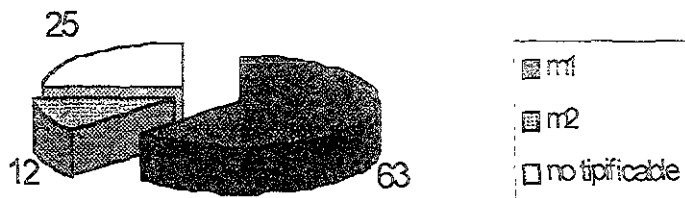
Helicobacter pylori

COLONIAS DE NIÑOS PARA LA REGION m



COLONIAS DE ADULTOS PARA LA REGION

m



Helicobacter pylori

Frecuencia de infección con aislados de *cagA*⁺ determinados con dos diferentes tipos de primers en colonias de *H. pylori* aislados de niños y adultos de México.

En la tabla No 7 se muestra la frecuencia de infección de aislados de *cagA*⁺ determinados con dos diferentes tipos de primers que corresponden al tipo que da 335 bp y el tipo de 349 bp para colonias aisladas de *H. pylori* de niños y adultos de la población Mexicana, para el alelo de *cagA* 335 se encontraron casi de igual forma aunque en colonias aisladas de adultos en mayor el número de colonias que se encontraron, para la región de *cagA* 349 es significativamente mayor en colonias de *H. pylori* aisladas de adultos que de niños, también se presenta una significancia mayor para colonias aisladas de adultos que se encontraron con cualquiera y ambos de los dos tipos de primers, para el tipo que no son tipificables se encontraron con mayor frecuencia en colonias aisladas de niños

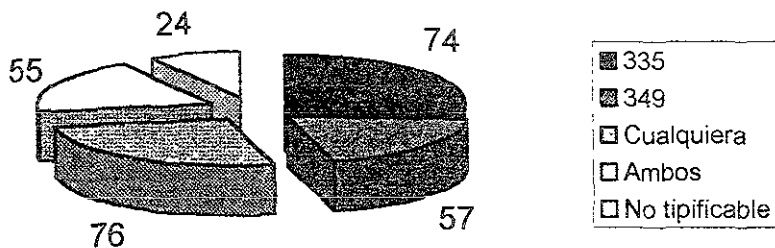
Tabla 7

Juegos de primers	Niños n=10		Adultos n=9		pX ²
	No.Col. 103	No. (%)	No.Col. 102	No. (%)	
335	76	(74)	83	(81)	0.19
349	59	(57)	97	(95)	<0.001
Cualquiera	78	(76)	102	(100)	<0.001
Ambos	57	(55)	78	(76)	0.0015
No tipificable	25	(24)	0	(0)	<0.001

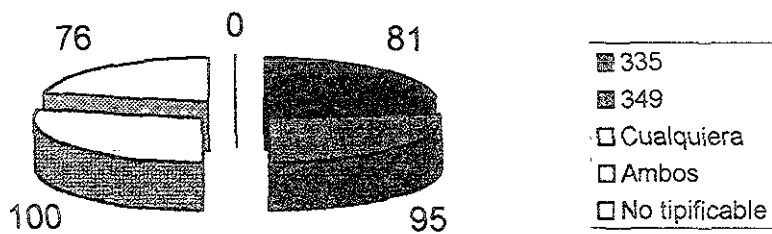
X² chí cuadrada $\alpha \leq 0.05$

Helicobacter pylori

COLONIAS DE NIÑOS PARA LA REGION cagA

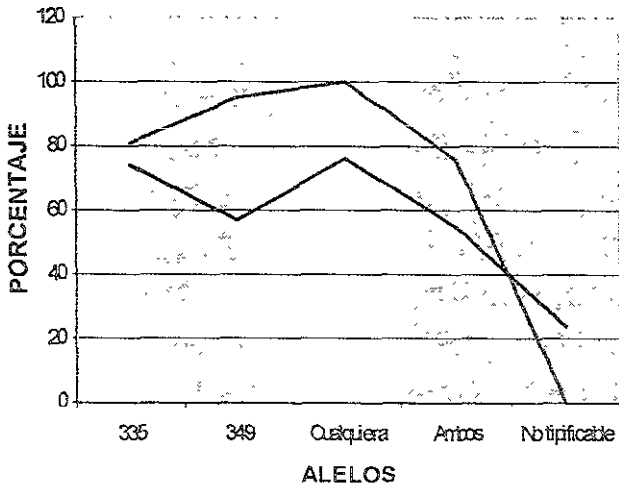


COLONIAS DE ADULTOS PARA LA REGION cagA



Helicobacter pylori

COMPARACION PARA LA REGION cagA



— COLONIAS DE NIÑOS
— COLONIAS DE ADULTOS

Relación de la combinación *picB* y *cagA* en colonias de *H. pylori* aislados de niños y adultos de México.

En la tabla No. 8 se presenta la relación de la combinación *picB* y *cagA* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos Mexicanos, se muestra que no hay relación entre las colonias aisladas de niños y adultos que presenten la combinación *picB*⁻/*cagA*⁻ en cambio para la combinación *picB*⁺/*cagA*⁺ si se encontraron con mucho más frecuencia en adultos que en niños y para la combinación de *picB*⁻/*cagA*⁺ se encontraron de igual forma tanto para colonias de niños como para colonias de adultos, para la combinación *picB*⁺/*cagA*⁻ solo se presenta en colonias aisladas de niños y para la combinación *picB*⁻/*cagA*⁺ la frecuencia es significativamente mayor en colonias aisladas de niños con respecto a las colonias aisladas de adultos

Tabla 8

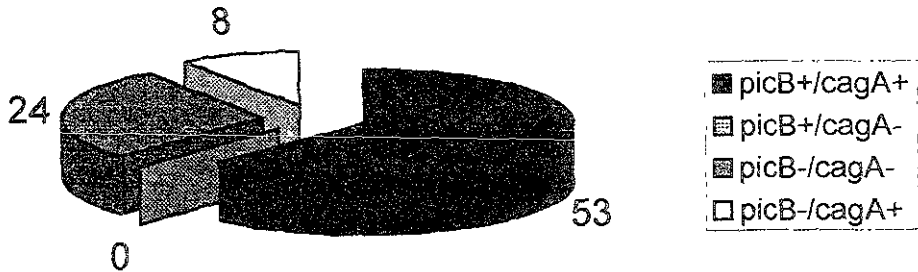
Combinación <i>picB-cagA</i>	Niños n=10		Adultos n=9		pX ²
	No.Col.103	No. (%)	No.Col. 102	No. (%)	
<i>picB</i> ⁻ / <i>cagA</i> ⁻	55	(53)	76	(75)	0.0017
<i>picB</i> ⁺ / <i>cagA</i> ⁻	0	(0)	0	(0)	0.0
<i>picB</i> ⁻ / <i>cagA</i> ⁺	25	(24)	0	(0)	<0.001
<i>picB</i> ⁺ / <i>cagA</i> ⁺	8	(8)	2	(2)	0.0537

¹ definido en cualquiera de los dos juegos de primers usados.

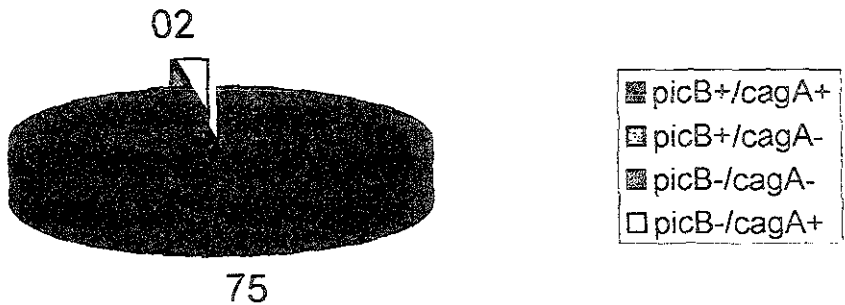
X² chi cuadrada $\alpha \leq 0.05$

Helicobacter pylori

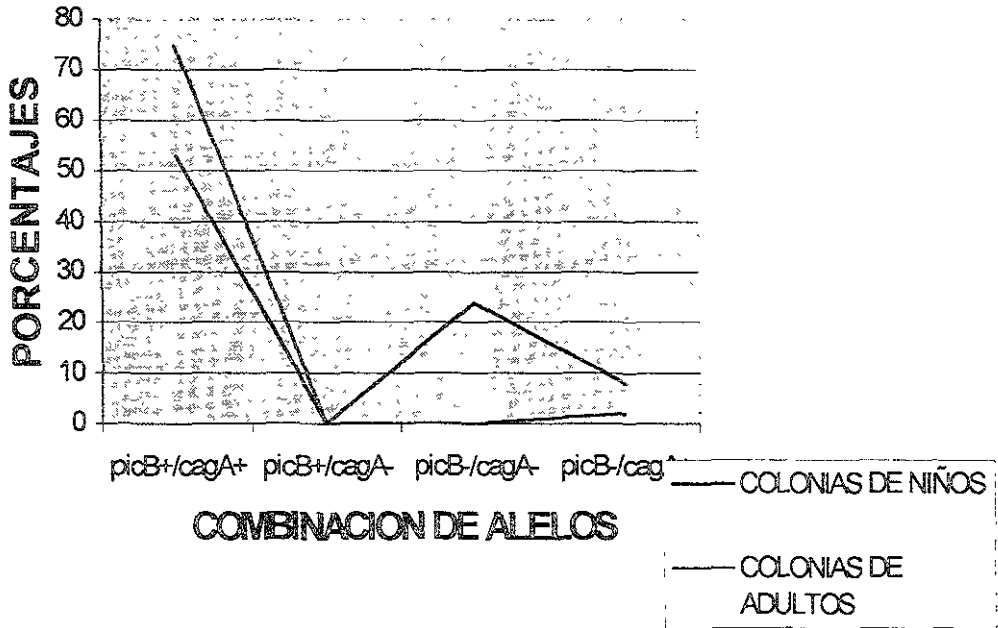
COLONIAS DE NIÑOS PARA LA COMBINACION picB-cagA



COLONIAS DE ADULTOS PARA LA COMBINACION picB-cagA



COMPARACION PARA LA COMBINACION DE *picB*-*cagA*



CAPITULO 9

DISCUSION

DISCUSION

Aunque la infección con múltiples cepas de *H. pylori* ha sido descrita con anterioridad la mayor parte de los pacientes son infectados por un sólo tipo de cepa. Sin embargo, en países en vías de desarrollo la infección múltiple es un evento común entre la población. Algunos métodos usados para establecer que se trata de una infección múltiple han sido por fingerprinting de DNA (RAPD Random amplification length fragments polymorphism ó RLFP Restriction length fragments polymorphism) sin embargo, recientemente en México se ha encontrado que usando el sistema de tipificación de *vacA* desarrollado por Artherton y cols en aislados múltiples y colonias aisladas es posible establecer infección múltiple por *H. pylori* en niños y en adultos.

En este trabajo nos propusimos comparar la infección múltiple por cepas de *H. pylori* mediante la genotipificación de los genes *cagA*, *picB* y *vacA* de colonias aisladas de niños y adultos mexicanos. Uno de los enfoques que se utilizaron fue el establecer patrones genotípicos usando combinaciones de todos los genes estudiados de las colonias ya estudiadas, con el fin de determinar la diversidad de esta infección múltiple en los pacientes estudiados.

Uno de los más importantes hallazgos relativos a la genotipificación de *vacA* encontrados fue la existencia de un mayor número de patrones genotípicos en colonias aisladas de adultos que en colonias aisladas de niños.

Helicobacter pylori

Con respecto a los otros resultados se puso en evidencia una alta frecuencia de infección múltiple cuando combinamos los alelos simples de la secuencia de señal y la región media de las colonias aisladas de niños y de colonias aisladas de adultos.

También confirmamos lo encontrado en otros estudios hechos en México con respecto a la región de *cagA* para la cual 25 colonias aisladas de niños no son tipificables, en cambio con lo que respecta a las colonias aisladas de adultos todas las colonias fueron tipificables.

En este estudio no se encuentre mayor diferencia con respecto a los alelos *s1b* y *s1a*, en cambio para el alelo *s2* el cual se presenta con mayor frecuencia en colonias aisladas de adultos, esto también se ha descrito en Perú, y otros estudios en América Latina, y con lo que respecta a los países desarrollados son diferentes, ya que *s1a* y *m1* del tipo de *vaca* son más relativos para la enfermedad ulcero péptica.

Para la detección de *cagA*⁺ se utilizaron dos tipos de primers, el que amplifica 335 bases de pares y 349 bases de pares. Con el primer 335 bp no existe diferencias entre las colonias aisladas de niños y las colonias aisladas de adultos, en cambio, para el primer 349 bp se presentan diferencias en colonias aisladas de adultos, en las cuales se presentan en mayor número que en colonias aisladas de niños

También, se probaron todas las colonias aisladas de niños y las colonias aisladas de adultos para explicar las diferencias entre los dos tipos de primers para detectar los aislados de *cagA*⁺, y tipificamos a todas las colonias aisladas de niños y las colonias aisladas de adultos para el gene de *picB*, porque se conoce que todos los aislados que son

Helicobacter pylori

picB⁺ son *cagA*⁺, de este análisis consideraremos que todos los aislados que son *cagA*⁻ con uno de los dos tipos de primers. Los resultados muestran que no todas las colonias aisladas de niños presentan lo anteriormente descrito (*picB*⁺/*cagA*⁺ 53%) y con lo que respecta a las colonias aisladas de adultos presentan un 75%, sin embargo, para *picB*⁻ y *cagA*⁻ en colonias aisladas de niños se presenta un 24 % y en colonias aisladas de adultos no se presenta esta combinación.

Para la combinación *picB*⁺/*cagA*⁻ no se presenta en ninguna de las colonias aisladas tanto de niños como para adultos y la combinación *picB*⁻/*cagA*⁺ se presenta de igual forma (20%) tanto en colonias aisladas de niños como en colonias aisladas de adultos.

CAPITULO 10

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con respecto a los genotipos de *vacA* mas frecuentes, se destacan varios hallazgos. Para la región *s* de *vacA*, con la excepción del alelo *s2*, cuya frecuencia fue claramente mas baja en colonias de *H. pylori* aisladas de niños, la frecuencia de *s1b* y *s2* en ambos grupos fue similar a lo encontrado en un estudio previo en México realizado con aislados múltiples.

S1b y *s2* fueron los alelos de la región *s* mas frecuentemente identificados, contrario a reportes a nivel mundial en los que *s1a* es el alelo de la región *s* mas asociado a enfermedad gastroduodenal. Para la región media, comparando inversamente con el estudio en cuestión, *m1* fue la región mas frecuentemente identificada en colonias, contrario a los resultados del estudio con aislados múltiples que muestran altas frecuencias similares para ambos alelos de *m*, tanto en niños como en adultos. Cabe resaltar que *m*, ha sido mas frecuentemente asociado con enfermedad gastroduodenal que *m2*. Al igual que en el estudio de genotipificación de aislados múltiples, se encontraron cepas no tipificables para la región *s* únicamente entre aquellas aisladas de niños y no tipificables para la región *m* en ambos grupos.

En relación con la genotipificación de *cagA* con los dos juegos de primers, los primers que amplifican para un producto de 349 bp fueron ligeramente mejores para identificar colonias *cagA*⁺ que utilizando el juego de primers que amplifican para un producto de 335 bp utilizando colonias provenientes de adultos. Lo anterior contrasta notablemente con lo encontrado en el estudio con aislados múltiples en el que el juego de primers que amplifican para un producto de 335 bp es notablemente mejor para identificar colonias *cagA*⁺ que el juego de primers que amplifican para un producto de 349 bp. Otro hallazgo importante en este estudio de colonias fue que todas las colonias estudiadas fueron tipificables combinando la genotipificación con ambos juegos de primers.

Por lo que refiere a las colonias de *H. pylori* aisladas de niños aunque la identificación de colonias *cagA*⁺ fue mejor con el juego de primers que amplifica por un producto de 335, se mantuvo la misma tendencia que en el trabajo realizado con aislados múltiples. De igual manera algunas colonias fueron 110 tipificables, sin embargo el porcentaje de identificación fue mucho menor que en el estudio realizado con aislados múltiples, y de igual modo, aunque menor que en las colonias provenientes de los adultos, el porcentaje de identificación de colonias *cagA*⁺ fue mucho mejor que lo encontrado en el estudio con aislados múltiples.

Las diferencias para detectar colonias *cagA*⁺ con los dos juegos de primers utilizados pueden ser explicados por diferencias en la secuencia del gene *cagA* en colonias aisladas de los pacientes mexicanos (niños y adultos), lo cual podría significar que estas diferencias se deben a un menor reconocimiento de regiones mas conservadas, según el juego de primers utilizado, esto es mayor o menor homología con las secuencias de los primers.

También tratando de explicar diferencias en la capacidad para identificar colonias *cagA*⁻ entre los dos juegos de primers, decidimos además tipificarlas para el gene *picB*, ya que se ha descrito que todas las cepas *picB*⁺ son también *cagA*⁺. Para este análisis, consideramos todas las cepas tipificadas con cualquiera de los dos juegos de primers utilizados los resultados (ver tabla 7 y 8) aunque concordantes detectaron 8/103 *picB*⁻/*cagA*⁺ entre las colonias provenientes de niños y 2/102 entre aquellas provenientes de adultos, para la relación de *picB*⁺/*cagA*⁺ no se encontro mayor significancia ya que las colonias aisladas de adultos presentan un número mayor de incidencia y la relación de *picB*⁺/*cagA*⁻ esta relación no se presenta para ambos grupos de colonias aisladas sin embargo para la relación *picB*⁻/*cagA*⁻ solo la presentan colonias aisladas de niños

Con respecto al gen de *vacA* el cual se divide en varias regiones como son la s o señal y la m o media, lo cual se ha dicho que este gen esta asociado con un fenotipo de citotoxinao su capacidad de inducir úlcera péptica, con los resultados obtenidos podemos apreciar que

Helicobacter pylori

con respecto a los alelos s1a, s1b,m1 no se encuentra gran diferencia con respecto a los dos grupos de colonias estudiadas, sin embargo, con respecto al primers utilizado para determinar la región de s1/s2 es significativamente mayor para las colonias aisladas de niños con respecto a los adultos y aun utilizando este tipo de primers encontramos que algunas colonias no pueden ser tipificadas , y para el caso de la utilización de primers para el alelo de la región media encontramos una significancia mayor hacia las colonias de adultos ya que en niños solo 6 colonias no pudieron tipificarse con la utilización de este primers.

Los resultados aquí representados confirman resultados previos realizados con aislados múltiples de que la infección múltiple es mas común en población adulta. Explicar la causa, es difícil , pero una posible explicación podría ser una alta recombinación entre cepas de *H. pylori* que se incrementa con la edad, tal como lo muestran nuestros resultados.

CAPITULO 11

ANEXOS

ANEXOS I

EL DNA (ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO).

El Biólogo Watson y el Físico Crick propusieron una imagen de la estructura molecular del ADN ó DNA, el cual se presenta en todas las células eucarióticas y procaríóticas. En el núcleo se encuentran los cromosomas, que llevan el “ mensaje genético ” molde de todas las características hereditarias individuales. Cada cromosoma está formado ácido desoxirribonucleico (ADN). Las unidades finales de la herencia son los genes y cada gen es una porción de molécula de ADN

El ADN esta constituido por dos cadenas extremadamente largas de nucleótidos que contienen adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C).

Las cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases, uniéndose siempre la adenina con la timina y la guanina con la citosina.⁽⁶⁴⁾ El mensaje es transmitido mediante un código que representa el acomodo de los nucleótidos en la estructura del DNA.

ANEXO 2

Descripción del Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *H. pylori*.

El método de la reacción en cadena de la polimerasa se debe a Kary Mullis en 1986 (California, USA) y sirve para amplificar secuencias específicas de DNA.

El término “ reacción en cadena de la polimerasa ” (PCR) se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por el DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso

En general, los componentes requeridos para un PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flagelan el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción, y ADN polimerasa

En cuanto al equipo requerido: Microcentrifuga, micropipetas, congelador de -20°C, balanza analítica, termociclador, fuente de poder, espectrofotómetro, tubos para microcentrifuga estériles, tubos de PCR estériles, guantes y tapabocas estériles, puntillas con filtro para micropipetas, cámara de electroforesis, transluminador de luz UV, campana de flujo laminar.

OLIGONUCLEOTIDOS: Primero se sintetizan oligonucleótidos, la secuencia de estos es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, cada uno complementario a una secuencia corta en una banda del segmento de DNA y que se sitúa cerca del extremo de la secuencia que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos sintéticos pueden utilizarse como indicadores para la replicación de un segmento de DNA *in vitro*.

Este es uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad del PCR. Idealmente, en cada 100 µl de reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 µM. El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleotidos consiste simplemente en la adición sucesiva de monómeros (nucleótidos) activados a nucleótidos previamente fijados a una resina soporte. Su tamaño debe oscilar entre 20 y 30 nucleótidos, un contenido de G y C de aproximadamente 50% una temperatura media de fusión (T_m) de 55°C, que no sean complementarios entre sí o consigo mismos (para evitar la formación de estructuras secundarias y de dímeros de oligonucleótidos).

Los oligonucleótidos son liberados de la resina, purificados y recuperados por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida o preferentemente mediante cromatografía líquida de alta presión. Algunas modificaciones químicas en el residuo 5' -OH del último monómero incorporado, permiten la adición de grupos radiactivos o de biotina, de tal manera que el oligonucleótido queda preparado para participar directamente en procesos de identificación de secuencias génicas.

Helicobacter pylori

DNA BLANCO: La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de ADN blanco, esto es, de 300 ng a 1 μ g de ADN genómico humano. En el caso de usarse genes clonados en plásmidos, de 25 a 100 ng de su ADN son más que suficientes.

ENZIMA ADN POLIMERASA Taq: es la más usada por su fácil estandarización y menor costo. Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de endonucleasa 3' a 5' (correctora de prueba) y de exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 4×10^4 bases y amplifica, sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb

Se recomienda usar 1 a 2.5 U de la enzima por cada reacción de 100 μ l.

MAGNESIO: La concentración de iones de magnesio en la PCR es también determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de $MgCl_2$ en cada reacción, la concentración final entre 0.5 y 2.5 mM. Si se disminuye demasiado la concentración de $MgCl_2$ la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación es nula.

DNTP'S: Las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que a concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimizarse. Concentraciones entre 20 y 200 μ M proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's en concentraciones equimolares

Helicobacter pylori

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

1)-. Desnaturalización (92-98°C, 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

2)-. Alineamiento (50-60°C, 30-60 segundos), en el cual se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN desnaturalizado.

3)-. Extensión (70-74°C, 30-90 segundos), en el cual que el ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. ⁽⁶⁵⁾

El ciclo siguiente se contiene ahora el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles.

Afortunadamente, con el descubrimiento de una enzima polimerasa de ADN (Taq) estable al calor y que se obtienen apartir de una bacteria termofílica (*Thermus thermophilus*, bacteria que crece en las aguas termales) y la introducción de termocicladores automatizados, permitieron disminuir significativamente el costo, y el tiempo.

Helicobacter pylori

Al fin de este proceso, el segmento de ADN deseado se ha amplificado a tal punto que puede ser fácilmente aislado y después clonado.

Este método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es tan sensible que puede detectar hasta una sola molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra. ⁽⁶¹⁾

Debido a la alta sensibilidad del PCR, los problemas de contaminación con ADN diferente al que se requiere analizar y sobre todo con productos de amplificaciones anteriores, pueden fácilmente presentarse y ocasionar serios problemas si no extremar las precauciones en el montaje de la reacción. La contaminación con ácidos nucleicos puede deberse a clones de plásmidos con los que rutinariamente se trabaja en el laboratorio y están presentes como contaminantes en cantidades grandes en el equipo y materiales y reactivos

Otra fuente de contaminación en el laboratorio es la acumulación de productos de PCR producida por amplificaciones repetidas de la misma secuencia del blanco.

La amplificación de segmentos de ADN mediante el PCR se utiliza en muchos laboratorios y tiene múltiples aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina, dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes: en el campo del diagnóstico clínico esta metodología es utilizada en la genética médica para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y algunas cromosomopatías comunes; en el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, en el campo de la oncología para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos, y

Helicobacter pylori

para la detección de virus con secuencias oncogénicas. En la microbiología el PCR se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo. En la medicina legal el PCR ha enriquecido enormemente el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente variables o polimorfas.

El proyecto del genoma humano ha recurrido al PCR para identificar nuevos genes, sus secuencias y mutaciones.

En los campos de biología molecular, la ingeniería genética y la biotecnología, el PCR se utiliza para la clonación molecular de genes y su secuenciación nucleótida, para la mutagénesis dirigida a secuencias génicas, para facilitar manipulaciones génicas encaminadas a la producción de proteínas recombinantes, y para el análisis y cuantificación de la expresión génica.

El PCR promete ofrecer con su alta sensibilidad y técnicas específicas para la detección de *H. pylori*. La técnica de PCR para la detección de *H. pylori* de muestras de biopsias gástricas ha sido descrito por muchos laboratorios, sin embargo la precisión de la técnica varía.

Los factores que afectan la precisión de la prueba incluyendo la cadena de primers y la obtención del DNA, la preparación de muestras, la densidad bacteriana, y el procedimiento del PCR. Li et al desarrolló un ensayo de PCR el cual fue reportado con el 100% de sensibilidad y especificidad para la detección de infección de *H. pylori* con muestras de biopsias de mucosa gástrica.

Helicobacter pylori

Una ventaja del potencial del PCR es que puede permitir el diagnóstico de *H.pylori* el cual puede ser no invasivo para la detección de *H. pylori* en fluidos no gástricos como puede ser la saliva. En un estudio la sensibilidad de PCR para detectar *H. pylori* en saliva fue de un 84%. Para explicar la observación que la saliva de algunos individuos eran positivos para *H. pylori* por PCR en la ausencia de bacteria detectable en el estómago, por lo cual algunos autores sugieren que la cavidad oral es la situación inicial de infección (39,63)

Al finalizar la reacción existen millones de copias de fragmentos de interés, por lo que es suficiente con colocar en un gel de agarosa una décima parte del volumen total de la reacción correr la electroforesis y teñir con bromuro de etidio, para verificar el éxito de la amplificación. (65)

ANEXO 3

PREPARACION DE SOLUCIONES

MEDIO SELECTIVO PARA *H. pylori* (SIN ANTIBIOTICO)

Agar Brucella	40 g
Sangre de carnero	50 ml
Agua desionizada	1000ml

MEDIO SELECTIVO PARA *H.pylori* (CON ANTIBIOTICO)

Agar Brucella	40 g
Sangre de carnero	50 ml
Vancomicina	10 g
Polimixina β	2500 uu
Trimetoprim	5 g
Ac.nalidixico	10 mg
Bacitracina	10 000 UI
Agua desionizada	1000 ml

PRUEBA DE UREASA

Urea	0.03 g
DBPs(Dulbecco's phosphate buffered saline)	50 ml
Rojo de fenol al 1 %	2 gotas

ANEXO 4

PREPARACION DE SOLUCIONES

SOLUCION STOCK DE TRIS

(TRIS 1M,pH 8)

Tris base 121.1 g
Agua desionizada a 1000 ml
Ajustar pH con HCl conc.

SOLUCION STOCK DE EDTA

(EDTA 0.5M,pH 8)

EDTA 186.1 g
NaOH ~20 g
Agua desionizada a 1000 ml

Adicionar el EDTA a unos 800 ml de agua. Agitar vigorosamente con un agitador magnético. Ajustar el pH agregando el NaOH

*Helicobacter pylori***LOADING BUFFERS**

(EDTA 25 Mm, azul de bromofenol 0.25 %,xilene cianol 0.25%, glicerol 30%)

Solución stock de EDTA 0.5 M	5 ml
Azul de bromofenol	0.25 g
Xylene cianol IFF	0.25 g
Glicerol	30 ml

Agua desionizada a 1000 ml (~65 ml)

Almacenar a temperatura ambiente.

BROMURO DE ETIDIO

(1mg/ml)

Bromuro de etidio	50 mg
Agua desionizada	50 ml

Almacenar protegida de la luz

BUFFER TRIS-ACETATO (TAE) 50 X

(Tris base 40 mM, EDTA 1 mM)

Tris	242 g
Solución stock de EDTA 0.5 M, pH8	100 ml
Acido acético glacial	57.1 ml
Agua desionizada a	1000 ml

*Helicobacter pylori***MARCADOR DE PESO MOLECULAR**

(1µg/10µl)

Loading buffer	10 µl
123 bp ladder ó 1 kDa bp ladder	10 µl
Agua desionizada estéril	80 µl

CAPITULO 12

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA BASICA

- 1-) ALCARAZ, Hernández G
Manual clínico de Gastroenterología.
México. Edt. JGH Editores 1a. Edc. 1997. 35-58 p.
- 2)-. BEESON, B.P.
Tratado de Medicina Interna
México. Edt. Mc Graw Hill. 14a. Edc. 1980. 1426-1450 p
- 3)-. BAUCHANAN, R. E.
Manual of determinative bacteriology.
Baltimore, USA Edt. The Williams & Wilkins Company. 9a Edc. 1994. 1268p
- 4)-. DAVIS, G Leonard
Basic Methods in Molecular biology.
USA, Ed. Appleton & Lange 2da. Edc. 1994. 114-161 p.
- 5)-. DAWSON, S. Beth
Basic and clinical Biostatistics.
USA, Ed. Appleton & Lange. 1ª Edc. 1990. 329 p.
- 6)- FIGURA, N.
Bacterial pathogenic factors.
The year in *Helicobacter pylori* 1995. 12-14 p.
- 7)-. GANONG F. William.
Fisiología Médica.
México. Edt. El manual Moderno. Edc. 13a 1992. 18-24 p

Helicobacter pylori

- 8)-. JAWETZ, Melnick.
Microbiología Médica
México. Edt. El manual Moderno. Edc. 15a. 1996, 279-281 p.
- 9)-. MARTIN, A.L
Fundamentos de Gastroenterología.
México. Edt. Interamericana Edc. 2da. 1979. 376-382 p.
- 10)- MURRAY, P R.
Manual of Clinical Practice.
6ta. Edc. 1994. 492-496 p.
- 11)-. ORDANZA, N. Raúl
Biología Molecular antes y después de la doble hélice.
España. Ed. Siglo veintiuno editores. 1era. Edc. 1994. 160-161p.
- 12)-. PERSING, H. David.
Diagnostic Molecular Microbiology.
Washington, USA, Ed. American Society for Microbiology. 1era. Edc. 1993 282-287 p.
- 13)-. SALYERS, A
Bacteria pathogenesis a molecular approach.
Washington, USA, Ed ASM press. 1era Edc 1994 273-281 p.
- 14)-. SIEGEL, S
Estadística no paramétrica
México. Edt. Trillas Décima reimpresión Edc.. 1986. 344p

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA:

- 1)-. ARNOLD, R. and Quina H. 1996 Peptic ulcer pathogenesis, Ocurrent opinion in Gastroenterology, vol. 12, p.p 33-36.
- 2)-. ARTHERTON, J. C Cao-Ping, Peek R M, et al. 1995 Mossaicism in vacuolating exotoxin alleles of *Helicobacter pylori*, J Biol Chem, vol. 270, p.p. 17771-17777.
- 3)-. BARRERA, A Hugo. 1993 Reacción en cadena de la polimerasa, Ciencia y desarrollo, vol Enero /Febrero, p.p 50-60.
- 4)-. BERRY, V. Jennings K, Woodnutt G. 1995 Bacterial and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*. Antimicrobial, ASD, vol. 39, p.p. 1859-1861.
- 5)-. BLASER, MJ 1992 Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* - induced inflammation, Gastroenterology, vol. 102, p.p. 720-727.
- 6)-. BOURKE, B, Jones N, .Philips. 1996 *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children, J Pediatric, vol 15, p p. 1-13.
- 7)-. CELIK J, Su B, Tirén V, et. al. 1998 Virulence and colonization-associated properties of *Helicobacter pylori* isolated from children and adolescents, The Journal of infectious diseases, vol 177, p.p 247-252.
- 8)-. CRABTREE, J. E. 1996 Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*, Aliment Pharmacol, vol. 10, p.p 29-37
- 9)-. CORREA, P. 1992 Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-first American Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention, Cancer Res, vol. 52 (24), p.p 6735-6740

Helicobacter pylori

- 10)- COVACCI, A, Ghiara P.1995 *Helicobacter pylori*.Pathogenesis and feasibility of vaccine development. Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development, vol.1,p.p.323-334
- 11)- COVER, Timothy L, Blaser J M 1995 *Helicobacter pylori*: a bacterial cause og gastritis,peptic ulcer disease,and gastric cancer,ASM News,vol.61,p.p.21-25.
- 12)- DROUET, E. M.D' Monrelos H P,Andujar M, Boude M, et.al. 1993 Partial characterization of an external polysacaride of *Helicobacter pylori* by using an immunoglobinn M monoclonal antibody,Infect Immunol,vol.61,p.p.2732-2736
- 13)- DRUM, B.1990 *Helicobacter pylori*,Regular review, vol.65,p.p.1278-1282.
- 14)- DUNN,B E, Cohen H and Blaser Martin.1997 *Helicobacter pylori*,Clinical Microbiology Reviews,vol.10,p.p.720-734.
- 15)- DYE, R. KEVIN. 1993 Gastritis, úlcera y *Helicobacter pylori*, Infectología Feb.año 13 número 2:p.p.83-88
- 16)- FANTRY,T.G, Qiao-Xi Zheng, Darwin P.P, Rosenstesn H.A. and James P.S 1996 Mixed Infection with *cagA*-Negative strains of *Helicobacter pylori*,*Helicobacter*,vol 1,p p 98-106.
- 17)- GARNER, A Juli and Cover Timothy L.1996 Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating citotoxin by epithelial cells,infection and Immunity,vol.64,p.p.4197-4204.
- 18)- GO F.M, Kapur V, Graham YD, Musser M.J.1996 Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis:Extensive allelic diversity and recombinational population structure,J Bacteriology,vol 178,p p 3934-3938.

Helicobacter pylori

- 19)- GOLDNER, F.H. 1976 Relationship of bile in the stomach to gastritis, *Gastrointesst Endos*, vol 22, p p 197
- 20)-. GOODWIN, C S, Armstrong Ja 1990 Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* *Clinical Microbiology Infect. Dis.* ,vol.9, p p 1-13.
- 21)-. GRAHAM, Y.D. 1989 *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease, *Gastroenterology*, vol 96, p.p.615-625.
- 22)-. GRAHAM, Y.D. 1997 *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodebal ulcer and gastric cancer A model, *Gastroenterology*, vol. 113, p.p.1983-1991
- 23)-. GREENLAW, R. 1980 Gatroduodenitis: A broader concept of peptic ulcer disease, *Digestive Dis Sci*, vol 25, p.p.660.
- 24)-. HAN S.R, Schreiber H.J, Brhakdi S, Loos M and Maeurer J.M. 1998 *VacA* Genotypes and Genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin Diag Lab Immunology*, vol.5 (2), p.p 139-145
- 25)-. HASSALL, E, Dimmick J.E. 1991 Unique features of *Helicobacter pylori* disease in children, *Digestive disease and Sciences*, vol.vol.36, p.p.417-420
- 26)-. HOPKINS, J.R, Morris Gleen J, Baltimore, Maryland 1994 *Helicobacter pylori*: The missing link in perspective, *J Medic.* ,vol.97, p p.265-275.
- 27)-. HOV, Ac, Chen W. and Jin Z. P. 1995 An epidemiological survey on *Helicobacter pylori* infection in children, vol 16, p.p.237-239
- 28)-. ITO, Yoshiyuki, Azuma T, Ito S, et al. 1997 Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan, *J Clin Microbiology*, vol.35, p p 1710-1714.

Helicobacter pylori

- 29)- KIM, J. M, Michener R and Triadafilopoulos G 1997 Serum ^{13}C -Bicarbonate assay for the diagnosis of gastric *Helicobacter pylori* infection and response to treatment, *Gastroenterology*, vol. 113 (1), p.p.31-37.
- 30)- LEE, A. 1996 Prevention of *Helicobacter pylori*, *Scand J Gastroenterol*, vol.31, p.p.11-15.
- 31)- MACCHIA, G, Massone A, Burroni D, Covacci A, Cesini S and Rappuoli R. 1993 The hps 60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases, *Mol Microbiol*, vol.9, p.p. 645-652
- 32)- MADRAZO de la Garza, F. 1996 Erradicación de *Helicobacter pylori* y el dolor abdominal crónico, *Rev Gastroenterología Méx* vol.61 (4), p.p 398-399
- 33)- MARSHALL, B. J, Armstrong J.A, McGeachie D.B. 1985 Attempt to fulfill Koch's postulate for *Campylobacter pylori*, *Med J. Aust.*, vol. 142, p.p.436-439.
- 34)- MARSHALL, B.J, Warren J. 1984 Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*, vol. 1, p.p.1311-1315
- 35)- MARSHALL, B.J. 1994 *Helicobacter pylori* basic mechanism to clinical cure, Kluwer Academic Publishers, London, vol. 75, p.p 75-84
- 36)- MEGRAUD, F. 1996 Advantages and disadvantages of current diagnostic tests of the detection of *Helicobacter pylori*, *Scand J Gastroenterol*, vol.31, p.p.57-62.
- 37)- McNULTY, C, Watson M. 1984 Spiral bacteria of the gastric antrum, *Lancet*, vol. 1, p.p.1068-1069
- 38)- MONES, J, Sainz S, Sancho F. J. 1994 *Helicobacter pylori* en patología digestiva, *Medicina Integral*, vol.8, p p 435-447

Helicobacter pylori.

- 39)- MORAN, P. A. 1996 Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*, *Scand J Gastroenterology*, vol.31, p.p 22-31.
- 40)- MORAN, P A, Torkel W. 1994 Bacterial pathogenic factors, *The year in Helicobacter pylori* , p.p.17-20.
- 41)- MORRIS, A. 1987 Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH, *Am J Gastroenterol*, vol.87, p.p.192
- 42)- NOACH, L.A, Rolf T and Tytgat J.1994 Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa, *Clin.Pathol* ,vol.47, p.p.699-704.
- 43)- PEEK, R.M, Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, et al 1998 *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a not so simple association, *Gastroenterology*, vol.114 (2), p.p.408-409
- 44)- PETERSON, L. Walter 1994 *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcero péptica, *Infectología*, Junio, año 14 número 6, p.p 279-286
- 45)- POWELL, K. U. 1995 A general practice study of *Helicobacter pylori* eradication treatment in patients using long-term ulcer healing therapy, *Br J Clin Res*, vol.6, p.p.21-29
- 46)- RAMSEY, E J 1979 Epidemic gastritis with hypochlorhydria, *Gastroenterology*, vol 76, p.p.1449
- 47)- ROBERT, J Owen 1995 Bacteriology of *Helicobacter pylori*, *Clinical Gastroenterology*, vol 9, p.p.415-441
- 48)- SHERMAN, P, Leslie K, Golder E, cols.1993 *Helicobacter pylori* infection in adolescents with eating disorders and dyspeptic symptoms, *J Pediatr*, vol. 122, p.p.824-826

Helicobacter pylori

- 49)- THOMAS,C.R 1991 Update on gastric lymphoma,J Natl Med Assoc,vol.83 (8), p.p.713-718
- 50)- TYTGAT,G.N.J 1994 Treatmentes that impact favourably upon the eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer recurrence,Aliment Pharmacol Ther,vol.8,p.p.359-368
- 51)- SREWART, Goodwin. C. 1993 *Helicobacter pylori* biology and clinical practice, Boca ratón: CRC PRESS, vol.38-52,p.p. 286-279
- 52)- VANDER, HR, Vander EA, Dekker WF, et.al.1997 Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to *cagA* A prospective 1-year follow-up stufy, Gastroenterology, vol.113 (1), p.p.25-30.
- 53)- VICENT, M Ricardi, Rotter J L. 1994 Familial *Helicobacter pylori* infection societal factors, human genetics, and bacterial genetics, Ann Inter Med, vol.120,p.p.1043-1044.
- 54)- VICENT,P, Gottrand F, Pernes P. 1994 High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children:Epidemiology of a cluster,with special emphasis on molecular typing,Gut,vol.35,p.p.3133-316
- 55)- WALKER, M, Petolani S and Gasbarrini G 1996 Gastric carcinoma and gastric lymphoma. Current opinion in children,Gastroenterology The Pediatric Infectious Disease Journal,vol.15,p.p.1-13.
- 56)- WEWER, V, Chistiansen K M, Andersen L P,cols.1994 *Helicobacter pylori* infection in children with recurrent abdominal pain,Acta pediatric,vol.83,p.p 1276-1281.
- 57)- WITHERELL, L M, Hansen S, Jellum E, et.al. 1997 Risk for gastric Lymphoma in persons with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* infection,The Journal of infectious diseases,vol.176,p p 1641-1644

Helicobacter pylori

58)- YANG, H.D, Bom S H, Jod EY, cols Gastric juice ammonia vs CLO test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection,Diag Dis Sci,vol 40,p p 1083-1086