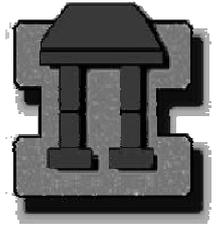




Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“PARTICIPACIÓN DE LOS GENOTIPOS *vacA*, *cagA* Y *babA2*
DE *Helicobacter pylori* EN LA ENFERMEDAD ÁCIDO PÉPTICA
DE PACIENTES SINTOMÁTICOS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA PRESENTA:

LIZBETH HOYOS TORRES

DIRECTOR DE TESIS: M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM, PAPIIT IN216508.

TLANEPANTLA, EDO. DE MEXICO

ABRIL DEL 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Por enseñarme a luchar hacia adelante, por su gran corazón y capacidad de entrega, pero sobre todo por enseñarme ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta.

Gracias por darme la vida, por su amor, por las caricias, por el dolor, por las sonrisas por el sufrimiento, por los regaños y por el aliento.....

Gracias con todo mi corazón, gracias por ser como son, que Dios no pudo escoger de una manera mejor, a mis padres, la pareja que ustedes son.

A mi hermano por apoyarme y ayudarme en todas esas cuestiones de la compu, te quiero mucho.

A mis amigos Tania, Aldana, Alanis, Ale, Leo, Marisol, Mike, por ayudarme en mis momentos de estrés por brindarme su amistad y momentos inolvidables de alegría.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras por su atención, apoyo y valiosos consejos para poder realizar esta tesis y por haber confiado en mí GRACIAS.

Al profesor y amigo M. en C. Eric Monroy Pérez por su total apoyo desde un principio, por su atención, por su tiempo, y sus consejos además de haber estado conmigo en momentos importantes GRACIAS.

A Susan, Paty e Ime por su paciencia, por haberme enseñado y aconsejado, desde el momento en que inicio este proyecto.

A todos mis sinodales por su valiosos consejos y aportaciones a esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Características Morfológicas de <i>Helicobacter pylori</i> . Epidemiología Factores de virulencia Métodos diagnósticos Tratamiento	
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
Selección de los pacientes y toma de los productos Cultivo de <i>H. pylori</i> . Extracción de DNA. Detección de <i>H. pylori</i> por PCR anidado. Detección de los genes de virulencia <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> por PCR multiplex Detección de <i>babA2</i> de <i>H. pylori</i> por PCR. Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa.	

RESULTADOS

22

Pacientes estudiados

Detección por PCR anidado de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica

Amplificación por PCR de *vacA*, *cagA* y *babA2* de *Helicobacter pylori*.

DISCUSIÓN

29

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

Amplificación de los alelos de *vacA*, de *cagA* y de *babA2* de *H. pylori* por PCR en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica.

CONCLUSIONES

33

BIBLIOGRAFIA

34

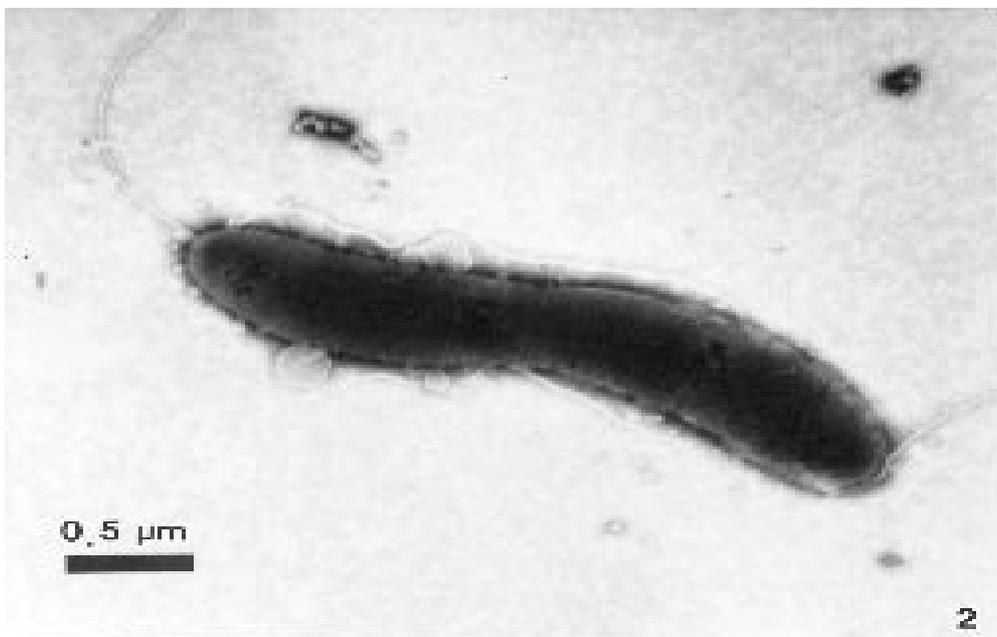
RESUMEN

El propósito de este estudio fue estimar la frecuencia de los genotipos *vacA*, *cagA* y *babA2* de cepas de *H. pylori* aisladas de cultivos de tejido gástrico de pacientes enfermos. Las biopsias gástricas de los pacientes enfermos fueron maceradas y una alícuota (100 µl) fue cultivada en agar Casman suplementado con 5% de sangre de caballo y con suplemento DENT a 37°C, en 6.5% de CO₂ por cuatro días. *Helicobacter pylori* fue identificado en los cultivos por PCR anidado, los genotipos *vacA* *cagA* por PCR multiplex y *babA2* por PCR simple. Se analizaron las biopsias de 138 pacientes de las cuales el 66.7% (n = 95) correspondió al sexo femenino y el 33.3% (n = 43) al masculino. La edad de los pacientes se encontró comprendida entre los 16 y 83 años de edad. En el 45% (n = 62) de los cultivos obtenidos de las biopsias gástricas del total de pacientes (n = 138) se detectó a *H. pylori* por PCR anidado. El genotipo *vacA* se detectó en el 100% de las cepas (n = 62), *cagA* en el 40.3% (n = 25) y *babA2* en el 12.9% (n = 8). La asociación *vacA* s1/ *vacA* m1 se detectó en el 22.6% (n = 14) de las cepas de *H. pylori*, *vacA* s1/ *vacA* m1/*cagA* en el 16.1% (n = 10), *vacA* s2/ *vacA* m1 en el 12.9% (n = 9) y *vacA* s1/ *vacA* m2/ *cagA* en el 11.3% (n = 7). Los resultados obtenidos mostraron que en las lesiones gástricas de los pacientes se encontraron asociados los genotipos citotóxicos *vacA* y *cagA* y el factor de adherencia *babA2* de *Helicobacter pylori*, por lo que fue necesario establecer el tratamiento médico más eficaz, sobre todo en sujetos con riesgo de desarrollar cáncer.

INTRODUCCIÓN

Características Morfológicas de *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, de forma espiral que mide de 2.5 a 5 micras, tiene gran movilidad debido a la presencia de 4 a 8 flagelos unipolares (fotografía 1). Habita exclusivamente en el estómago humano y es capaz de subsistir en un ambiente extremadamente ácido. Es un microorganismos microaerofílico (requiere oxígeno en bajas concentraciones), utiliza el hidrógeno y es oxidasa y catalasa positivas. Fue descubierta por Marshall y Warren en 1983, en el hospital Royal Perth de Australia a partir de biopsias del epitelio gástrico (1,2).



Fotografía 1. Micrografía electrónica de transmisión. *Helicobacter pylori* aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica.

Epidemiología

Se estima que el 50% de la población mundial se encuentra infectada por esta bacteria, en donde la frecuencia de infección varía de nación a nación. En el [mundo occidental](#) (Oeste de Europa, Norteamérica y Australia) la infección es del 25 por ciento, siendo mucho mayor en el [tercer mundo](#) (3). En los países en vías de desarrollo la [infección](#) ocurre principalmente en personas de edad avanzada (más del 50 por ciento en personas de más de 60 años, frente a un 20 por ciento que se presentan en personas de menos de 40) y en los sectores más pobres (4,5,6). En México la prevalencia de infección por *H. pylori* es del 66% (7). Varios autores han reportado la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y han propuesto que ésta podría ser la fuente de la infección y de la re-infección del estómago después de la terapia, así como de la transmisión a otras personas (8,9,10).

Factores de virulencia

Ureasa.

El jugo gástrico normal posee un $\text{pH} < 4$, el cual le confiere un carácter bactericida y por tanto capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos. Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, implica la capacidad de esta bacteria para sobrevivir en ese ambiente ácido. La clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa (11). Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas. El efecto de esas reacciones es un aumento del pH . La enzima también provee nitrógeno para la síntesis proteica.

Participación de *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en la infección

Se han descrito diferentes factores de virulencia de *H. pylori* (12), entre los cuales el gen *vacA* (vacuolization associated gene) y el gen *cagA* (cytotoxin associated gene) juegan un papel importante en la infección (13,14,15). El gen *vacA* codifica una citotoxina que tiene la capacidad de formar vacuolas en las células epiteliales (16). *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y varía en 2 regiones (15), la región s (la secuencia de la señal) que existe como los tipos alélicos s1 o s2 y la región m (región media) presente como los tipos alélicos m1 o m2 (17). Las cepas de *H. pylori* que presentan las variantes alélicas s1/m1 producen altos niveles de la citotoxina (18). Aproximadamente el 50-70 % de las cepas de *H. pylori* posee el gen *cagA* (19,20) el cual es un marcador genético para una isla de patogenicidad (*cag* PAI) constituida por 31 genes (21). Las cepas de *H. pylori* que presentan el gen *cagA* han sido asociadas con ulceración péptica y con cáncer gástrico (22,23). En los países desarrollados el 60% de las cepas son *cagA*+, pero en los países subdesarrollados la proporción de *cagA*+ se estima que es mayor (24). Las cepas *cagA*+ al ser más virulentas están asociadas con la ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y se ha descrito que producen una

profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces más que la inducida por cepas *cagA*- (25).

Las cepas de *H. pylori* han sido divididas de acuerdo a su virulencia, en tipo 1 (*vacA*, *cagA* positivo) y tipo 2 (*vacA*, *cagA* negativo) (26). Recientemente se ha demostrado que algunos factores de adherencia bacteriana contribuyen a la patogenicidad de *H. pylori* (27,29,29). Así, la proteína de membrana externa BabA2, codificada por el gen *babA2* de *H. pylori*, favorece la adherencia con un epítipo del antígeno de grupo sanguíneo Lewis B (LeB) expresado en las células gástricas humanas (30). La adherencia de *H. pylori* vía BabA2 actúa como un mecanismo eficiente en la liberación de VacA y CagA (31), asociándose con la patogénesis, tal como atrofia o metaplasia intestinal (32).

Métodos diagnósticos.

Los primeros métodos de diagnóstico de *H. pylori* se realizaron analizando las biopsias gástricas, de ahí que esos métodos fueron denominados invasivos; en contra posición con aquellos otros desarrollados más tarde, que no requieren las biopsias y que se denominaron “no invasivos” (33).

Métodos invasivos

Requieren el análisis de biopsias gástricas para la búsqueda microscópica de la bacteria o para el cultivo y las pruebas de la ureasa.

a) Ureasa rápida:

Este método se basa en la hidrólisis de la urea, la cual provoca la liberación de CO₂ y NH₄, con el consiguiente aumento del pH, lo que se pone de manifiesto por un cambio en el color de un indicador ácido-base. En el mercado se consiguen diversas pruebas comerciales como CLOtest, PyloriTek y Hpfast, que tienen alta sensibilidad y especificidad y un tiempo de lectura corto, que puede ser desde un minuto a 24 horas (34).

b) Cultivo:

La muestra gástrica para el estudio bacteriológico debe ser macerada. El medio de cultivo que se emplea es agar casman suplementado con sangre total de caballo, y las placas se incuban en microaerobiosis por 5 días a 37°C en CO₂ al 6.5%. A los cinco días de incubación se obtienen colonias de aproximadamente 1mm de diámetro, claras, transparentes, brillantes y convexas, que a la tinción de Gram muestran bacilos curvos Gram negativos, son ureasa, catalasa y oxidasa positivos. La tinción de Gram o una tinción de flagelos (35) ayuda a la identificación de la bacteria,

Métodos no invasivos

Los métodos en los cuales no se requiere biopsia han sido denominados no invasivos (33), los dos más utilizados son la serología y la prueba del carbono marcado en el aliento del paciente. Sin embargo, recientemente se ha diseñado una prueba para la detección de antígenos de *Helicobacter* en las heces del paciente, cuya correlación es excelente con respecto al hallazgo de la bacteria en la biopsia.

Los métodos serológicos desarrollados permiten la evaluación del nivel de anticuerpos en sangre total, en saliva y en orina (33). Estos métodos permiten realizar encuestas serológicas a bajo costo, pero no permiten dar seguimiento post tratamiento al paciente, ya que los anticuerpos suelen permanecer elevados entre 24 y 48 meses después del tratamiento (33, 36); aunque manteniendo un suero control pretratamiento es posible un seguimiento mediante un ELISA cuantitativo (37). La detección de carbono marcado con un isótopo, se basa en suministrar al paciente una dosis de urea marcada con un isótopo, C13 o C14 (38, 39). Este último no es radioactivo, por lo que se centran las esperanzas en él como prueba general, aunque es una prueba cara para países en desarrollo (39). Si el paciente está infectado la bacteria hidroliza la urea en el estómago liberando CO₂ con el isótopo que es detectado en el aliento del paciente. Por otro lado, las pruebas de PCR han permitido la identificación del genoma de la bacteria en saliva, placa dental y heces, aparte de los tejidos gástricos (40,41), por lo que estas pruebas bien podrían considerarse tanto como métodos diagnósticos no invasivos o invasivos, según la muestra empleada.

Tratamiento

Los antibióticos más comúnmente empleados para el tratamiento de la infección por *H. pylori* es claritromicina, amoxicilina y tetraciclina. Anteriormente se utilizaba metronidazol, sin embargo las cepas bacterianas se han seleccionado como resistentes en más del 80 por ciento de los casos. Una vez que el *H. pylori* es detectado en pacientes con una úlcera péptica, el procedimiento normal es erradicarla, para permitir que sane la úlcera. La terapia tradicional de primera línea es una semana de terapia triple consistente en los antibióticos amoxicilina y claritromicina, y un inhibidor de bomba de protones como el omeprazol. Se ha encontrado que cada vez que las cepas bacterianas se han seleccionado como resistentes a los antibióticos. Por lo que el tratamiento inicial requiere rondas adicionales de terapias con antibióticos o estrategias alternativas tales como una terapia cuádruple.

Los compuestos de bismuto también son efectivos en combinación con el tratamiento tradicional. Para el tratamiento de las cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina, el uso de levofloxacin como parte de la terapia ha sido eficaz (42).

Debido a que en México como en otros países en vías de desarrollo la infección por *Helicobacter pylori* es muy alta, el identificar por PCR los genes *vacA*, *cagA*, y *babA2*, en los cultivos obtenidos de las biopsias gástricas de los pacientes, nos ayudará a correlacionar los genotipos con el tipo y magnitud de las lesiones del tejido gástrico, lo cual nos permitirá establecer un manejo más efectivo de erradicación de la bacteria, sobre todo en sujetos con riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

ANTECEDENTES

- García y colaboradores en el 2006 (43) realizaron un estudio en el cual relacionaron la presencia de los genotipos *cagA*, *vacA* y *babA2* de *Helicobacter pylori* con cáncer gástrico de 40 pacientes. El gen *cagA* fue detectado en 16 cultivos (24.2%), *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1* y *vacAm2* fueron detectados en 28 (42.4%), 14 (21.2%), 17 (25.8%), 21 (31.8%) y 29 cultivos (43.9%), respectivamente.
- Martínez y colaboradores en el 2001 (44) realizaron un estudio en el cual detectaron los genes *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori* en 50 pacientes usando la técnica de PCR. El gen *cagA* fue detectado en 19 muestras (38%) y el gen *vacA* fue detectado en 16 muestras (32%), concluyendo que la mayoría de las cepas aisladas de pacientes con patología digestiva fueron *cagA+*, especialmente en pacientes con enfermedad péptica ulcerosa.

- Smith y colaboradores en el 2004 (45) evaluaron las diferentes técnicas de diagnóstico de *Helicobacter pylori*, con la finalidad de determinar cual de ellos era el más apropiado. También detectaron el gen *cagA*, por PCR. Estos autores concluyeron que el método de PCR es uno de los más específicos en la detección de *Helicobacter pylori*.
- Morales y colaboradores en 1999 (46) realizaron un estudio en el cual caracterizaron los genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en biopsias de 20 pacientes pertenecientes a la Ciudad de México. Dichos autores detectaron que las variantes alélicas s1b y m1de del gen *vacA* fueron las más frecuentes.
- Farzad y colaboradores en el 2004 (47) realizaron un estudio en el que compararon la prevalencia de los genotipos *vacAs1*, *cagA* y *babA2* y las características adhesivas de *Helicobacter pylori* en pacientes infectados. La frecuencia del genotipo *babA2* se encontró entre el 35% al 60%. Los análisis microscópicos demostraron altas índices de adherencia.

OBJETIVOS

- Identificación de *Helicobacter pylori* en los cultivos bacterianos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido péptica por el método de PCR anidado.
- Detectar por medio de PCR las variantes alélicas del gen *vacA* (s1, s2, m1 y m2) y los los genotipos *cagA* y *babA2* de *Helicobacter pylori*.
- Correlacionar la presencia de *vacA*, *cagA* y *babA2* de *H. pylori* con el tipo y la magnitud de las lesiones gástricas obtenidas por reporte de biopsia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de los pacientes y toma de los productos.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron en el Hospital Regional No. 72 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ubicado en el Municipio de Tlalnepantla Estado de México, un total 138 pacientes que habían sido canalizados al departamento de gastroenterología para estudios endoscópicos por presentar signos y síntomas de enfermedad ácido-péptica (enfermedad por reflujo gastroesofágico, gastritis aguda o crónica, gastroduodenitis, úlcera gástrica, duodenal o ambas). Todos los pacientes en este trabajo firmaron carta de consentimiento informado institucional para utilizar parte de la biopsia obtenida de la zona antral para cultivo y genotipificación. Los pacientes incluidos en este estudio no habían recibido tratamiento con antibióticos o algún otro tipo de medicamento que nos pudiera interferir con los métodos de detección de *H. pylori* en un tiempo mínimo de 3 meses. Antes de los estudios endoscópicos y en estado de ayuno a cada paciente se le extrajo una muestra de sangre de 3 ml por el método de punción sanguínea. Una parte de la biopsia de cada paciente fue procesada en el servicio de patología del hospital Regional No. 72 del IMSS y la otra junto con las muestras de suero fueron

transportadas en al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Cultivo de *H. pylori*.

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

Extracción de DNA.

El DNA de *H. pylori* de los cultivos fue extraído por el método descrito por Chattopadhyay (48). Las colonias de *H. pylori* fueron colectadas y suspendidas en tubos para centrifuga con 125 μ L de PBS estéril y agitadas vigorosamente en un vortex por 2 minutos. Posteriormente los tubos fueron inmersos en ebullición por 15 minutos e inmediatamente transferidos en hielo. Al término los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm x 1 minuto. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20°C hasta su utilización para PCR.

Detección de *H. pylori* por PCR anidado.

La detección de *H. pylori* por PCR anidado fue realizado por el método previamente descrito (49). EHC-U (5'-CCCTCAGCCATCAGTCCCAGAAAA-3') y EHC-L (5'-AAGAAGTCAAAAACGCCCCAAAAC-3') homólogos a un fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori* (80076-80492 pb), en donde el tamaño de los amplicones obtenidos fueron de 417 bp. El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1µl de cada primer EHC-U (25 pmol) y EHC-L (25 pmol) (los primers fueron de Sigma-Genosys), 2.5 µl de solución buffer para PCR 10x, 10.5 µl de H₂O libre de nucleasa, 10 µl de DNA de templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos de 94° C por 45 segundos, 59° C por 45 segundos y 72° C por 30 segundos . Finalmente una extensión final a 75° C durante 10 minutos.

Para la segunda ronda de amplificación y basados en la secuencia del fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori*, se utilizaron los primers ET-5U (5'-GGCAAATCATAAGTCCGCAGAA-3') y ET-5L (5'-TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3') complementarios a un fragmento interno de los amplicones EHC-U y EHC-L, en donde el tamaño de los amplicones esperados fueron de 230 bp (80198-80427 bp). Para la segunda ronda de amplificación y basados en la secuencia del fragmento de 860-pb del DNA genómico de *H. pylori*, se utilizaron los primers ET-5U (5'-GGCAAATCATAAGTCCGCAGAA-3') y ET-5L (5'-TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3') complementarios a un fragmento interno de los amplicones EHC-U y EHC-L, en donde el tamaño de los amplicones esperados fueron de 230 bp (80198-80427 bp) [25]. La amplificación de la segunda ronda fue similar a la primera, excepto que 0.2 µl del producto de la primera ronda fue utilizado como DNA templado y únicamente 25 ciclos de amplificación fueron utilizados.

Como control positivo en cada reacción de PCR se utilizó el DNA extraído de *H. pylori* ATCC 43629. Como control negativo se utilizó una mezcla reactiva con todos los componentes necesarios excepto el DNA templado.

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

Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers VA1-F y VA1-R (25 pmol) VAG-F y VAG-R (25 pmol) y *cag5c*-F y *cag3c*-R (10 pmol), respectivamente (48)

Para la detección de *vacA* y *cagA* se utilizaron los primers; VAG-F y VAG-R (2.5 pmol, en cada primer) VA1-F y VA1-R (25 pmol, en cada primer) y *cag5c*-F y *cag3c*-R (10 pmol de cada primer) (cuadro 1).

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ l; 1 μ l de cada primer (6 total) + 16 μ l de H₂O libre de nucleasa + 3 μ l de DNA templado). Los 25 μ l fueron depositados en un tubo Puretaq (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mmol de dNTPs). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión de 72°C por 10 minutos.

Regiones del DNA amplificadas	Nombre del Primer	Secuencia del primer (5´ a 3´)	Tamaños de los amplicones (pb)
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2	VAI-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286
	VAI-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA</i> m1/ <i>vacA</i> m2	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	567/642
	VAG-R	GCGTCAAATAATTCCAAGG	
<i>cagA</i>	cag5c-F	GTTGATAACGCTGTGCGCTTC	350
	cag3c-R	GGGTTGTATGATATTTTCCATAA	

Tabla I. Primers utilizados para la amplificación de los alelos de *vacA* y del gene *cagA*.

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

Para *babA2* se utilizaron los primers *baba1* (5'-ATCCAAAAGGAGAAAAGTATGAAA-3') y *baba2* (5'-TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA-5') a una concentración de 12.5 pmol (50). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µl; 1µl de cada primer, 20 µl de H₂O libre de nucleasa, 3µl de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 45 minutos. Finalmente una extensión de 72 °C por 5 minutos.

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

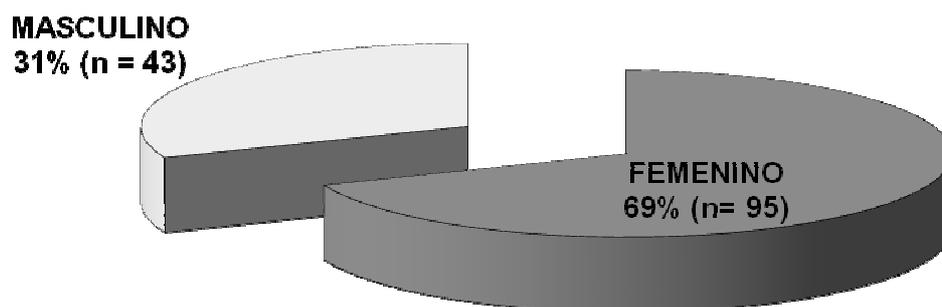
Después de la amplificación del DNA, 10 μ l de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo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

RESULTADOS

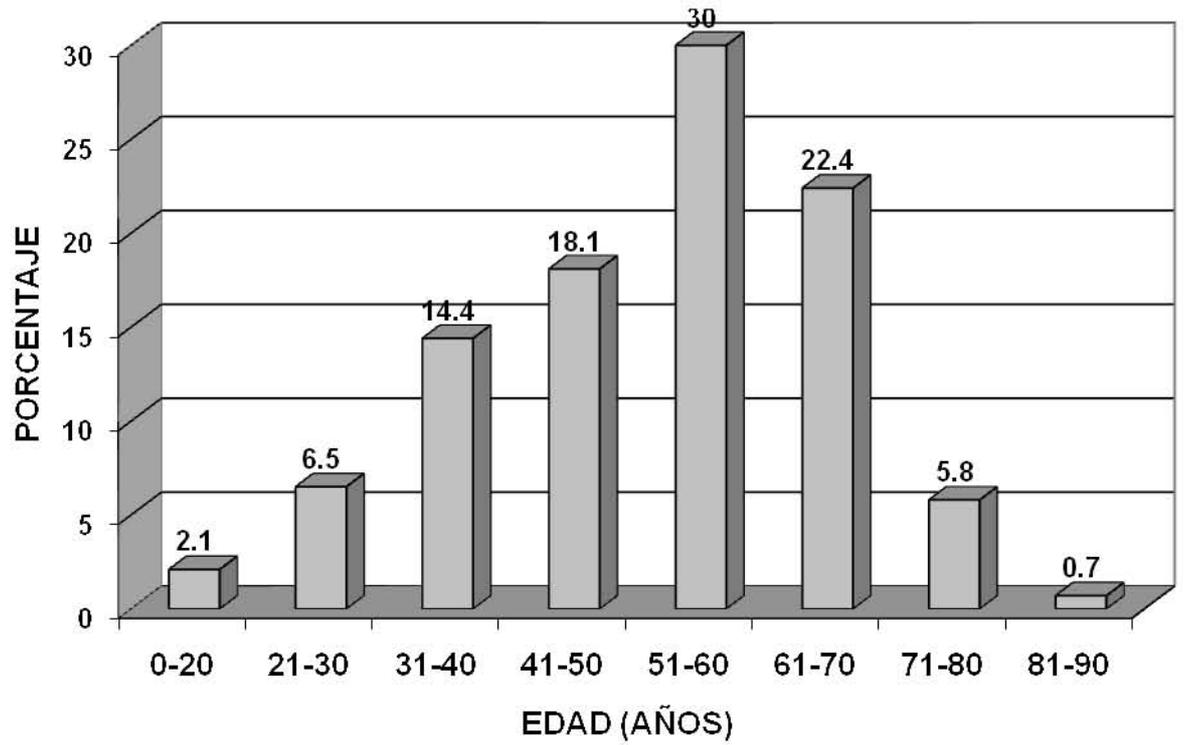
Pacientes estudiados

El 66.7% (n = 95) de los pacientes estudiados correspondió al sexo femenino y el 33.3%

(n = 43) al masculino (gráfica 1). La edad de los enfermos se encontró comprendida entre los 16 a 83 años de edad (gráfica 2). El 30% de los pacientes presentó una edad que se situó en intervalo de 51-60 años, el 22.4% entre 61-70, 18.1% entre 41-50, 14.4% entre 31-40, 6.5% entre 21-30, 5.8% entre 71-80, 2.1% entre 0-20 años y el 0.7% en el rango de edad de 81-90 años.



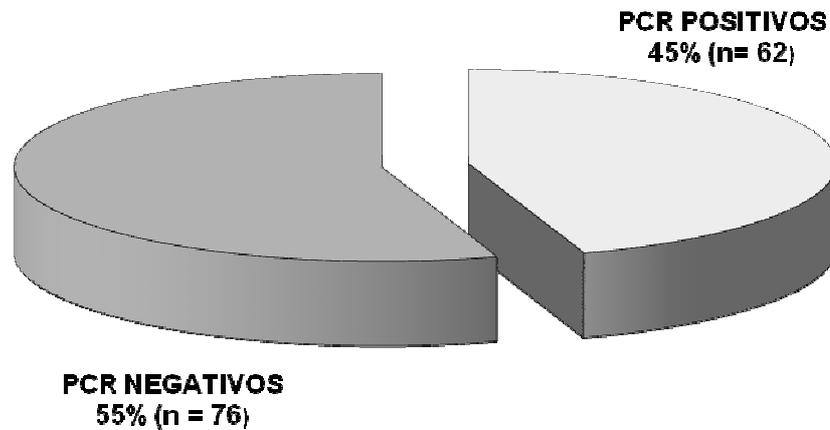
GRÁFICA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES POR SEXO



GRÁFICA 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES POR RANGO DE EDAD

Detección por PCR anidado de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica.

En el 45% (n = 62) de los cultivos obtenidos de las biopsias gástricas del total de pacientes (n = 138) se detectó a *H. pylori* por PCR anidado (gráfica 3). En la figura 1 se aprecia que el tamaño de los amplicones obtenidos en la primera ronda de amplificación de PCR fue de 417 bp y el tamaño de los obtenidos en la segunda ronda fue de 230 bp (figura 2).



GRÁFICA 3. IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori* EN LOS CULTIVOS GÁSTRICOS DE LOS ENFERMOS POR PCR ANIDADO.

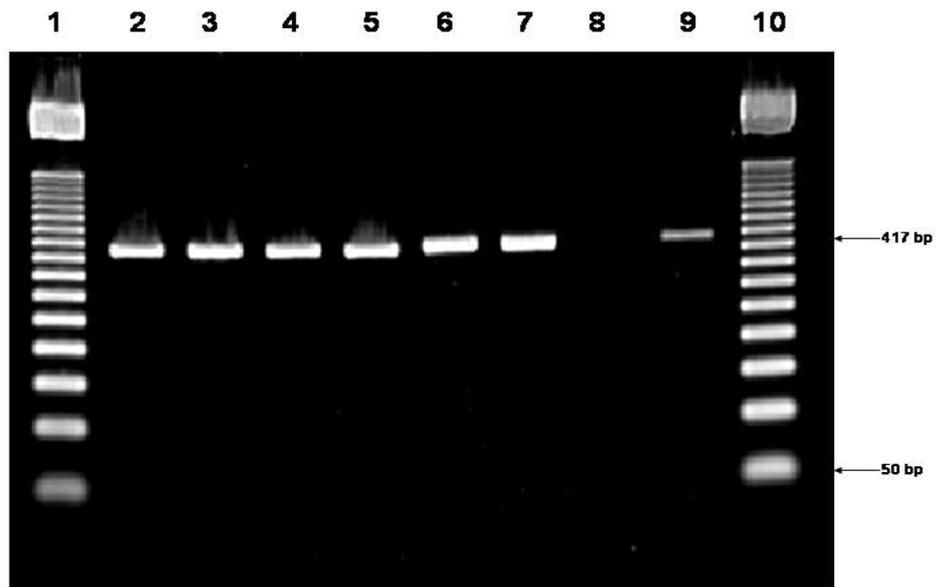


Figura 1. Detección por PCR de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica. Línea 1 y 10, MWM 50-pb DNA ladder; Línea 2- 4, *H. pylori* aislado de biopsias; Línea 5, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 6,7,9 *H. pylori* aislado de biopsias; Línea 8, Control negativo (sin DNA templado).

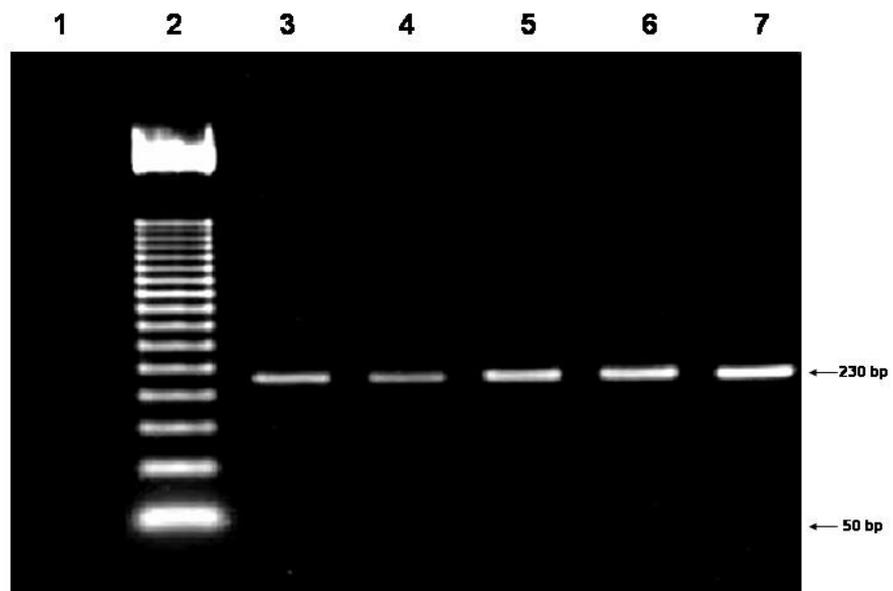


Figura 2. Detección de *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica mediante la amplificación de DNA por PCR anidado. Línea 1, Control negativo (sin DNA templado); Línea 2, MWM 50-pb DNA ladder; Línea 3-6, *H. pylori* aislado de biopsias gástricas; Línea 6, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo).

Amplificación por PCR de *vacA*, *cagA* y *babA2* de *Helicobacter pylori*.

A partir de las 62 (45%) cepas de *H. pylori* identificadas por PCR en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica, el alelo de *vacA* s1 fue detectado en el 25.8% (n = 16), s2 en el 9.7% (n = 6), m1 en el 42% (n = 26), m2 en el 12.9% (n = 8), *cagA* en el 40.3% (n = 25) y *babA2* en el 12.9% (n = 8) (tabla 1).

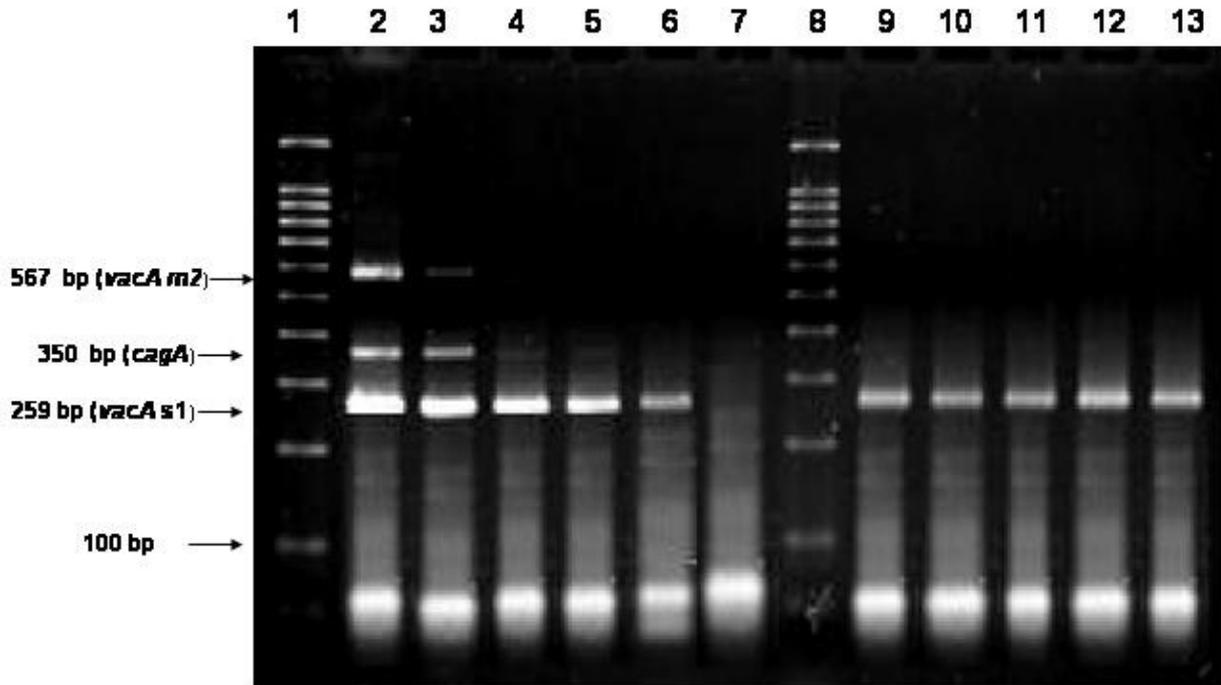
Marcador genético	Porcentaje (número)
<i>vacA</i> s1	25.8% (16)
<i>vacA</i> s2	9.7% (6)
<i>vacA</i> m1	42.0% (26)
<i>vacA</i> m2	12.9% (8)
<i>cagA</i>	40.3% (25)
<i>babA2</i>	12.9% (8)

Tabla 2. Porcentaje de las variantes alélicas de *vacA*, *cagA* y *babA2*.

El 42.7% (n = 38) de las cepas de *H. pylori* presentó un marcador genético, el 35.4% (n = 22) la asociación de 2 (tabla 3), mientras que la asociación triple (*vacAm2/cagA/babA2*) y cuádruple (*vacAm2/cagA/babA2*) se detectó en 1.6% (n = 1), en cada caso.

Genotipos detectados	No. de muestras (n = 62)		Diagnóstico endoscópico
	No.	%	
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1	14	(22.6)	GC y GA
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i>	10	(16.1)	GC y GA
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m1	8	(12.9)	GC y GA
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m2/ <i>cagA</i>	7	(11.3)	GC y GA
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i>	6	(9.7)	GC y GA
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m2	5	(8.1)	GC y GA
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1/ <i>babA2</i>	4	(6.5)	GC y GA
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2/ <i>cagA</i>	2	(3.2)	GA
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2/ <i>babA2</i>	1	(1.6)	GC
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> m1/ <i>cagA</i> / <i>babA2</i>	1	(1.6)	GC
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2/ <i>cagA</i> / <i>babA2</i>	1	(1.6)	GC
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m1/ <i>babA2</i>	2	(3.2)	GC
<i>vacA</i> s2/ <i>vacA</i> m2	1	(1.6)	GC
Total	62	(100)	

Tabla 3. Frecuencia de los marcadores de virulencia identificados en las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes con gastritis.



GC = gastritis crónica

GA = Gastritis aguda

Figura 3. Amplificación por PCR multiplex de los alelos de *vacA* y del gene *cagA* en las cepas obtenidas de biopsias gástricas de los pacientes. Línea 1 y 8 MWM 100-bp ladder; Línea 2, *vacA s1*, *cagA* y *vacA m2* (biopsia). Línea 3, *H. pylori* ATCC 43629 (control positivo); Línea 4, *vacA s1* (biopsia); Línea 5, *vacA s1* (biopsia); Línea 6, *vacA s1* (biopsia); Línea 7, Control negativo (sin DNA templado); Línea 9-13, *vacA s1* (biopsias).

DISCUSION

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

Con el propósito de detectar *H. pylori* en los cultivos de las biopsias gástricas de los pacientes enfermos, nosotros utilizamos los primers EHC-U/EHC-L dirigidos a un fragmento de 860 pb del cromosoma de bacteriano, los cuales han mostrado tener gran sensibilidad y especificidad, que aquellos primers utilizados para amplificar el gen de la ureasa o el gen 16S RNAr (51). Nosotros identificamos por un método de PCR anidado a *H. pylori* en el 45% (n = 62) de los cultivos de las 138 biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica. Nuestro porcentaje es semejante al encontrado en un estudio realizado en Lagos Nigeria, en 189 biopsias gástricas obtenidas de 63 pacientes (3 de cada uno) con síntomas dispépticos, en donde el 35% de los cultivos fue positivo para *Helicobacter pylori* en los tres métodos de PCR utilizados (52).

Amplificación de los alelos de *vacA*, de *cagA* y de *babA2* de *H. pylori* por PCR en las cepas obtenidas de las biopsias gástricas de los pacientes con enfermedad ácido-péptica.

En este estudio describimos que los genotipos *vacA* y *cagA* fueron detectados en el 90.4% (n = 56) y 40.3% (n = 25) de las cepas de *H. pylori* identificadas (tabla 3). Nuestros porcentajes coinciden con el reportado en un estudio realizado en 39 niños infectados de *H. pylori*, en donde el gen *vacA* fue detectado en el 92.3% de las cepas (n = 33), y *cagA* en el 53.8% (n = 21) de las muestras (53). El elevado porcentaje de *cagA* detectado en nuestros pacientes, también coincide con el reportado un estudio realizado en Sao Paulo Brazil, en biopsias gástricas obtenidas de 164 pacientes (9-99 años de edad) con síntomas dispépticos, en donde *H. pylori* fue identificado por PCR en el 67.7% (n = 111) de los pacientes, y en el 40.5% (n = 45) se encontró al gen *cagA* asociado con gastritis, úlcera gástrica, adenocarcinoma, linfoma de MALT y atrofia gástrica (54). La presencia de *cagA* ha sido correlacionada también con la gastritis activa del 60% de los niños y adultos infectados de países desarrollados (55). Se ha reportado que en España el 55% de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes infectados son *cagA+* (56), en Alemania el 72% [51], y en Sudáfrica el 95% (57).

En nuestro estudio el genotipo *babA2* fue detectado en el 12.9% (n = 8) (tabla 3) de las cepas de *H. pylori* identificadas. Nuestro porcentaje es inferior al descrito en un amplio estudio realizado en 314 pacientes de 4 países europeos (Alemania, Finlandia, Suecia y Portugal), en el cual correlacionaron la presencia de los genotipos *vacA*, *cagA* y *baba2* con la enfermedad duodenal. Estos autores reportaron que la presencia de *vacA*, *cagA* y *baba2* fue del 79% (n = 248), 77% (n = 243) y 44% (n = 139), respectivamente (58).

En otro estudio realizado en 141 biopsias gástricas de pacientes de la población de Shanghai, China, se encontró que los genes *iceA1*, *iceA2* y *babA2* fueron detectados en el 74.5% (n = 105), 15.6% (n = 22) y 63.8 % (n = 90) de las cepas aisladas, respectivamente (56).

En nuestro estudio los genotipos *vacAs2/cagA*, *vacAm2/babA2*, *vacAm1/ cagA* y *vacAs1/babA2* fueron detectados en 1 paciente (1.6%), en cada caso, *vacAs1/ vacAm1* en 2 pacientes (3.2%), *vacAs2/ vacAm1* y *vacAm2/cagA* en 3 pacientes (4.8%), en cada caso, *vacAs1/ cagA* en 6 pacientes (9.7%) y la asociación triple *vacAm2/cagA/babA2* y cuádruple *vacAs1/vacAm1/cagA/babA2* fueron identificadas en 1 paciente (16), en cada caso. Nuestros porcentajes contrastan con los reportados por Cattopadhwaj y cols. (48) en el cual, de las 65 cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias

de pacientes con diferentes trastornos dispépticos, en 44 (67.7%) se presentó la asociación *vacAs1/vacAm1/cagA*, en 16 (24.6%) la combinación *vacAs1/vacAm1* y en 5 (7.8%) *s2/m2/ cagA⁻*, y con lo descrito por Wang y cols. (60), en donde *vacAs1*, *vacAm2*, *vacAm1* y *cagA*, fueron detectadas en 87% (n = 27), 61% (n = 19), 32% (n = 10) y 26% (n = 8) de las muestras de las biopsias, respectivamente, y la combinación de los alelos de *vacA* *vacAs1/vacAm2* y *vacAs1/vacAm1* fueron identificada en el 62% (13/21) y en el 24% (5/21) de las muestras, respectivamente.

Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* que presentan la combinación de los alelos de *vacA* *s1/m2* o *s1/m1* son responsables de los altos y medios niveles de producción de la citotoxina (55), mientras que la asociación de los genotipos *vacA* *s1/cagA*, identificados en 6 de nuestros pacientes son asociados a la gastritis severa (61).

La presencia y asociación de las variantes alelicas de *vacA* (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*), y de los genes *cagA* y *babA2* identificados en los cultivos obtenidos de las biopsias de los pacientes enfermos, podría ser un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades gástricas más severas, corroborando lo descrito por Miehlke y cols. (62), en su estudio realizado en 34 pacientes con cáncer gástrico y en 35 sujetos asintomáticos. Estos autores

encontraron una mayor asociación de *vacA* s1 y m1 (24/34, 70.6%) y del gene *cagA* (30/34, 88.2%) en los pacientes con cáncer gástrico, con respecto al grupo control.

CONCLUSIONES

- La mayoría de los pacientes con enfermedad ácido péptica fueron seropositivos para *H. pylori*.
- La elevada frecuencia y asociación de los genotipos *vacA* (*s1,s2,m1* y *m2*), *cagA* y *babA2* identificados en las cepas de *Helicobacter pylori*, evidenció la virulencia y lo agudo de las infecciones por este microorganismo.
- El correlacionar los genotipos citotóxicos y el factor de adherencia *babA2* de *Helicobacter pylori* con la patología gastroduodenal de los pacientes con enfermedad ácido-péptica; contribuirá a establecer el tratamiento médico más eficaz, sobre todo en sujetos con riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Warren JR, Marschall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1(8336):1273-5;
2. McGuigan JE. 1996. *Helicobacter pylori*: the versatile pathogen. *Dig Dis*. 14(5): 289-363.
3. Mitchell HM. 1999. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol. Immunol*. 241:11-30.
4. Souto FJ, Fontes CJ, Rocha GA, de Oliveira AM, Mendes EN, Queiroz DM. 1998. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 93:171–174.
5. Mitchell A, Silva TM, Barrett LJ, Lima AA, Guerrant RL. 2003. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J. Clin. Microbiol.*; 41:1326–1328.
6. O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS. 2003. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-México border. *Am. J. Epidemiol.* 158:816-824.

7. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. 1998 A Community-. Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J. Infect. Dis.178:1089–1094.
8. Li CF, Ha T, Ferguson DA. Jr, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G, Thomas E. 1996;A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. Dig. Dis. Sci. 41: 2142–2149.
9. Nguyen TN, Barkun AN, 1999 Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter.*; 4:185–197.
10. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y. 2003 High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. J. Periodontol.;74:129–134.
11. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. 1991 Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun; 59:2470-5.
12. Mobley HLT. 1997 *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. *Gastroenterology.*;113:S21–S28.

13. *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111– 2115.
14. Peek RM, Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. 1997 *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.*;89:863– 868.
15. Atherton JC, Cao P, Peek. RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. 1995 Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.*;270:17771– 17777.
16. Cover, T.L. 1996 The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*;20: 241–246.
17. Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint WGV. 2000 The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy. *J. Clin. Microbiol.*;38:13–17.
18. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG. 2003 Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes

by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Methods.*; 52:197– 207.

19. Ching C, Wong BC, Kwok E, Ong L, Covacci A, Lam SK. 1996 Prevalence of *cagA* bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anticagA assay in patients with peptic ulcer disease and in control. *Am. J Gastroenterol.*; 91:949-953.
20. Tummuru MK, Cover TL, Blazer MJ. 1999 Cloning and expresión of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.*;61:1799-1809.
21. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. 1996 *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*.; 93:14648–14653.
22. Gusmão VR, Mendes EN, Queiroz DM. 2000 *vacA* Genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol.*;38:2853–2857.
23. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira NA, Oliveira CA, Magalhães PP, Moura SB, Cabral MMDA, 1998. Nogueira AMMF. *cagA* positive *Helicobacter pylori* and risk

for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int. J. Cancer.* 78:135–139.

24. Blaser MJ. 1996; Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 10 (suppl, 1):73-77.
25. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. 1994 Quantitative culture of *Helicobacter pylori* in the gastric antrum: association of bacterial density with duodenal ulcer status and infection with *cagA* positive bacterial strains, and negative association with serum IgG levels. *Am J Gastroenterol*; 89:1322.
26. Cover, T.L. 1996 The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*;20: 241–246.
27. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. 2001 Clinical relevance of the *babA2* genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol.* ; 39: 2463-5
28. Lai CH, Kuo CH, Chen YC, Chao FY, Poon SK, Chang CS. 2002; High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 40: 3860-2.

29. Yu J, Leung WK, Go MYY, Cjhan MCW, To KF, Ng EKW .
2002 Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status
with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric
lesions. *Gut.*; 51: 480-4.
30. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik
ET, Berg, DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. 1998;
Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histoblood
group antigens revealed by retagging. *Science* 279:373–
377.
31. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp
W, Miehle S, Classen M, Prinz, C. 1999; Clinical relevance
of the *Helicobacter pylori* gene for bloodgroup antigen-
binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12778–
12783],
32. Prinz C, Schoniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E,
Wagenpfeil S, Classen M, Rosch T, Schepp W, Gerhard
M. 2001 Key importance of the *Helicobacter pylori*
adherence factor blood group antigen binding adhesin
during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.*;61:1903–
1909.

33. Cutler AF, Haustad S, Ma C, *et al.* 1995; Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infections. *Gastroenterology* 109:136-41.
34. Goodwin CS, Worsley BW. 1993; Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clin N Amer* 22:5-19.
35. Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, Dowel VR. 1989; Practical procedure for demonstrating bacterial flajellae. *J Clin Microbiol* 16: 948-52.
36. Talley N, Newell D, Ormand J, *et al.* 1991; Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 29:1635-9.
37. Talley N, Newell D, Ormand J, *et al.* 1991; Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 29:1635-9.
38. Marshall BJ, 1988; Surveyor T. Carbon-14 urea breath test for diagnosis fo *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J Nucl Med* 29:11-6.
39. Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr, *et al.* 2000 *Campylobacter pylori* detected by the C-13 urea breath test. *F Rivas-Traverso, F Hernández.* 205 Vol. 11/No. 3/Julio-Septiembre, *Lancet* 1987; 1:1134-7

40. Nilsson HO, Aleljung P, Nilsson I, Tyszhiewicz T, Wadstrom T. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. J Microbiol Meth 1996; 27:73-9.
41. Notarnicola N, Russo F, Cavallini A, *et al.* 1996 PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA faeces from patient with gastroduodenal pathology. Med Sci Res; 24:785-7.
42. Penston J G, Mistry K R. 1996 Eradication of *Helicobacter pylori* in general practice. Aliment Pharmacol Ther; 10(2):139- 45.
43. García A, Barra R, Delgado C, Kawaguchi F, Trabal N, Montenegro S, González C. 2006 Genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori* by *cagA*, *vacA* and *babA2* virulence associated genes. First detection of a *babA2* positive strain in Chilean patients. Rev Méd Chile; 134: 981-988.
44. Martínez T, González C, Kawaguchi P, Montoya R, Corvalán A, Madariaga B, Roa S, García C, Salgado F, Solar H, Pal M. *Helicobacter pylori*: *cagA* status and *vacA* genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. Infect. Dis. 182, 1450– 1454.

45. SI Smith, KS Oyedeji, AO Arigbabu, F Cantet, F Megraud, OO Ojo, AO Uwaifo, JA Otegbayo, SO Ola, AO Coker. 2004 Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *Gastroenterol*;10(13):1958-1960.
46. Morales E, Castillo G, Gonzalez G, Ponce S, Cravioto A, López Y. 1999 Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *CLINICAL MICROBIOLOGY*, , p. 3001–3004
47. Farzad O, Quing Z, Oleastro M, Voland P , Karttunen R, Lars E, Roland R, Prinz C, Markus G. 2005 Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *Medical Microbiology* 44 151–156.
48. Chattopadhyay, S., Patra, R., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Santra, A, Dhali, G.K., Bhattacharya, S.K., Berg, D.E., Nair, G.B., Mukhopadhyay A.K. 2004. Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42:2821-2824.

49. Li, C., Musich, P.R., Ha, T. 1995. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by novel PCR assay. *J. Clin. Pathol.* 48: 662–666.
50. Han YH, Zhong WL, Zhu HY, Shu DX. 2004 Clinical relevance of *iceA* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population. *Chinese Journal of Digestive Diseases*; 5; 181–185.
51. Song, Q.T., Haller, B., Schmid, R.M., Adler, G., Bode, G. 1999. *Helicobacter pylori* in dental plaque. A comparison of different PCR primers sets. *Dig. Dis. Sci.* 44:479-484.
52. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO 2004. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol.* ;10(13):1958-1960.
53. Sicinschi, L.A., Correa, P., Bravo, L.E., Schneider, B.G. (2003). Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. *J. Microbiol. Methods.* 52;197– 207

54. Ramos MLK, Darini E, Carales CF, Merano de CC, Aparicio-Troquez SMC, Heraldo CLL. 2005 *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polimerase chain reaction in gastric biopsias: correlation with histological findings proliferation and apoptosis. Sao Paulo Med. J.; 23(3): 113-118.
55. Gzyl, A., Berg, D.E., Dzierzanowska, D. (1997). Epidemiology of *cagA/vacA* genes in *H. Pylori* isolated from children and adults in Poland. J. Physiol. Pharmacol. 48:333-343.
56. Staat, M.A., Kruszon-Mora, n D., McQuillan, G.M. (1996). A population-based serologic survey of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in the United States. J. Infect. Dis. 174:1120–1123.
57. Kidd, M., Lastovica, A., Atherton, J,, Louw, J. (1999). Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut*. 45: 499-502.
58. Olfat OF, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Bore´n T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Markus G. 2005 Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor

BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol and Medical Microbiol.*; 44:151–156

59. Han YH, Zhong WL, Zhu HY, Shu DX 2004. Clinical relevance of *iceA* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population. *Chinese Journal of Digestive Diseases*; 5; 181–185.
60. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA Jr, Litchfield P, Thomas E. 2002 Comparison of cytotoxin genotypes Of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig Dis Sci*; 8: 1850-1856.
61. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. 1998 Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin Pathol*; 51: 55-61.
62. Donati, M., Moreno, S., Storni, E., Tucci A., Poli, Loris. Mazzoni, C., Varoli, O., Sambri V., Farencena A., Cevenin, R. (1997). Detection of Serum Antibodies to *cagA* and *vacA* and of Serum Neutralizing Activity for Vacuolating Cytotoxin in Patients with *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 478-482.