

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo gramnegativo causante de la infección crónica más frecuente en el hombre, infecta la mucosa gástrica de más del 50% de la población mundial (Chey & Wong, 2007; Kamali-Sarvestani et al., 2006; Linpisarn et al., 2005; Michetti & Svennerholm, 2003). La prevalencia de infección por *H. pylori* a nivel mundial es 10 al 50% en los países desarrollados y cerca del 90% en aquellos países en vías de desarrollo (Moncayo et al., 2006), varía según edad, localización geográfica y estatus socioeconómico de los individuos, existiendo mayor prevalencia en los estatus socioeconómicos bajos (Shahanat et al., 2004; Moncayo et al., 2006).

H. pylori es comúnmente asociado con el desarrollo de patologías gástricas siendo la gastritis crónica la más común (Chey & Wong, 2007). En 1994, fue identificado como el agente causal de la úlcera péptica (Alba et al., 2006; Nomura et al., 2000) y en el mismo año, la Agencia Internacional en Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud declaró a *H. pylori* como agente carcinógeno altamente peligroso en humanos (Ramos et al., 2005; Cava & Cobas, 2003), considerándolo como el principal factor de riesgo para desarrollar adenocarcinoma gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma tipo MALT) (Noy, Yahalom, Zaretsky, Brett & Zelenetz, 2005).

El cáncer gástrico es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo (Shibata et al., 2002). En Ecuador el cáncer gástrico es un serio problema de salud pública, este representa el 12.7% de todos los casos de cáncer con una prevalencia de 29 casos por cien mil habitantes (Debets-Ossenkopp et al., 2003). Según las tasas de incidencia de neoplasia gástrica, publicadas en el VII volumen de "Cancer Incidence in Five Continents" (CI5vol.VII), las mujeres ecuatorianas se sitúan en décimo primer lugar a nivel mundial y los hombres en décimo quinto, lo que refleja una alta incidencia (Corral, Cueva & Yépez, 2004). En los últimos años en la mayor parte de países se ha ido identificando una tendencia decreciente a desarrollar esta neoplasia, sin embargo en nuestro país por el contrario, la frecuencia está aumentando (Corral et al., 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica biotecnológica que permite amplificar el ADN. Su proceso es básicamente copiar entre cien y cientos de miles un fragmento determinado de cualquier genoma. Por su alta especificidad y sensibilidad ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo (*Premoli et al., 2004*).

Con la revolución de las técnicas moleculares, la PCR, se ha constituido en uno de los métodos más útiles y eficaces en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, mejorando la eficacia diagnóstica, complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido del agente etiológico, abriendo una nueva etapa de diagnóstico denominado diagnóstico molecular (*Qiang, Wang, Osato & Lachman, 2002*). La técnica molecular de PCR exige ciertas especificaciones y requerimientos, pero una vez estandarizados, convierten a la PCR en una técnica óptima, rápida y menos compleja que reduce el tiempo de diagnóstico y costos (*Ho & Windsor, 2000*).

Como método diagnóstico, la PCR se ha convertido en uno de los métodos más eficaces para el diagnóstico de *H. pylori*. Según la guía de manejo para infecciones de *H. pylori* del American College of Gastroenterology en el 2007, la PCR es una técnica de diagnóstico altamente específica y mucho más sensible que otras técnicas de diagnóstico basadas en la utilización de biopsias (*Chey et al., 2007*).

El método de diagnóstico principalmente utilizado para el diagnóstico de *H. pylori* por su buena especificidad y sensibilidad, es el estudio histopatológico. Sin embargo, en el 2006, Zsikia y colaboradores comprobaron que la PCR incrementa la detección de *H. pylori* hasta un 20% más que la histopatología. Otros estudios previos concuerdan con los resultados de esta investigación y respaldan tal afirmación. Yamamura y colaboradores, en 1999, en una comparación entre el PCR y métodos convencionales para el diagnóstico de *H. pylori*, concluye que el PCR es el método más sensitivo y específico; y que incrementa la detección de este microorganismo; Domez-Altuntas et al., 2002; Kisa et al., 2002 y Vinette et al, 2004. Concuerdan con los datos de Vinette variando el incremento de detección de 10 a 20 %. La PCR no solo se puede utilizar como método diagnóstico para la detección de *H. pylori* sino que también permite la identificación de sus diferentes cepas, por lo que abre importantes perspectivas en estudios sobre genotipificación y resistencias bacteriana a antibióticos

(Chey & Wong, 2007; Oh et al., 2006; Kamali-Sarvestani et al., 2006; Woodford & Sundsfjord, 2005, Peña et al., 2000)).

1.2. Justificación del problema:

Considerando que *Helicobacter pylori* es uno de los factores de alto riesgo para desarrollar neoplasia gástrica, considerado agente carcinógeno tipo 1, el hecho de que en el Ecuador el 90 % de la población podría encontrarse infectada por este microorganismo, por la elevada prevalencia de infección en nuestro país (Debets-Ossenkopp et al., 2003), que el cáncer gástrico sea un serio problema de salud pública, con una prevalencia de 29 casos por cien mil habitantes, y que la tendencia a desarrollar esta neoplasia este aumentando (Corral et al., 2004); justifica la necesidad de contar con un método diagnóstico que presente alta especificidad, sensibilidad y eficacia en la detección de este microorganismo, el mismo que ayude y permita la implantación de medidas preventivas así como correctivas a tiempo.

La técnica por PCR responde a estas necesidades y compensa debilidades de otras técnicas de diagnóstico para *H. pylori*, ya que es una técnica con una especificidad y sensibilidad semejante y superior a la técnica considerada el gold estándar como es la de cultivo (Chey & Wong, 2007), por lo que una vez estandarizada, la PCR es una técnica óptima, rápida y menos compleja, que reduce el tiempo de diagnóstico y sus costos. Con la implementación de la técnica de diagnóstico por PCR se genera información sustantiva para la toma de decisiones en el manejo terapéutico del paciente infectado por *H. pylori*, así como el postratamiento y la erradicación de la bacteria.

El establecer el PCR como una técnica estándar y que se utilice como herramienta de diagnóstico, en los servicios públicos y privados del país, podría incrementar la calidad de vida de las personas, favorecer su salud y disminuir la probabilidad de que las patologías gástricas progresen a patologías más severas como es el caso del cáncer gástrico, las mismas que tienen importante impacto social y económico, por el elevado costo asociado a su tratamiento.

Los datos obtenidos en este estudio permitirán implementar la técnica de diagnóstico molecular para *H. pylori*, permitiendo tener una herramienta de diagnóstico

eficaz, consolidando el desarrollo científico y tecnológico del país, más aun cuando la evolución de la Medicina va de la mano con la Biotecnología.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- Optimizar la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa, para el de diagnóstico de *H. pylori* en mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas y requerimientos para la realización de la técnica molecular de PCR para el diagnóstico de *H. pylori*.
- Determinar por diagnóstico molecular, la prevalencia de infección por *H. pylori* en mucosa gástrica de la población estudiada.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de diagnóstico molecular por PCR para *H. pylori* en la mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos en comparación con el método diagnóstico de histopatología considerado el gold estándar en Ecuador.

1.4. Marco teórico:

1.4.1. Anatomía del estómago

El estómago es un órgano muscular que conecta el esófago con el intestino delgado. Su principal función es la descomposición de los alimentos, formando una papilla llamada quimo. Las células de su revestimiento secretan enzimas, ácido clorhídrico y otros productos químicos que continúan el proceso digestivo que comienza en la boca. También produce sustancias mucosas que impiden el contacto del ácido con las propias paredes del estómago (*Feldman et al., 2002*). El estómago produce grandes cantidades de ácido clorhídrico que permiten destruir a las bacterias que llegan hasta allí y también activar sustancias que sirven para la digestión de elementos complejos como las proteínas.

Para protegerse del ácido, el estómago produce suficientes cantidades de moco que contiene abundante bicarbonato, cuya función es neutralizar el ácido. Esta capa de moco es un aislante natural que evita el contacto del ácido con las células de la parte

más interna del estómago (mucosa). El estómago también cuenta con otros mecanismos de defensa entre los que destacan: la capacidad de restaurar las células perdidas de manera rápida y también mejorar el flujo sanguíneo a la mucosa para poder llevar a cabo de manera exitosa el proceso de cicatrización. El estómago es un órgano importante que puede padecer múltiples enfermedades, unas más leves, como la gastritis y la úlcera, y otras más graves, como el cáncer y las úlceras sangrantes.

El estomago esta formado por el **CARDIAS**, que es un esfínter que comunica el esófago con el estómago, regula la entrada de alimentos e impide que haya reflujo en su normal funcionamiento. El **FUNDUS** es la porción superior del estómago, donde comúnmente se produce la acumulación de gases. El **CUERPO** es la parte que ocupa la mayor parte del estómago, y el **ANTRO** es una zona de estrechamiento que sirve de antesala al píloro o denominado **ESFÍNTER PILÓRICO**, que es el que une el final del estómago con la primera porción del intestino delgado, el duodeno.

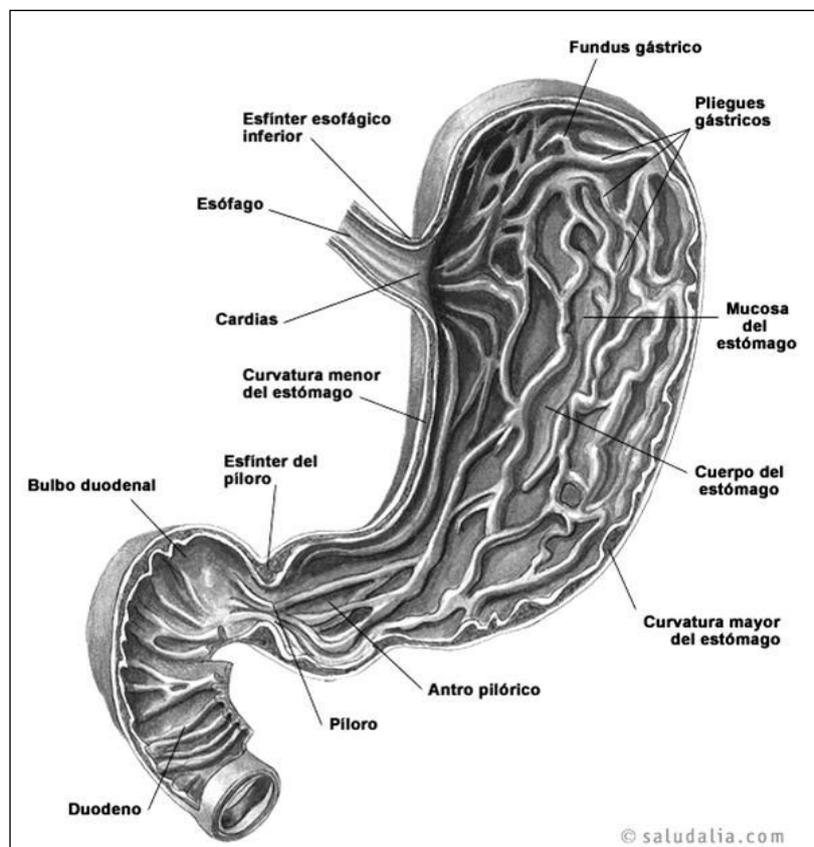


Figura 1.1 Anatomía del estómago y partes que lo conforman.

1.4.2. Patologías gástricas y su asociación con *Helicobacter pylori*

Las patologías gástricas más frecuentes son las alteraciones ácido-pépticas, ocasionadas cuando los ácidos secretados en el estómago dañan a la mucosa que lo reviste, dentro de este grupo de alteraciones se encuentran la úlcera gástrica y la gastritis (Chen, Yan & Shen, 2005); estas patologías pueden agudizarse y convertirse en patologías más severas como adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT, (Noy, Yahalom, Zaretsky, Brett & Zelenetz, 2005).

Hasta antes del año 1983 la concepción médica respecto a las enfermedades relacionadas con el ácido, conocidas como gastritis, úlcera gástrica o úlcera duodenal se basaba en la teoría del desequilibrio entre los factores protectores del estómago como el duodeno y los factores agresores (Morales et al., 2001). En 1985 Marshall y Warren cambiaron la historia, al demostrar que una bacteria tenía relación o era la causante de estas enfermedades. Marshall y Warren postularon que la bacteria entonces llamada *Campylobacter* era la causante o por lo menos tenía alguna relación con estas enfermedades; sin embargo, ante el desinterés de la comunidad médica, uno de ellos decidió tomar caldo de cultivo con una gran cantidad de estas bacterias y el resultado fue que unas semanas después sufrió enfermedad ulcero-péptica (Alba et al., 2006). A partir de estos informes la comunidad médica volteó los ojos a esta nueva teoría y se desató una “fiebre” de investigación, la cual nos ha llevado al conocimiento inequívoco de que esta bacteria hoy denominada *Helicobacter pylori*, es la causante de la mayoría de los casos de gastritis (Piñol & Paniagua, 2000), 95% de las úlceras duodenales (Chen, Yan & Shen, 2005), y 90% de las úlceras gástricas (Nomura et al., 2000).

En 1994 *H. pylori* fue identificado como el agente causal de la úlcera peptídica (Alba et al., 2006) y en el mismo año, la Agencia Internacional en Investigación del Cáncer declaró a *H. pylori* como carcinógeno tipo I en humanos (Cava & Cobas, 2003), además, ha sido asociada con el descubrimiento de linfomas gástricos non-hodgkins (European *Helicobacter pylori* Study Group, 2000) y con otros desórdenes linfoproliferativos, linfoma tipo MALT (Noy et al., 2005), adenomas, adenocarcinoma de colon, posibles adenocarcinomas pancreáticos, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, pero sin embargo, el mecanismo detallado de cómo *H. pylori* causa la enfermedad continúa siendo incierto (Cava & Cobas, 2003).

1.4.3. *Helicobacter pylori*

1.4.3.1. Generalidades

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo gramnegativo causante de la infección crónica más frecuente en el hombre, infecta la mucosa gástrica de más del 50% de la población mundial (Chey & Wong, 2007; Kamali-Sarvestani et al., 2006; Linpisarn et al., 2005; Michetti & Svennerholm, 2003). La prevalencia de infección por *H. pylori* a nivel mundial es 10 al 50% en los países desarrollados y cerca del 90% en aquellos países en vías de desarrollo (Moncayo et al., 2006). Es asociado con el desarrollo de gastritis crónica, úlcera péptica, y se lo considera como uno de los factores de alto riesgo para desarrollar adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (Shibata et al., 2002).



Fuente: (Kunkel, 2004)

Figura 1.2 Fotografía de microscopía electrónica de *Helicobacter pylori*.

Este microorganismo causa una intensa reacción inflamatoria. Los factores que sostienen la misma no están totalmente esclarecidos. *H. pylori* recluta células inflamatorias que infiltran y lesionan la mucosa gástrica (Rivas & Hernández, 2000), así se constituye en el principal agente causante de enfermedades gástricas inflamatorias crónicas (Michetti & Svennerholm, 2003). Uno de los problemas es el desconocimiento de otras infecciones bacterianas crónicas de la mucosa gástrica en el hombre, por lo que el conocimiento del proceso inflamatorio o los factores de virulencia de otras enfermedades infecciosas difícilmente pueden ser extrapolados a la infección por *H. pylori*. La infección estimula la respuesta inflamatoria local y sistémica gracias al estímulo inmunológico que representa la difusión de sustancias quimiotácticas a través del epitelio, que activan los neutrófilos y el resto de células inflamatorias (Kamali-Sarvestani et al., 2006). De acuerdo con un nicho ecológico tan restrictivo, *H. pylori* presenta una gran capacidad de biosíntesis y reparación, en un intento por adaptarse al medio. La supervivencia en condiciones tan ácidas depende, en parte, a su habilidad para generar un potencial positivo intracitoplasmático en condiciones de bajo pH.

1.4.3.2. Epidemiología

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la infección por *H. pylori* ocurre en el 50 % de la población mundial (Morales et al., 2000). Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente (Logan & Walker, 2001). A nivel mundial la prevalencia es del 40 al 50% en los países desarrollados y cerca del 90% en aquellos países en vías de desarrollo (Moncayo et al., 2006; Suerbaum & Michetti, 2002). La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía según edad, localización geográfica y estatus socioeconómico de los individuos (Shahanat et al., 2004; Chey & Wong, 2007) existiendo mayor prevalencia en los estatus socioeconómicos bajos (Shahanat et al., 2004; Moncayo et al., 2006; Chey & Wong, 2007).

El modo de transmisión de *H. pylori* es ampliamente discutido, algunas evidencias sugieren que este ocurre predominantemente por contacto de persona a persona vía oral (Suerbaum & Michetti, 2002), otros autores proponen la vía fecal-oral, y recientemente ha sido sugerido que la bacteria puede existir de forma natural en el ambiente (Shahamat et al., 2004).

1.4.3.3. Microbiología

H. pylori es un bacilo gram-negativo móvil, de morfología espiralar y un tamaño de 2,5 a 5 μm (Marshall, 2000; Ramírez *et al.*, 2002), que crece lentamente a 37°C, en condiciones de microaerofilia, en medios de cultivo con requerimientos nutricionales especiales (Siu *et al.*, 1998). Es catalasa, oxidasa y ureasa positivo (Premoli *et al.*, 2004). La morfología de sus colonias resulta característica por el pequeño tamaño de las mismas y su aspecto brillante. El crecimiento en medio líquido se ve favorecido por la agitación. Tras subcultivos prolongados, aparecen las denominadas formas cocoides, metabólicamente activas pero no viables para ser cultivadas de nuevo *in vitro* (Shahamat *et al.*, 2004). Posee de cuatro a seis flagelos de aproximadamente 30 μm de longitud (García, 2006).

1.4.3.4. Genoma y Patogenicidad

En 1997, Tomb describió la secuencia completa del genoma de *H. pylori*. La secuencia se obtuvo por métodos de secuenciación randomizada, que previamente se habían utilizado en la obtención del genoma de *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* y *Methanococcus jannaschii* (Oh *et al.*, 2006).

La cepa *H. pylori* 26695, aislada originalmente de un paciente de Reino Unido con gastritis, se escogió por su capacidad de colonizar cerdos y provocar en ellos una respuesta inmunitaria e inflamatoria. Se trata de una cepa toxigénica (*vacA* +), que presenta un genoma circular de 1.667.867 pares de bases y 1.590 genes, con un tamaño medio de 945 pares de bases cada uno, muy similar al observado en otras células procariontas. Más del 70 % de sus proteínas tienen un punto isoelectrico mayor a 7.0, comparado con el 40 % de *H. influenzae* y *E. coli* (Morales *et al.*, 2000). Los aminoácidos básicos -arginina y lisina- están presentes con una frecuencia doble en *H. pylori* respecto a *H. influenzae* y *E. coli*, lo que quizás refleja su adaptación al medio gástrico ácido. Al menos cuarenta proteínas del genoma de *H. pylori* se encuentran implicadas en la regulación, secreción y ensamblaje de la arquitectura flagelar que provee de movilidad a la bacteria y es esencial para la colonización. Además aproximadamente el 40 % de los aislamientos de *H. pylori* presentan plásmidos, con un tamaño que oscila entre de 1,5 a 23,3 kb, pero estos no contienen ninguno de los factores de virulencia conocidos (Oh *et al.*, 2006).

El hecho de que *H. pylori* no tenga competidores en su nicho ecológico, le proporciona una ventaja competitiva en su evolución, mediante una asombrosa habilidad para reorganizar su genoma, con una amplia variedad genotípica y fenotípica no solo entre cepas, sino también dentro de un mismo individuo infectado (*Oh et al., 2006*).

La relación entre factores de patogenicidad y la virulencia de las cepas no es claramente conocida, pero se ha vinculado cepas virulentas a las cepas que son positivas para los genes *vac A* y *cag A* (*Chen, Yan & Shen, 2005*). La variabilidad genómica entre cepas, puede tener repercusiones en la respuesta inflamatoria provocada por el microorganismo (*Shibata et al., 2002*), y se conoce que las cepas virulentas pueden codificar una de las proteínas citotóxicas o las dos simultáneamente incrementando la severidad de la patología (*Woodford & Sundsfjord, 2005*).

Aproximadamente el 60 % de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por genes localizados en la isla de patogenicidad (*cag*-PAI), y estos están estrechamente relacionados con el sistema de secreción tipo IV (*Bauer et al., 2005*), el mismo que permite inyectar las proteínas citotóxicas directamente de la bacteria al interior de la célula epitelial gástrica, mediado por una estructura en forma de jeringa (*Kamali-Sarvestani et al., 2006*). La isla de patogenicidad (*cag*-PAI) tiene un tamaño de aproximadamente 40 Kb, con alrededor de 40 genes, incluyendo el *picB* requerido para inducir la producción de interleuquina-8 por las células del epitelio gástrico (*Ramos et al., 2005*). La isla puede estar organizada de diferente forma dependiendo de la cepa (*Bauer et al., 2005*), por ejemplo en forma continua en una misma región o estar dividida en dos regiones *cag I* y *cag II* por secuencias del cromosoma bacteriano, flanqueando por una secuencia de inserción (IS605). Estas variaciones en la estructura de (*cag*-PAI) pudieran explicar la existencia de cepas (*cag*-PAI) negativas y (*cag*-PAI) positivas (*Morales et al., 2001*), sin embargo, la variabilidad de entre cepas no solo está dada por la organización de (*cag*-PAI), sino por otras regiones en el cromosoma de las cepas.

El gen *vacA*, de 3,9 kb de tamaño, codifica una proteína de 139 kDa con una secuencia líder de 33 aminoácidos y un fragmento C-terminal de aproximadamente 50 kDa, la citotoxina induce la formación de vacuolas en las células epiteliales del huésped (*Chen, Yan & Shen, 2005*), y su presencia se ha asociado con la capacidad de producir

lesión tisular y enfermedad ulcerosa (*Nomura et al., 2000*), además es producida aproximadamente por la mitad de las cepas de *H. pylori* (*Liviu, Sicinschi, Correa, Bravo & Schneider, 2003*).

El gen *cagA* está posicionado en uno de los extremos de la isla de patogenicidad (*cag*-PAI), y codifica la proteína asociada a citotoxicidad (CagA), la misma que tiene un peso molecular alrededor de 128 kDa, se describe en diversas cepas citotóxicas de *H. pylori*, juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (*Woodford & Sundsfjord, 2005*), esta altamente implicada con el sistema de secreción tipo IV (*Bauer et al., 2005*) y el desarrollo de úlceras gástricas, úlceras duodenales (*Nomura et al., 2000*) y con un aumento en el riesgo para desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico (*Kamali-Sarvestani et al., 2006; Ramos et al., 2005; Morales, 2001*)

1.4.3.5. Patogénesis

Se ha propuesto varios mecanismos de virulencia para *H. pylori*. La actividad ureasa del *H. pylori*, incrementa la concentración de amoníaco a cuatro veces superior a la del moco de un estómago no infectado (*García, 2006*). El amoníaco puede ser un lesionante directo, pero también es el causante de un aumento del pH, lo que puede alterar la interacción entre las fracciones lipídica y proteica del moco, responsable de la estabilización de la estructura micelar del mismo. Otros factores de virulencia del *H. pylori* son las proteínas superficiales, algunas de las cuales están implicadas en los fenómenos de adhesión (*Rivas & Hernández, 2000*), y en la alteración de la arquitectura del epitelio mucoso gastroduodenal, relacionándose con la actividad endotóxica de la bacteria, dicha toxicidad estaría ligada a un lipopolisacárido (LPS) de la superficie del *H. pylori* (*Woodford & Sundsfjord, 2005; Michetti & Svennerholm, 2003*).

En lesiones digestivas mediadas por LPS bacterianos, han sido implicados fosfolípidos de bajo peso molecular, tales como el factor activador plaquetario (PAF), cuya actividad se ha detectado en cultivos de *H. pylori*, con las mismas propiedades biológicas y fisicoquímicas que el PAF liberado por diversas células eucariotas (*Michetti & Svennerholm, 2003*).

Otro efecto de la infección por *H. pylori*, es la activación de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (*Gerwitz et al., 2004*), que se traduce en un

profuso infiltrado inflamatorio de las áreas superficiales mucosas. Este efecto está mediado por la interleuquina-8 (IL-8) (*Kamali-Sarvestani et al., 2006*). La activación de los PMN da lugar a la producción de citoquinas, aumento de los fenómenos oxidativos locales y de la expresión de moléculas de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) (*Bauer, Moese, Barfed, Meyer & Selbach, 2005*). Las células mucosas gástricas también expresan ICAM-1, lo que, junto a la producción de IL-8, puede constituir el núcleo de los fenómenos inflamatorios inducidos por la infección de *H. pylori* (*Yamaoka et al., 1998; Michetti & Svennerholm, 2003*).

Aproximadamente, la tercera parte de las cepas inducen fuerte actividad oxidativa mediada por PMN (*Rivas & Hernández, 2000*). La presencia de mecanismos lesionales gástricos mediados por linfocitos-T es otro factor de importancia. Se ha comprobado que, la infección por *H. pylori*, produce un incremento pronunciado de la población linfocitaria T CD4+, una importante fracción de las cuales expresan en su superficie receptores para interleuquina-2 (IL-2), acompañado de un aumento de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II (*Piñol & Paniagua, 2000*). Las proteínas citotóxicas de *H. pylori* estimulan también, directa o indirectamente, la proliferación y diferenciación de la población CD4+, dando lugar a la producción de un exceso de citoquinas y sustancias con toxicidad directa como el factor de necrosis tumoral (TNF) (*Gómez, 2001; Michetti & Svennerholm, 2003*).

1.4.3.6. Diagnóstico y técnicas

El diagnóstico de la infección de *H. pylori* puede establecerse por métodos directos, cuando se detecta la presencia del microorganismo en muestras obtenidas por endoscopia (cultivo, test de la ureasa, tinciones histológicas, técnicas moleculares) (*Logan & Walker, 2001*), a estos métodos también se los define como métodos invasivos por el requerimiento previo de una endoscopia digestiva para la obtención de tejido gástrico (biopsia) (*Roosendaal et al., 1994*). Por el contrario, las pruebas diagnósticas no invasivas o indirectas no requieren endoscopia, puesto que se aplican, en base al estudio de alguna propiedad del microorganismo (prueba del aliento con urea-C13 o urea-C14) (*Gatta, Ricci, Tampieri & Vaira, 2003*), respuesta inmune específica por serología (*Zapatier, Gómez, Vargas & Maya, 2007*), o métodos moleculares como el PCR utilizando diferentes tipos de muestras como saliva, muestras

de heces (*Bindayna, Al Baker & Botta, 2006*) o muestras ambientales (*Shahamat et al., 2004*).

Años atrás el gold estándar para la identificación de *H. pylori*, era el método por cultivo microbiológico (*Heep et al., 1999*), Hoy en día, el uso de un solo método diagnóstico no puede ser considerado como el gold estándar para confirmar la infección, más bien la prueba más apropiada se vera influenciada por cada situación específica, las circunstancias clínicas, la alta probabilidad de que exista infección, así como la disponibilidad y costo de las pruebas de diagnóstico individuales (*Chey & Wong, 2007*).

En el Ecuador el método estándar utilizado para la detección de *H. pylori* es el estudio histopatológico en biopsias de mucosa gástrica.

1.4.3.6.1. Examen endoscópico o gastroscopía

La gastroscopía es una exploración del principio del tubo digestivo (esófago, estómago y primera porción del duodeno) que se realiza mediante un gastroscopio, un instrumento en forma de tubo largo y flexible de fibra óptica conectado a una cámara y a una fuente de luz. Introducido por la boca, permite el examen con visión directa de las lesiones en el interior del esófago, estómago y duodeno, y la toma de muestras de tejido si fuese necesario (biopsia) para su examen microscópico. El gastroscopio puede estar conectado a un monitor de TV, y permite la realización de fotografías, así como la grabación del proceso en cinta de vídeo. Este examen suelen realizarlo los gastroenterólogos o cirujanos, en unidades especializadas dentro del hospital o clínica (*Roosendaal et al., 1994*). No es un procedimiento doloroso, pero puede provocar náuseas. Por eso se aplica anestesia local con atomizador sobre la garganta, y puede administrarse un sedante ligero. La exploración suele completarse en 10-15 minutos, y el paciente puede dejar el hospital poco después (*Feldman, et al., 2002*).

La gastroscopía es la mejor forma de diagnosticar úlceras de estómago o duodeno, gastritis, hernias de hiato (que son hernias del estómago), y es muy valiosa para detectar tumores de esófago, estómago y duodeno.

La ventaja frente a exámenes como radiografías con contraste oral (bario) del tubo digestivo superior, es que el examen endoscópico es más exacto, y gracias a la obtención de biopsias no solo se realiza un estudio macroscópico sino también

microscópico, que permite obtener información adicional sobre lo que esta causando la enfermedad.

1.4.3.6.2. Cultivo microbiológico.

Años atrás el principal método diagnóstico para *H. pylori* era el método de cultivo, considerado el gold estándar, pero un gold estándar imperfecto. Aunque presenta 100% de especificidad (*Samuels et al., 2000*), difícilmente se ha obtenido porcentajes de sensibilidad superiores a 90% como consecuencia de los exigentes requerimientos y difícil reproductividad de la técnica (*Bindayna et al., 2006*). *H. pylori*. Es un microorganismo de crecimiento lento, toma de 7 a 14 días para poder apreciar las colonias en medios sólidos, y para su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales como cloruro de sodio y bisulfito de sodio suplementados con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o ambos (*Heep et al, 1999*). Para la obtención de resultados, se deben cultivar por lo menos una biopsia de antro y dos de cuerpo gástrico. Los resultados del cultivo están en dependencia de la demora en el transporte y de las condiciones de conservación de la muestra (*Heep et al., 1999*). Otro factor muy importante son las condiciones de incubación que deben realizarse en una jarra de microaerofilia utilizando generadores comerciales, y a una temperatura de 35-37 grados centígrados (*Chillihua et al. 2004*).

Conceptualmente el cultivo es una técnica atractiva porque no solo permite la detección de la bacteria sino que habilita además el estudio de resistencias bacterianas a antibióticos. Este método diagnóstico es altamente recomendado en personas que ya han tomado tratamiento para erradicar la infección, sin embargo que no lo han logrado, permitiendo por este método establecer que tipo de resistencias tiene el microorganismo y modificando el tratamiento para una erradicación definitiva (*Chey & Wong, 2007*).

La desventaja de ser microorganismos de crecimiento lento, los requerimientos nutritivos especiales de la bacteria, los elevados costos y la difícil estandarización de la técnica; hace que este método diagnóstico no se lo realice comunmente en cualquier laboratorio clínico.

1.4.3.6.3. Estudio histológico.

El estudio histológico además de detectar la infección por *H. pylori* de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa (Chey & Wong, 2007). La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. La técnica de tinción a partir de biopsia gástrica es una técnica fácil, rápida y de alta utilidad en el estudio de la infección por el microorganismo (Chillihua et al., 2004). Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Gram modificada o bien el examen en fresco utilizando un microscopio con contraste de fases (Rotimi et al., 2000), para determinar el diagnóstico de la infección y conocer el grado de la patología gástrica se ha utilizado coloraciones tales como tinciones de Giemsa, carbolfuchina, la tinción triple de carbolfuchina/azul de Alcina/hematoxilina-eosina y tinciones de inmunohistoquímica (Rotimi et al., 2000).

La visión microscópica provee una sensibilidad y especificidad de 95% y para obtener buenos resultados es necesario manejar en forma eficaz la técnica. La desventaja que muestra esta técnica es que si la biopsia gástrica obtenida, no es representativa o presenta un número muy bajo de bacterias, puede ofrecer falsos negativos (Yamamura et al., 1999). Según esto, a mayor número de muestras aumentará la sensibilidad, por lo cual para conseguir una buena sensibilidad se recomienda partir por lo menos de dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo (Ramos et al., 2005). Otros factores aparte del número, son: el lugar de donde son requeridas, el tamaño de la biopsia, la tinción a utilizarse y el nivel de experiencia de examinación del patólogo que realiza el estudio histológico, lo que le convierte en un método diagnóstico costoso.

La histopatología es significativamente afectada por el uso de medicamentos tales como bismuto y antibióticos, lo que puede reducir la densidad bacteriana en la biopsia y en su estudio presentar falsos negativos (Chey & Wong, 2007).

1.4.3.6.4. Test rápido de la ureasa

H. pylori posee una enzima (*ureasa*) que le capacita para la colonización y persistencia en la cavidad gástrica (Moncayo et al., 2006). La enzima cumple tres funciones principales: protección frente al ácido de la mucosa gástrica, provisión de nitrógeno en forma de amonio y como factor de virulencia en la patogenia de la úlcera

gástrica (*Linpisarn et al., 2005*). El fundamento de la prueba rápida de la ureasa consiste en detectar la presencia de la enzima de la siguiente forma: *H. pylori* descompone la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, lo cual genera un pH básico que va a ponerse en evidencia mediante el cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa fuerte debido a la acción del indicador de pH (*García, 2006*).

La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica, obtenida mediante endoscopia, su rendimiento depende del inóculo presente en la mucosa gástrica facilitado en la endoscopía.

En pacientes que no han tomado tratamiento para *H. pylori* la prueba rápida de la ureasa tendrá una sensibilidad de 90%, pero esta puede ser reducida en los casos donde el paciente ha tomado tratamiento, al igual que la histopatología el uso de medicamentos afectara la sensibilidad y posee 95 % de especificidad (*Moncayo et al., 2006*).

1.4.3.6.5. Serología

La infección por *H. pylori* provoca una respuesta inmunológica local y sistémica con un incremento de la secreción de IgM e IgG (*Zapatier et al., 2007*). Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero, saliva u orina (*Gatta et al., 2003*). Esta técnica es útil como primera aproximación al diagnóstico, con una sensibilidad y especificidad de 85% y 79% respectivamente. La principal limitación de esta técnica consiste en que no distingue entre una infección activa y una infección que ya haya sido erradicada, por lo que no es útil para determinar la erradicación de la enfermedad (*Gómez et al.2004*). Se debe a que la propia naturaleza de las inmunoglobulinas, los títulos generados en el suero del paciente, disminuyen lentamente pero no desaparecen, por lo que no pueden utilizarse para determinar si ha existido una erradicación de la bacteria. Esta técnica de enzimoimmunoanálisis se realiza en forma de test (positivo/negativo) o mediante varias técnicas cuantitativas más específicas como, por ejemplo, la basada en la inmunofluorescencia (*Monteiro et al., 1997; García, 2006*).

La ventaja que presenta esta técnica son los bajos costos que presenta (*Chey & Wong, 2007*), su disposición y los rápidos resultados, pero solo es recomendada a

pacientes que no han sido previamente diagnosticados o que no han tomado previamente tratamiento para *H. pylori*.

1.4.3.6.6. Prueba de la [13C]-Urea o prueba del aliento

El fundamento de la prueba consiste en detectar la actividad de la enzima ureasa. Se realiza mediante la recogida del aliento basal y del aliento tras 20 minutos de la administración oral de [¹³C]-urea. El aumento de la [¹³C]-urea en el aliento se expresa como una diferencia absoluta por el cociente [¹³C]-urea/[¹²C]-urea (*Gatta et al., 2003*). La medición del ¹³C se realiza bien por espectrometría de masas del cociente de los isótopos o por espectrometría de infrarrojos. Esta prueba, realizada correctamente, tiene una sensibilidad del 98,2% y una especificidad del 97,9% cuando se compara con un patrón de referencia en base a métodos invasivos. La prueba del aliento con [¹³C]-urea se considera el método de elección para confirmar la erradicación de la infección en los pacientes con úlcera duodenal ya que, una vez que *H. pylori* ha desaparecido, cesa completamente la producción de ureasa (*García, 2006*).

Las principales desventajas que presenta este método, son los elevados costos, y su difícil acceso para su realización, puesto que para realizarlo se necesita contar con equipos altamente sofisticados que en muchos casos difícilmente están disponibles.

1.4.3.6.7. Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del ADN de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica pero también en otras muestras como heces, saliva o agua (*Zsikia et al., 2006; Shahanat et al., 2004, Liviu et al. 2003*). La mayoría de las técnicas se basan en la PCR, tanto clásica como en tiempo real, proveen una especificidad total y alta sensibilidad, además de un diagnóstico rápido (*Ho & Windsor, 2000*). El objetivo de estas ha sido la detección de genes específicos de la bacteria, detección de factores de virulencia (*Bindayna et al., 2006*), detección de mecanismos de resistencia (*Chen et al., 2005*), y un rápido y eficaz diagnóstico (*Chey & Wong, 2007*). Como método diagnóstico, la PCR se ha convertido en uno de los métodos mas eficaces para el diagnóstico de *H. pylori*. Según la guía de manejo para infecciones de *H. pylori* del American College of Gastroenterology en el 2007, la PCR es una técnica de diagnóstico altamente específica

y mucho mas sensible que otras técnicas de diagnóstico basadas en la utilización de biopsias (*Chey & Wong, 2007; Pacheco et al., 2001*).

La PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para, una vez iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia (*Di-Bonaventura et al., 2004*), y es también recomendada en pacientes que evidencian tener resistencias bacterianas, por lo que la genotipificación es recomendable (*Bindayna et al., 2006; Chen et al., 2005*).

La principal desventaja que presenta, es que necesita de infraestructura adecuada para el desarrollo de su proceso, y personal entrenado. La PCR una vez estandarizada se convierte en una técnica óptima, fácil de ejecutar, y no costosa (*Ho & Windsor, 2000*).

1.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica biotecnológica que permite amplificar o reproducir in vitro pequeñas cantidades de una región específica de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud (*Premoli et al., 2004*). La reacción en cadena de la polimerasa o PCR de sus siglas en inglés (Polimerase Chain Reaction) fue desarrollada por Karry Mullis en 1985, motivo por el cual se le otorgó el premio Nóbel en 1993.

Esta técnica es de gran adaptabilidad en una variedad de campos incluidas la biología molecular, la biotecnología, la genética, la epidemiología, las ciencias forestales, la microbiología, las ciencias forenses, el diagnóstico de enfermedades infecciosas entre otras (*Ho & Windsor, 2000*).

Los componentes que permiten que esta técnica se desarrolle son: El ADN molde, los primers o cebadores, la enzima ADN polimerasa, y los desoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs).

1.4.4.1. Componentes del PCR

a) ADN molde

El ADN molde es el que contiene el fragmento que será amplificado y que servirá como plantilla para realizar copias sucesivas de la secuencia deseada. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas (*Ausubel et al., 2002*).

b) Primers o cebadores

A los primers también se los denomina cebadores o iniciadores, son secuencias nucleótidas cortas (entre 15-30 bases) complementarias a secuencias específicas ubicadas en los extremos de la secuencia del ADN que se desea amplificar. Su función es delimitar o flanquear la zona del ADN por amplificar y que va a servir con secuencia iniciadora para que la polimerasa comience su labor de replicación. Cada primer se unirá a su secuencia complementaria en el extremo 3' de cada hebra del ADN (*Ausubel et al., 2002*).

c) Enzima ADN polimerasa

La ADN polimerasa es la enzima capaz de replicar el ADN y además corregir posibles errores durante el proceso de inclusión de nucleótidos a la cadena en formación. En esta técnica se necesitan polimerasas termoestables que funcionen a las altas temperaturas que el proceso exige, por este motivo, se utilizan enzimas de bacterias que crecen en manantiales térmicos (alrededor 100°C), tales como *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Veni), *Thermus thermophilus* (Tth) (*Ausubel et al., 2002*).

La más utilizada es la Taq polimerasa, su temperatura óptima de trabajo es de 72°C. Trabaja a un Ph de 7.0-7.5 y adiciona nucleótidos al primer, a una velocidad de 100 nucleótidos/segundo. Además, es muy sensible a las concentraciones de Mg, KCl o NaCl del medio en el cual opera. Esta enzima realiza la síntesis de una de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'- 3' usando como molde una de las hebras de ADN (*Ho & Windsor, 2000*).

d) Desoxinucléotidos trifosfatos (dNTPs)

Son el sustrato para la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, los mismos que son incorporados por la ADN polimerasa en un orden específico complementario a las cadenas molde. Son resistentes al calor y tienen una vida media mayor a 40 ciclos de PCR (*Ausubel et al., 2002*).

1.4.4.2. Etapas para el desarrollo del PCR

La técnica se desarrolla con la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (*Tiveljung et al., 1998*) y se basa en la repetición de un ciclo formado por tres procesos: la desnaturalización, la hibridación, y la extensión (*Premoli et al., 2004; Ausubel et al., 2002*).

a) Desnaturalización del ADN de doble cadena

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras por ruptura de los puentes de hidrogeno que la unen una con la otra. Para ello se realiza una incubación elevando la temperatura a un nivel promedio de entre (93-97°C), y la renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

b) Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

En el segundo paso llamado hibridación o también conocido como “fase de apareamiento o de Annealing” los primers se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar, esto se realiza en propiedad a la disminución en la temperatura entre 50-65°C.

c) Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'-> 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucléotidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidenucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla

de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual la enzima ADN polimerasa actúa (*Ausubel et al., 2002*).

Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación exponencial del segmento de ADN delimitado por los primers (*Premoli et al., 2004*).

1.4.4.3. La PCR convencional en el contexto de la microbiología clínica

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha, y la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio u otra tinción y mediante hibridación con sondas específicas (*Quiang et al., 2002*).

En el ámbito de la microbiología clínica, la PCR se ha aplicado en tres grandes campos como son el diagnóstico etiológico, control del tratamiento frente a antimicrobianos (*Woodford & Sundsfjord, 2005*) y caracterización genética del agente infeccioso (*Kamali-Sarvestani et al., 2006; Peña et al., 2000*).

En el diagnóstico etiológico la PCR es sobre todo útil en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible (*Chey & Wong, 2007; García, 2006; Kisa et al., 2002*).

En el uso como control para el tratamiento con antimicrobianos la PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para cuando se ha iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia, siendo importante para ello disponer de métodos cuantitativos (*Kamali-Sarvestani et al., 2006; Peña et al., 2000*).

Por ultimo la PCR dentro de la caracterización genética de agentes infecciosos, es utilizada para la genotipificación, identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia; epidemiología molecular; entre otros (*Woodford & Sundsfjord, 2005; Liviu et al., 2003*).

1.4.4.4. Tipos de PCR utilizados en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*

Para estudios en relación al diagnóstico de *H. pylori*, se ha utilizado la PCR normal, RT- PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción de la Polimerasa en Cadena) y PCR en tiempo real (*Quiang et al., 2002*); los tres tipos de PCR muestran resultados similares en referencia a especificidad y sensibilidad en el diagnóstico, la diferencia es que la técnica por RT-PCR permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cADN, mientras que en PCR normal y PCR en tiempo real se amplifica de manera directa, secuencias específicas en el genoma de *H. pylori* (*Chey & Wong, 2007; Ausubel et al., 2002; Bauer et al. 2005*).

1.4.4.5. Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La optimización de una reacción de PCR radica en el ajuste de las condiciones de amplificación (Temperaturas y tiempos de desnaturalización, hibridación de cebadores, extensión y el número de ciclos) junto a las concentraciones de los componentes de la reacción (ADN, Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs, cebadores, y posibles aditivos) con el fin de obtener patrones nítidos y reproducibles de los productos de la PCR.

Las concentraciones de los componentes son críticas para el funcionamiento de la PCR, la obtención de resultados inespecíficos dependerá de la variación en estas o de su sobresaturación; que principalmente afecta en el acoplamiento de las secuencias iniciadoras (primers) (*Ausubel et al, 2002*).

Otro de los factores críticos dentro de la estandarización de la PCR son los procesos de descontaminación y del flujo de procesos, que eviten la contaminación de las muestras con amplicones; por lo que una buena organización y división de áreas (prePCR y postPCR) disminuye la posibilidad de una posible contaminación (*Mifflin, 2006*).

1.4.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa como método diagnóstico, incrementa la detección de *H. pylori* en muestras de mucosa gástrica; y es una técnica con alta sensibilidad y especificidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones participantes en el proyecto

Para el desarrollo de este proyecto se contó con la participación de las siguientes instituciones:

- Centro de Biomedicina, Laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular
- Corporación Ecuatoriana de Biotecnología
- Cátedra de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador
- Instituto de Gastroenterología
- Hospital Pedro Vicente Maldonado
- Centro Médico Pauster, Laboratorio de Patología y Citología
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Laboratorio de Bioanálisis

2.1.2. Personal cooperante

- Dr. Oswaldo Rodríguez MD, PhD
- Dra. Bertha Estrella - Bioestadística
- Dr. Carlos Castillo - MD Gastroenterólogo
- Dr. Luis Vinuesa - MD Gastroenterólogo
- Dr. Fabián Tulcanazo - MD Gastroenterólogo
- Dra. Sonia Ontaneda Msc. en Microbiología
- Sra. Catalina Rivadeneira - Jefe de Enfermería del Instituto de Gastroenterología

2.2. Zona de estudio

2.2.1. Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación se desarrolló en los Laboratorios de Biología Celular y Microbiología Molecular perteneciente al Centro de Biomedicina, localizado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador, Sodiro N 14-121 e Iquique, Quito- Ecuador.

Parte de los procesos de la investigación fueron desarrollados en los laboratorios de bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre y Roca, Quito – Ecuador.

El estudio histopatológico se llevo a cabo en el laboratorio de Patología y Citología del Centro Médico Pauster, ubicado en la Avenida Eloy Alfaro e Italia, Quito - Ecuador.

2.2.2. Trabajo de campo

El trabajo de Campo se desarrollo en el Instituto de Gastroenterología ubicado en la Av. Eloy Alfaro N33-167 y 6 de Diciembre, Quito-Ecuador y en el Hospital Pedro Vicente Maldonado ubicado en el centro de la ciudad de Pedro Vicente Maldonado, Pichincha-Ecuador.

2.3. Período de tiempo de investigación

El desarrollo del proyecto tomó curso en Enero del 2007 y su finalización se realizó en Diciembre del mismo año.

2.4. Diseño bioestadístico

2.4.1. Cálculo del tamaño de la muestra

De acuerdo a la bibliografía referente a los porcentajes de sensibilidad de las dos pruebas diagnosticas a utilizarse (PCR e Histopatología); se cálculo una muestra de tamaño $n = 73$, con 5 % de frecuencia esperada, 10 % de error permisible y 95 % de nivel de confianza, para este cálculo se utilizó la formula para tamaño de muestra (N) (Dawson & Trapp, 2002; Warren & Newman, 1998).

Cuadro 2.1 Fórmula para la determinación del tamaño de muestra en dependencia de la frecuencia esperada y el error permisible

Fórmula:	Donde:
$N = \frac{4Z\alpha^2 P(1-P)}{W^2}$	$Z\alpha = 1,96$ - constante estadística
	P: 0,05 - frecuencia esperada
	W: 0.10 - error permisible

Fuente: Dawson & Trapp, 2002.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Selección de personas y criterios de inclusión para el estudio

Para el estudio se incluyó a todos los individuos de cualquier edad y sexo, que asistieron a consulta en el Instituto de Gastroenterología (Dr. Carlos Castillo y Dr. Luis Vinueza) y al Hospital Pedro Vicente Maldonado (Dr. Fabián Tulcanazo), y fueron evaluados mediante examen endoscópico, al ser diagnosticados de padecer de gastritis clínica o por motivo de presentar síntomas de la misma, definiendo gastritis clínica como: la presencia de dolor epigástrico breve después de la comida o dolor epigástrico continuo con náusea y/o vómito y/o molestia abdominal (*Sempértegui et al., 2007*).

Los individuos a formar parte del proyecto de investigación fueron previamente informados y se incluyeron a todos aquellos que previo al examen endoscópico firmaron el consentimiento informado escrito (Anexo B) y colaboraron con el formulario de información para pacientes (Anexo C), formas obligatorias en estudios clínicos, los mismos que fueron aprobados por el Comité de Bioética del Centro de Biomedicina (Anexo A).

2.5.2. Endoscopia gastroduodenal

Durante el examen endoscópico que realizaron los médicos gastroenterólogos Dr. Carlos Castillo, Dr. Luis Vinueza, y Dr. Fabián Tulcanazo; se tomó cuatro biopsias de antro y cuatro biopsias de cuerpo de cada individuo que participó en el proyecto.

Se destinó cuatro biopsias para diagnóstico molecular y cuatro biopsias para diagnóstico por histopatología.

2.5.3. Codificación de pacientes

A cada paciente se le asignó un código numérico, el mismo que fue utilizado para manejar tanto el consentimiento informado, las biopsias y toda la información recogida y generada de cada individuo que colaboró en la investigación. El código numérico inició en 001 y llegó al 109, la designación del código a cada paciente fue progresiva paralela al progreso de la investigación.

2.5.4. Almacenaje de biopsias

Las biopsias adquiridas para el diagnóstico por PCR fueron colocadas en microtubos de 1.5 ml, que contenían 1 ml de buffer de almacenamiento (PBS) por cada biopsia, para el caso del diagnóstico histopatológico, las biopsias fueron recogidas en cartulinas estériles y estas se colocaron dentro de un solo frasco ámbar que congenian 10 ml de solución al 10 % de formol.

Cada vial de almacenaje fue previamente etiquetado con el código del paciente y adicional el código referente a la ubicación anatómica del estomago de donde se obtuvo la muestra; correspondiendo: A1 para la biopsia de Antro, A2 segunda biopsia de antro, C1 para la biopsia de cuerpo anterior y C2 para la muestra de cuerpo posterior.

Tabla 2.1 Codificación, almacenaje, tipo de diagnóstico y localización del estomago de donde se adquirió la biopsia durante el examen endoscópico para el diagnóstico de *H. pylori*.

Numero de biopsia	Parte del estomago de donde la biopsia fue adquirida	Código de Biopsia	Buffer de almacenaje	Tipo de Diagnóstico
1	Antro	A1	Buffer PBS	PCR
2	Antro	A2	Buffer PBS	PCR
3	Cuerpo	C1	Buffer PBS	PCR
4	Cuerpo	C2	Buffer PBS	PCR
5	Antro	A	Sol. Formol 10%	Histopatología
6	Antro	A	Sol. Formol 10%	Histopatología
7	Cuerpo	C	Sol. Formol 10%	Histopatología
8	Cuerpo	C	Sol. Formol 10%	Histopatología

2.5.4.1. Buffer de transporte y almacenamiento

El buffer de almacenaje para las biopsias destinadas al diagnóstico por PCR de *H. pylori* fue el buffer PBS:

Cuadro 2.2 Componentes del buffer de transporte con su respectivos pesos (gr.) y volúmenes (ml).

Componente	Peso/volumen
NaCl	8.00 g
kCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua destilada	1000,00 ml

Fuente: (Ausubel et al., 2002)

El pH del medio se ajustó a 8.5 con HCL y se esterilizó por proceso de Autoclavado

2.5.5. Transporte de las biopsias

Las biopsias 1, 2, 3 y 4 de cada paciente se colocaron en sus respectivos viales, se ubicaron en el cooler que contenía paquetes de gel congelante, que acondicionaban y mantenían el ambiente a una temperatura de 4 grados centígrados, y se trasladaron en el lapso de cuatro horas posterior a la toma de la biopsia, del Instituto de Gastroenterología hacia el laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular del Centro de Biomedicina donde se almacenaron y procesaron.

El mismo sistema de transporte y almacenamiento se realizó para las muestras adquiridas en el Hospital de Pedro Vicente Maldonado.

2.5.6. Histopatología

Las biopsias 5, 6, 7 y 8 de cada paciente fueron transportadas al laboratorio de Patología y Citología, donde se sometieron a procesos de tinción (tinción Giemsa), para que posterior a esto, por medio de la visualización microscópica directa de la bacteria, se determine como un diagnóstico positivo, o negativo si es que no se encontrase la presencia de la misma en el tejido procesado.

2.5.7. Aislamiento de ADN.

2.5.7.1. Cepa control

La cepa control fue cedida por la Msc. en Microbiología, Dra. Sonia Ontaneda, la misma que fue aislada de una muestra clínica por el método de cultivo microbiológico y su determinación positiva se realizó por caracterización bioquímica y microscópica.

Para la extracción de ADN de la cepa control, se realizó bajo el protocolo descrito por el fabricante de DNazol® (Invitrogen): para la lisis de las células bacterianas se adicionó 1ml del reactivo DNazol® al plato de agar que contenía el cultivo de la cepa control, se homogenizó con ligeros movimientos circulares por 30 segundos, y con la ayuda de una micropipeta se procedió a retirar la suspensión creada por el DNazol® y el cultivo bacteriano, la suspensión se colocó en un microtubo de 1.5 ml. Tras incubar por 3 minutos a temperatura ambiente, se separaron las fases por centrifugación a 5000 rpm. durante 8 minutos de donde se recuperó el sobrenadante.

El ADN bacteriano se precipitó con 0.5 ml de etanol al 99.8 % (Scharlan), posteriormente se invirtió la muestra varias veces, se centrifugó a 3000 rpm. por 4 min. y se eliminó la solución. El ADN se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 75% (v/v), se sometió a centrifugación a 1000 rpm. por un min.; se descartó el sobrenadante y se dejó secar por el lapso de 15 a 30 segundos al aire dejando el tubo invertido. El ADN se resuspendió adicionando 200 μ l de buffer TE.

2.5.7.2. Aislamiento de ADN genómico de *Helicobacter pylori* de alto peso molecular de biopsias gástricas.

El aislamiento de ADN genómico de *H. pylori* de alto peso molecular y alta calidad, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Weiss *et al.*, (1994), pero con varias modificaciones: la lisis se realizó en forma directa de la biopsia, la cual primero fue homogenizada por maceración en un porta objetos con la ayuda de una aguja y un bisturí estéril, que posteriormente se colocó en el buffer lisis TES [Tris-HCl 50 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM, SDS 1 % (v/v)] y se le añadió Proteinasa K (Invitrogen Diagnostics) a una concentración final de 100 μ g/ml (Chen *et al.*, 2005 y Shibata *et al.*, 2002). Tras incubar por dos horas a 55°C (Monteiro *et al.*, 1997; y Valentine *et al.*,

1991), se separaron las fases por centrifugación 12.000 x g durante 10 minutos de donde se recuperó el sobrenadante.

El ADN genómico se precipitó con un volumen de 0.5 ml de etanol al 99.8 % (Scharlan), posteriormente se invirtió la muestra varias veces, el ADN precipitado se removió con la punta de una pipeta y fue transferido a un tubo nuevo. El ADN se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 75% (v/v), se descartó el sobrenadante y se dejó secar por el lapso de 15 a 30 segundos al aire dejando el tubo invertido. El ADN se resuspendió adicionando 200 μ l de buffer TE.

2.5.7.2.1. Buffer de resuspensión y almacenamiento de ADN genómico

El buffer de resuspensión para ADN genómico fue el buffer TE:

Cuadro 2.3 Componentes del buffer de resuspensión y almacenamiento de ADN con su respectiva concentración (mM) y pH.

Componente	Concentración	pH
Tris -HCl	10 mM	7.5-8.0
EDTA	1 mM	8.0

Fuente: Debets-Ossenkopp 2002

El pH del medio se ajustó a 8.0 con HCL y se esterilizó por proceso de Autoclavado.

2.5.8. Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó utilizando el espectrofotómetro (UV WINLAB Software, Perkin-Elmer), este proceso se llevó a cabo bajo las especificaciones requeridas por el equipo (*Pekín Elmer, 2000*) en el Laboratorio de Bioanálisis de la PUCE.

Se preparó disoluciones de ADN, en tubo plástico estéril de 15 ml (Corning), que contenía 3 ml de agua tipo biología molecular (Invitrogen), donde se añadió 5 μ l de ADN de cada muestra obtenida como se describe previo en 2.5.7.2, se colocó en cubetas de cuarzo de 4ml (Perkin-Elmer), que posteriormente se ubicaron dentro del espectrofotómetro y se procedió a medir la absorbancia. Para la muestra control se colocó 3.005 ml de agua tipo biología molecular (Invitrogen).

La absorbancia de la muestra y del control fue leída a 260 y 280 nm., en donde se asume una unidad (1) a A_{260} es igual a 50 μ g de ADN de doble cadena por cada ml de muestra (Monteiro, Cabrita & Megraud, 1997).

Para conocer la calidad de ADN en la muestra, se procedió a dividir el valor obtenido a 260 nm. Para el valor obtenido a 280 nm., donde el número resultante que denota buena calidad de la muestra, debía ser mayor a 1.5 que es la base que indica buena calidad (Monteiro et al., 1997), estos resultados se muestran en el (Anexo F).

2.5.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en el termociclador de la marca Flexigene. Esta técnica se utilizó, básicamente, para la amplificación de fragmentos de ADN genómico aislado previamente como se indica en 2.5.7.2

Para evitar contaminación en el proceso de PCR, se destinó dos áreas para el proceso de amplificación: el área de PrePCR y el área de PostPCR.

En el área de prePCR, se realizó los procesos de extracción de ADN y la preparación del cóctel de amplificación. Para esta área se encuentra destinado un laboratorio específico, el mismo que está totalmente apartado del área de postPCR y de los demás laboratorios que componen el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biomedicina; los suministros, reactivos y equipos son de uso exclusivo para esta área y no son compartidos con el resto de laboratorios y menos aún con el laboratorio de postPCR.

En el área de PostPCR se realizó los procesos de amplificación y visualización de resultados, al igual que en el área de prePCR, este laboratorio también tiene suministros, reactivos y equipos de uso exclusivo.

Las condiciones de reacción se optimizaron de acuerdo con lo descrito por *Peek et al., (1994)* y *Weiss et al., (1994)*; ya que en este estudio se utilizó 2 pares de primers que amplifican secuencias específicas en el gen 16S rRNA, de *H. pylori* (tabla 1); por lo que cada muestra se procesó para la amplificación de dos fragmentos diferentes. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 51 μl , donde se incluyó 45 μl correspondientes a PCR SuperMix (Invitrogen) que contiene: (22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, 22 U Taq ADN Polimerasa/ml recombinante con estabilizadores); 1 μl de cada primer a una concentración final de 200 nM y 4 μl de ADN obtenido de la biopsia.

Cuadro 2.4 Primers utilizados en la amplificación de secuencias específicas del gen 16SrRNA de *H. pylori*

Ubicación en el gen	Primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño de producto en bp
691-710	16HP1 <i>forward</i>	G C G A C C T G C T G G A A C A T T A C	139
809-829	16HP1 <i>reverse</i>	C G T T A G C T G C A T T A C T G G A G A	
219-240	16HP2 <i>forward</i>	G C T A A G A G A T C A G C C T A T G T C C	522
719-740	16HP2 <i>reverse</i>	T G G C A A T C A G C G T C A G G T A A T G	

Fuente: Weiss et al., 1994; Peek et al., 1994

El programa de amplificación para PCR del primer *16HP1* se realizó de acuerdo con lo descrito por *Weiss et al., (1994)*:

- Desnaturalización inicial a 95 ° C por 5 minutos, seguida de 39 ciclos modificado del original el cual recomienda 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 1 minuto, Acoplamiento a 55°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El programa de amplificación para PCR del primer *16HP2* se realizó de acuerdo con lo descrito por *Peek et al., (1994)*:

- Desnaturalización inicial a 94 ° C por 5 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto.
- Acoplamiento a 55°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los resultados de la amplificación se visualizaron sometiendo una muestra del producto amplificado a electroforesis en un gel de agarosa al 1.6%.

2.5.10. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño, se llevó a cabo en geles de agarosa cuya concentración fue 1.6 % (p/v). Las electroforesis se desarrollaron en cubetas horizontales a voltaje constante (80 o 90 V) y como tampón se utilizó TAE 1x (Tampón TAE 50x: Tris-HCl 2 M, pH 7,2, EDTA 50 mM, pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml y agua destilada hasta 1 litro). Las muestras se prepararon mezclando el ADN amplificado con tampón de carga de alta densidad, compuesto por azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) y descrito como de tipo II por *Sambrook y colaboradores, 1989*.

Para la visualización del ADN el gel se sometió a tinción en una solución de bromuro de etidio (10 ug/ml) y se visualizó a través de un transiluminador UV de la marca (Life Technologies). La fotografía del gel se realizó con una cámara digital marca Linux y las fotografías fueron impresas en papel de fotografía marca kodak.

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó comparando las distancias que éstos recorrían en el gel de agarosa con la distancia que recorrían fragmentos de ADN de tamaño conocido. Como marcador de peso molecular se utilizó: Un marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). Derivado de un plásmido que

contiene repeticiones de un fragmento de ADN de 100 pb., contiene 15 fragmentos que se incrementan de 100 bp y una banda adicional de 2027 bp.

2.6. Análisis de datos:

2.6.1. Estadística de métodos diagnósticos

2.6.1.1. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la técnica molecular de PCR.

Para el análisis de los resultados de la prueba diagnóstica molecular, se elaboró una matriz con ceros y unos: 1 = Positivo y 0 = Negativo (Anexo D).

Positivo: Cuando se visualice banda de amplificación

Negativo: Cuando no se visualice banda de amplificación

2.6.1.2. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la técnica de Histopatología.

Una vez terminada la fase experimental se retiró los resultados del diagnóstico histopatológico y también se elaboró una matriz con ceros y unos: 1 = Positivo y 0 = Negativo (Anexo E), en los resultados histopatológicos el diagnóstico se presentó:

Positivo: HELICOBACTER PYLORI (X, XX, XXX).

Negativo: HELICOBACTER PYLORI NEGATIVO, o no se identifica bacilos GUIEMSA.

2.6.2. Cálculo de la sensibilidad, valores predictivos e índice de desempeño de la técnica molecular PCR.

Para el cálculo de la sensibilidad, valores predictivos e índice de desempeño de la técnica molecular PCR, se realizó una tabla de doble entrada; donde se ubicaron los resultados obtenidos por la técnica molecular de PCR y los resultados obtenidos en la técnica de histopatología, considerado el gold estándar de Ecuador, y se aplicó la respectiva fórmula para su cálculo (*Dawson & Trapp, 2002; Warren & Newman, 1998*).

Cuadro 2.5 Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.

Tabla de doble entrada		
Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Fuente: Dawson & Trapp, 2002; Warren & Newman, 1998

2.6.2.1. Fórmulas

a) Índice de desempeño

Se recopiló los datos resultantes del PCR como los de histopatología, y se procedió a realizar la comparación de los datos resultantes en cada técnica, se acumuló los aciertos tanto positivos o negativos y se dividió para el número total de casos, utilizando la fórmula (Dawson & Trapp, 2002; Warren & Newman, 1998):

Cuadro 2.6 Fórmula para el cálculo del índice de desempeño de la técnica molecular PCR.

Fórmula	Donde:
$ID = \frac{\sum \text{aciertos}(+o-)}{N.total}$	$N.total = \text{número total de casos}$
	$\sum \text{aciertos}(+o-) = \text{Suma de aciertos positivos o negativos}$

Fuente: Warren & Newman, 1998

b) Sensibilidad

Cuadro 2.7 Fórmula para la determinación de la sensibilidad de un método diagnóstico

Fórmula	Donde:
$S = \frac{VP}{(VP + FN)}$	<i>S = Sensibilidad</i>
	<i>VP = Verdaderos Positivos</i>
	<i>FN = Falsos negativos</i>

Fuente: Warren & Newman, 1998

c) Especificidad

Cuadro 2.8 Fórmula para la determinación de la especificidad de un método diagnóstico

Fórmula	Donde:
$E = \frac{VN}{(FP + VN)}$	<i>E = Especificidad</i>
	<i>VN = Verdaderos Negativos</i>
	<i>FP = Falsos positivos</i>

Fuente: Warren & Newman, 1998

d) Valores Predictivos

Valor predictivo positivo

Cuadro 2.9 Fórmula para la determinación del valor predictivo positivo de un método diagnóstico

Fórmula	Donde:
$VPP = \frac{VP}{(VP + FP)}$	<i>VPP = Valor predictivo positivo</i>
	<i>VP = Verdaderos positivos</i>
	<i>FN = Falsos positivos</i>

Fuente: Warren & Newman, 1999

Valor predictivo Negativo

Cuadro 2.10 Fórmula para la determinación del valor predictivo negativo de un método diagnóstico

Fórmula	Donde:
$VPN = \frac{VN}{(VN + FN)}$	<i>VPN = Valor predictivo negativo</i>
	<i>VN = Verdaderos negativos</i>
	<i>FN = Falsos negativos</i>

Fuente: Warren & Newman, 1998

3. RESULTADOS

3.1. Optimización de la técnica de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Dentro del proceso de la técnica molecular de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa para *H. pylori*, se encuentran dos procesos determinantes para la obtención de un resultado óptimo, estos procesos son la extracción del ADN de la muestra (mucosa gástrica), y la amplificación de la secuencia específica del genoma de *H. pylori*.

Los protocolos optimizados tanto para la extracción de ADN genómico como para el proceso de amplificación de fragmentos específicos del gen 16S rRNA de *H. pylori* se describen en la parte de procesos 2.5.7.2.

3.1.1. Optimización en los parámetros de extracción de ADN

La optimización del protocolo de extracción de ADN, resultó de la mezcla de cinco protocolos diferentes; para obtener los resultados óptimos que brindaron los componentes del buffer lysis en la extracción del ADN genómico, se partió en base a los protocolos publicados por Chen, 2006 y Shibata, 2002; la temperatura y tiempo de incubación, de los protocolos descritos por Monteiro, 1997 y Valentine, 1991; y para la

precipitación de ácidos nucleicos se utilizó el método recomendado por el fabricante del reactivo DNazol® (Invitrogen).

3.1.2. Optimización en los parámetros de PCR

La optimización del PCR y sus respectivos parámetros, se determinó en base al protocolo sugerido por el fabricante de PCR SuperMix (Invitrogen). Los programas de amplificación utilizados fueron los descritos por Peek y Weiss, aunque en el programa de amplificación para los primers 16Hp1, se realizó una variante en el número de ciclos de 35 a 39, que brindó una mejor visualización de las bandas de amplificación.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa amplificó fragmentos específicos del gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Con la pareja de primers 16Hp1 se amplificó un fragmento de 139 bp. y con la pareja de primers 16 HP2 un fragmento de 522 bp.

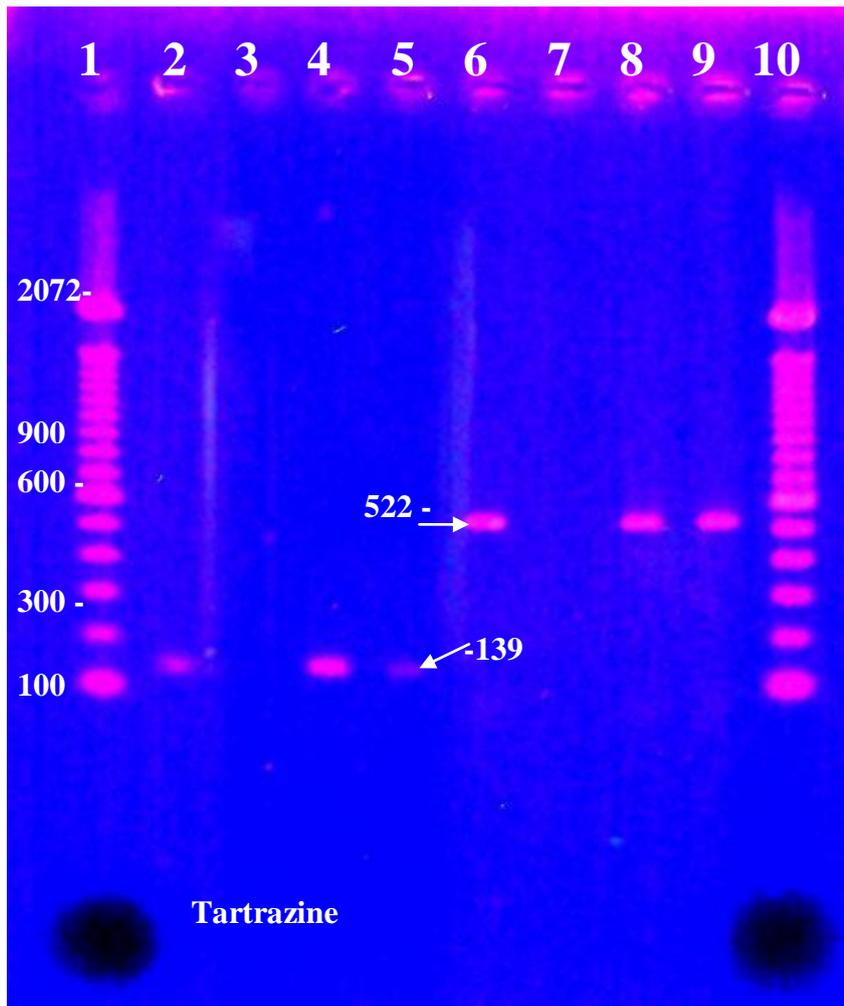


Figura 3.1 Productos de amplificación de muestras de biopsia gástrica.

Línea 1 y 10: Marcador molecular de 100-2072, línea 2: producto de amplificación del control positivo de los primers 16Hp1; línea 3: producto de amplificación del control negativo de los primers 16Hp1; línea 4-5 producto de amplificación de muestras 9 y 28 con los primers 16Hp1; línea 6: producto de amplificación del control positivo de los primers 16Hp2, línea 7: producto de amplificación del control negativo de los primers 16Hp2, línea 8-9, producto de amplificación de muestras 9 y 28 con los primers 16Hp2

Los resultados de la detección del gen *16S rRNA* en mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos por la técnica de molecular de PCR concuerdan con los resultados del gold estándar, 35 pacientes fueron positivos por PCR y los mismos 35 pacientes fueron positivos por histopatología. Sin embargo se detecto cuatro positivos por PCR (pacientes # 27, 33, 67, 82) que en el diagnóstico histopatológico resultaron negativos.

Los cuatro pacientes que fueron positivos para PCR y no por histopatología, se sometieron a un reproceso; donde se extrajo el ADN de las biopsias de respaldo de cada paciente y posterior a esto se amplificó el gen *16S rRNA* con los dos pares de primers, siendo el resultado el mismo y descartando una posible contaminación.

3.2. Pacientes

De los 109 pacientes estudiados, 56 (51%) eran hombres y 53 (49%) mujeres, con edades entre 17 y 82 años. La mayoría de pacientes se ubicó en un rango de edad entre 31 y 60 años y la media de la edad fue 46 años.

Se observó que la mayor tasa de infección, se da en pacientes del rango de edad de 30 a 60 años, esto se correlaciona con el mismo intervalo de edad de los pacientes que asistió a la consulta por dispepsia y se realizó el diagnóstico de *H. pylori*.

3.3. Diagnóstico endoscópico, histopatológico y molecular

El diagnóstico histopatológico y endoscópico reveló que todos los pacientes presentaron algún tipo de gastritis crónica; el 76 % (83/109) Gastritis crónica no atrófica, 10% (11/109) Gastritis crónica atrófica, 12 % (13/109) Gastritis crónica atrófica con metaplasia, 2 % (2/109) Gastritis crónica atrófica con displasia (Anexo G).

Los resultados según el diagnóstico histopatológico revelaron que 35 pacientes fueron positivos para *H. pylori* de un total de 109 pacientes, mientras que el diagnóstico molecular por PCR reveló que 39 pacientes eran positivos para *H. pylori* del mismo total.

Tabla 3.1 Porcentaje de detección de los métodos de diagnóstico utilizados en pacientes dispépticos ecuatorianos.

Método Diagnóstico	Histopatología	PCR
% de detección	32% (35/109)	36% (39/109)

De los 39 pacientes *Helicobacter pylori* positivos por la técnica molecular de PCR todos presentaron gastritis crónica. De los cuatro pacientes que resultaron positivos para PCR y no para histopatología se obtuvo el siguiente resultado histopatológico.

Tabla 3.2 Pacientes con resultado negativo a la infección de *H. pylori* por el método diagnóstico de Histopatología y su respectivo análisis.

Paciente # código	Análisis Histopatológico
27	Gastritis crónica moderada congestiva, <i>H. pylori</i> negativo. Mucosa de antro con intensa inflamación mixta y congestión, infiltración linfoplasmocitaria XXX, polinucleares X, moderada hiperplasia foveolar con atípías focales del grupo II (Anexo H)
33	Gastritis crónica activa intensa con atípías severas del grupo III-IV del antro. <i>H. pylori</i> negativo. Mucosa de antro e incisura con intensa inflamación mixta, congestión y hemorragia, infiltración linfoplasmocitaria XX, polinucleares X, moderada hiperplasia foveolar con metaplasia intestinal y atípías severas del grupo III-IV (Anexo I)
67	Gastritis crónica activa intensa, <i>H. pylori</i> negativo. Mucosa de antro con intensa inflamación mixta y congestión, infiltración linfoplasmocitaria XXX, polinucleares X, formación de un folículo linfoide, leve hiperplasia foveolar con atípías focales del grupo II (Anexo J)
82	Gastritis crónica leve, <i>H. pylori</i> negativo. Mucosa de antro con leve inflamación crónica y congestión, infiltración linfoplasmocitaria X, moderada hiperplasia foveolar sin atípías. (Anexo K)

3.4. Sensibilidad, valores predictivos e índice de desempeño de la técnica molecular PCR

La técnica de diagnóstico molecular de PCR respecto al gold estándar, el diagnóstico histopatológico; presentó una sensibilidad del 100%, especificidad de

94.59%, valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de 100 % y 94 % respectivamente, con un índice de desempeño del 96.3 %.

Tabla 3.3 Relación entre el resultado de la técnica diagnóstica molecular PCR y el gold estándar, diagnóstico histopatológico para la detección de *H. pylori*

Tabla de doble entrada con los resultados de los dos métodos diagnósticos.			
Resultado del diagnóstico Histopatológico	Resultado del diagnóstico molecular de PCR		
	Positivo	Negativo	Total por PCR
POSITIVO	35	4	39
NEGATIVO	0	70	70
Total por Histopatología	35	74	109

Tabla 3.4 Porcentaje de sensibilidad y valores predictivos del diagnóstico molecular por PCR para la detección de *H. pylori*.

Método Diagnóstico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores Predictivos (%)	
			Positivo	Negativo
PCR	100	95	90	100

4. DISCUSIÓN

Los resultados confirman la alta especificidad y sensibilidad del PCR como método de diagnóstico para *Helicobacter pylori*, lo que hace que un futuro probablemente esta técnica se convierta en el gold estándar para la detección de este microorganismo (Chey & Wong, 2007; Alba et al., 2006).

Coincido con Zsikia (2006); Di-Bonaventura (2004); Vinette (2004); Domez-Altuntas, (2002) y Yamamura (1999) en que la PCR es la técnica de diagnóstico basado en biopsias con mayor sensibilidad y especificidad, al obtener en el estudio una sensibilidad del 100%, especificidad de 94.5% y un índice de desempeño del 96% en relación al método diagnóstico por histopatología, pero más relevante el hecho, que el PCR incrementa la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de biopsias gástricas. En el estudio el método molecular de PCR incremento en 4 % la detección de *H. pylori*, al haber detectado 4 pacientes más de los diagnosticados por histopatología. Una de las probabilidades para que por el método de histopatología estos cuatro pacientes hayan resultado negativos, puede justificarse con lo propuesto por Yamamura, (1999); que indica, que cuando existe daño prominente en el tejido producido por la enfermedad, existirá baja densidad bacteriana en el tejido estudiado y en consecuencia el microorganismo no puede ser visualizado produciendo un resultado negativo. Revisando los resultados de histopatología de los cuatro pacientes que tienen un resultado positivo por PCR y negativo por histopatología, confirmamos que este podría ser una de las causas para tal resultado, pues los cuatro pacientes sufren de lesiones severas como es el caso de hiperplasia, 3 de los 4 pacientes sufren hiperplasia moderada y uno leve. Descarto lo expuesto por Hamer, (1992) y Ho (2000); que los pacientes con diagnóstico positivos por PCR y no por Histopatología (Anexo H, I, J, K), sean resultado de una posible contaminación, sustentado, en la utilización de procesos estandarizados, exigentes controles en todos los procesos envueltos en el desarrollo de la técnica y el uso de controles dentro del proceso, que descartan cualquier posibilidad de contaminación, mas aun cuando para la verificación de tales resultados, se sometió a un reproceso las biopsias de respaldo de los 4 pacientes extras positivos por PCR, bajo el doble control en todos los procesos, obteniendo los mismos resultados y descartando cualquier tipo de contaminación (Mifflin, 2006).

Dentro de la optimización del método molecular de PCR, la obtención de los protocolos presentados, resultó de una mezcla de diferentes protocolos, el resultado de la mezcla se dio por la limitación en la adquisición de reactivos y equipos, que me obligó a crear un protocolo óptimo acoplado a las condiciones que presenta nuestro medio para hacer investigación (*Ausubel et al., 2002*).

Los resultados del diagnóstico molecular por PCR no se afectaron por la calidad del ADN. Los datos demuestran que de 66 muestras se obtuvo ADN de buena calidad al presentar valores superiores al índice de calidad establecido en 1.5 (*Monteiro et al., 1997*), mientras que el ADN extraído de las 43 muestras restantes fue de calidad regular por presentar valores inferiores a este límite. Sin embargo, 15 de estas muestras tuvieron un resultado positivo por PCR, 14 de las mismas con un valor entre 1 y 1.46. La muestra 15, con resultado positivo para PCR, tuvo el valor más bajo en calidad en comparación con las 109 muestras del estudio (paciente 95, Anexo F). De estos datos podemos concluir que la PCR es una prueba muy sensible y que su eficacia no depende de la calidad del ADN (*Premoli et al., 2004*).

El estudio de la PCR y la comparación con el método de histopatología puso en evidencia que gran parte de la población Ecuatoriana es propensa o tiene gran susceptibilidad a tener problemas gástricos, al encontrar que el 100% de los pacientes en el estudio presentaron algún tipo de gastritis (Anexo F). La tasa de infección por *H. pylori* fue del 36 %, esto no coincide con la bibliografía donde se expone que esta varía entre 80 y 90% (*Chey & Wong, 2007, Shahanat et al., 2004; Moncayo et al., 2006*) probablemente en el estudio no se pudo sustentar esta afirmación, ya que se tiene como precedente que el grupo de pacientes enrolados en el estudio, pertenecen a un estatus económico medio y alto, lo que tiene total relación con lo expuesto por *Chey & Wong, 2007; Kamali-Sarvestani et al., 2006; Linpisarn et al., 2005; Michetti & Svennerholm, 2003, Moncayo et al., 2006* que la tasa de infección se ve afectada principalmente por el nivel socioeconómico del individuo.

A pesar de que el estudio de esta bacteria tiene gran relevancia en el campo médico ecuatoriano, es poca la investigación que se ha realizado, incluso son pocos los centros médicos que cuentan con más de un método diagnóstico, para la detección de este microorganismo (*Debets-Ossenkopp et al., 2003*). Las técnicas moleculares están saliendo del campo de la investigación y se están convirtiendo en técnicas de

diagnóstico de rutina, de ahí que la PCR podría convertirse en un método estándar de diagnóstico invasivo y no invasivo que permita un diagnóstico rápido, eficaz y que también pueda ser usada como una herramienta epidemiológica para la investigación de posibles reservorios ambientales o animales donde el organismo podría encontrarse, para elucidar el modo de transmisión del organismo (Chey & Wong, 2007; Shahamat et al., 2004).

5. CONCLUSIONES

La técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría constituirse en un futuro cercano en la técnica con mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas. Esta investigación ha permitido estandarizar un método de detección molecular de este microorganismo, a través de esta técnica rápida y eficaz que incrementa la detección de *Helicobacter pylori* en relación a otros métodos diagnósticos.

H. pylori es un bacilo espiralado gram negativo, agente etiológico de varias alteraciones en el hombre, como la gastritis crónica, úlceras gástricas, úlceras duodenales, y es el principal factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma de la parte distal del estómago (antro y fondo) y del linfoma de tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT). Esto implica que su detección y posterior erradicación sean una de las principales razones para el diagnóstico de este microorganismo.

Dentro del proceso de la técnica molecular de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa para *H. pylori* he identificado dos procesos determinantes para la obtención de un resultado óptimo, estos son la extracción del ADN de la muestra (mucosa gástrica), y la amplificación de la secuencia específica del genoma de *H. pylori*. Los componentes de los dos procesos, sus concentraciones y condiciones para su desarrollo son críticos para la optimización de la técnica.

La amplificación de una secuencia, dentro del gen 16S rRNA, del genoma de *H. pylori* es altamente sensible, específica y permite un diagnóstico molecular muy confiable.

6. RECOMENDACIONES

Este estudio es un punto de partida del proceso de investigación del *Helicobacter pylori* en el Laboratorio al que pertenezco, con el propósito de dilucidar algunos factores concernientes a este microorganismo y su patogénesis en la población Ecuatoriana.

El hecho que el *H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de estomago, el mismo que tiene una alta incidencia en el Ecuador, determina la imperiosa necesidad de conocer más acerca de este microorganismo, su diagnóstico, y los factores co-patogénicos para la generación de patología gástrica benigna y maligna causadas por Helicobacter.

Un estudio epidemiológico acerca de las patologías gástricas causadas por Helicobacter en el Ecuador es mandatorio para poder dilucidar las posibles vías de transmisión e infección.

También la genotipificación de la bacteria permitiría diagnosticar a pacientes infectados por cepas virulentas, y de esta manera proveer un dato valioso para la evaluación y tratamiento del paciente.

Además, el estudio de resistencias antimicrobianas de *H. pylori* es indispensable para conocer que esquema de tratamiento aplicar en pacientes ecuatorianos. El incremento en los porcentajes de erradicación de la bacteria podría resultar en una disminución de cáncer gástrico en el Ecuador.

Proceso de Optimización

Para los procesos de estandarización de la técnica de PCR se recomienda tener muy en cuenta la aplicación de procesos de descontaminación en todos los pasos y la utilización de diferentes áreas de laboratorios (prePCR y postPCR).

Para mejorar la calidad del ADN se recomienda: a) la desactivación de la proteinasa K dentro del proceso de extracción; y/o b) un proceso de purificación del

ADN obtenido a través del uso de reactivos estandarizados por compañías biotecnológicas, por ejemplo DNazol de Invitrogen.

En este estudio se utilizó dos sets de primers con el objetivo de corroborar los resultados que produzca el uno o el otro. Los primers 16HP1 amplificaron un fragmento de 129 bp, mientras que los primers 16HP2 amplificaron un fragmento de 539 bp. A pesar de que ambos primers tuvieron la misma sensibilidad y especificidad, recomendaría el uso de los primers 16HP1 debido a que amplifican un fragmento de ADN genómico más pequeño. Mientras más pequeño sea el fragmento a amplificarse es más probable que dentro del proceso de extracción este se mantenga íntegro.

Para la visualización de los resultados de amplificación se podría utilizar otros métodos, tales como la hibridación, técnicas colorimétricas y PCR en tiempo real, los mismos que podrían incrementar la sensibilidad de la prueba molecular.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alba, R., Toledo, R. & Viana, M. (2006) *Helicobacter pylori: Clínica, diagnóstico y tratamiento. Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina, 158*, 9-12.

Ausubel, F. Brent, R. Kingston, R. Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (2002) *Short protocols in Molecular Biology (Vol. 2)*. Cananda: John Wiley & Sons.

Bauer, B., Moese, S., Bartfed, S., Meyer, T. & Selbach, M. (2005). *Analysis of cell Type-Specific Responses Mediated y the Type IV Secretion System of Helicobacter pylori. Infection and Immunity, 73(8) 34643-4651.*

Bindayna, K.M., Al Baker, W. A. & Botta, G.A. (2006). *Detection of Helicobacter pylori cagA gene in gastric biopsies, clinical isolates and faeces. Indian Journal of Medical Microbiology, 24(3), 195-200.*

Björkholm, B., Befrits, R., Jaup, B. & Engstrand, L. (1998). *Rapid PCR detection of Helicobacter pylori-Associated virulence and resistance Genes Directly from gastric biopsy material. Journal of Clinical Microbiology, 36(12), 3689-3690.*

Cava, F. & Cobas, G. (2003). *Dos décadas de Helicobacter pylori. Vaccimonitor, 12(1)* Extraído el 02 de Febrero de la página web de la revista Vaccimonitor: <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/Vm2003/a1.pdf>

Corral, F., Cueva, P. & Yépez, J. (Eds.). (2004). *Epidemiología del cáncer en Quito y en otras regiones del Ecuador. Quito-Ecuador: AH/editorial.*

Chen, X., Yan, J. & Shen, Y. (2005). *Dominant cagA/vacA genotypes and coinfection frequency of Helicobacter pylori in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. Chinese Medical Journal, 118(6), 460-467.*

Chey, W. & Wong, B. (2007). *American collage of gastroenterology guideline on the management of Helicobacter pylori infection. American Journal of Gastroenterology, 102, 1-18.*

Chillihua, K., Palomino, R. & Aguilar, E. (2004) *Aislamiento de helicobacter pylori a partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis en el hospital regional del Cusco, Perú. SITUA, 13(1) PAG .15-19.*

Dawson, B. & Trapp., R. (2002). *Bioestadística médica. México: Manual Moderno.*

Debets-Ossenkopp, Y. J., Reyes, G., Mulder, J., Aan de Stegge, B. M., Peters, J. T., Savelkoul, P. H., Tanca, J., Peña, S. A. & Vandenbroucke-Grausl, C. M. (2003). *Characteristics of clinical Helicobacter pylori strains from Ecuador. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 141-145.*

Di Bonaventura, G., Neri, M., Angelucci, D., Rosini, S., Piccolomini, M. & Piccolomini, R. (2004). *Detection of helicobacter pylori by PCR on gastric biopsy specimens taken for CP test: comparison with histopathological análisis. Int Journal Immunopathol Pahrmaology, 17(1), 77-82.*

DNAzol® Reagent. (2006). Extraído el 10 de Septiembre, 2006 del sitio web de Invitrogen : <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10503.pdf>

Donmez-altuntas, H. & Guven, K. (2002). *Detection of Helicobacter pylori using nested polymerase chain reaction and rapid urease test in gastric biopsy samples* The Turkish Journal of Gastroenterology, 13(2), 94-97.

European Helicobacter pylori Study Group, 21-23 (2000). . Extraído el 20 de Octubre, 2006 del sitio web de European Helicobacter pylori Study Group: http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/no-hodgkin_adultos/healthprofessional/allpages

Feldman, M., Lawrence, S., Friedman, M., Marvin, H. & Sleisenger. (Eds.). (2002). Grastrointestinal and liver disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management. United States of North America: Saunders. (7th ed.)

García, E. (2006). *Helicobacter pylori e Infecciones Asociadas.* Extraído el 15 de agosto, 2006, del sitio web: <http://www.ejournal.unam.mx/revfacmed/no49-4/RFM49409.pdf>

Gatta, L., Ricci, C., Tampieri, A. & Vaira, D. (2003) *Non-invasive techniques for the diagnosis of Helicobacter pylori infection.* Journal Clinical Microbiology and Infection, 9(6), 489-496.

Gewirtz, A., Yu, Y., Krishna, U., Israel, D., Lyons, S. & Peek, R. (2004). *Helicobacter pylori flagellin evades Toll-like receptor 5-mediated innate immunity.* The Journal of Infectious Diseases, 189, 1914-1920

Gómez, J. (2001). *Caracterización molecular de cepas de Helicobacter pylori. Reproducción del modelo animal en ratones y estudio de los mecanismos de la inflamación.* Universidad de Barcelona. Extraído el 15 de Septiembre, 2006 del sitio web de la Universidad de Barcelona: http://www.tesisexarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0124102-151944//TESIS.pdf

Gómez, N., Salvador, A., Vargas, P., Zapatier, J. & Álvarez, J. (2004). Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en la población infantil ecuatoriana. Revista de gastroenterología del Perú, 24(3), 63-69.

Heep, M., Scheibl, K., Degrell, A. & Lehn, N. (1999). Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology, 37(11), 3764-3799.

Ho, G. & Windsor, H. (2000). Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase chain reaction test. Gastroenterology clinics of North America, 29(4) 903-915.

Kamali-Sarvestani, E., Bazargani, A., Masoudian, M., Lankarani, K., Taghavi, A. & Saberifiroozi, M. (2006). Association of *H pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. World Journal Gastroenterology, 12(38), 5205-5210.

Kisa, O., Albay, A., Mas, M., Bulent, C. & Doganci, L. (2002). The evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 43, 251-255.

Kunkel, D. (2004). Science Stock Photography. Extraído el 10 de Agosto del 2006 de la página de Dennis Kunkel Microscopy, Inc.: <http://www.denniskunkel.com/>

Linpisarn, S., Koosirirat, C., Prommuangyong, K., Suwan, W., Lertprasertsuke, N. & Phornphutkul, K. (2005). Use of different PCR primers and gastric biopsy tissue from CLO test for the detection of *Helicobacter pylori*. Southeast Asian Journal Tropical Medical Public Health, 36(1), 135-140.

Liviu, A., Sicinschi, Correa, P., Bravo, L. & Schneider, B. (2003). Detection and typing of *Helicobacter pylori* cagA/vacA genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. Journal of Microbiological Methods, 52 197-207.

Logan, R. & Walker, M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. BMJ, 323(20), 920-922.

Marshall, B. J. (Ed.). (2000). *Gastroenterology Clinics of North America Encyclopedia, Helicobacter pylori*. United States of North America: Saunders.

Michetti, P. & Svennerholm, A. (2003). *Helicobacter pylori – inflammation, immunity and vaccines*. *Blackwell Publishing Ltd. Helicobacter*, 8(1), 31–35.

Mifflin, T. (2006) *Settin Up a PCR laboratory*. Department of Pathology, University of Virginia , Extraído el 06 de Agosto del 2006 de la página de la Universidad de Virginia: http://www.biosupplynet.com/pdf/01_PCR_Primer_p.5_14.pdf

Moncayo, J. M., Santacruz, J., Álvarez, A. L., Franco, B., López, M., Ángel, A., Gallego, M. & Serrano, H. (2006). *Comparación de métodos diagnósticos en la infección por Helicobacter pylori en Quindío*. *Colombia Médica*, 37(3), 202-213.

Monteiro, L., Cabrita, J. & Megraud, F. (1997). *Evaluation of Performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of Helicobacter pylori PCR products from biopsy specimens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 65(11), 2931-2936.

Morales, M., Castillo, G., Lopez, Y. & Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori Facultad de medicina de la UNAM, Universidad de Barcelona*. Extraído el 10 de Marzo, 2007 del sitio web de la Universidad de la UNAM: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_15/Capitulo15.pdf

Nomura, A. M., Pérez-Pérez, G. I., Lee, L., Stemmermann, G. & Blaser, M. J. (2000). *Relation between Helicobacter pylori cagA Status and Risk of Peptic Ulcer Disease*. *American Journal of Epidemiology*, 155(11) 1054-1059.

Noy, A., Yahalom, J., Zaretsky, L., Brett, I., & Zelenetz, A. D. (2005). *Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma detected by clonotypic polymerase chain reaction despite continuous pathologic remission induced by involved-field radiotherapy*. *Journal Clinical Oncology*, 23(16), 3768-72.

Oh, J., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R., Fulton, L.A., Cordum, H., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E., Lars, G. & Gordon, J. (2006). *The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: Evolution during disease progression*, 103(26), 9999–10004.

Pacheco, N., Mago, V., Gómez, I., Gueneau, P. Guelrud, M., Reyes, N., Pericchi, I. & Domínguez-Bello, M. (2001). Comparison of PCR and common clinical tests for the diagnosis of *H. pylori* in dyspeptic patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39, 207-210.

Peek, R. M., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez, G. I., Cover, T. L., Atherton, J. C., Dunn, D. & Blaser, M. J. (1995). Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 28-32.

Peña, J., Fox, J., Ferraro, M. & Versalovic, J. (2000). Molecular resistance testing of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Archives of pathology and Laboratory Medicine*, 125(4), 493-497.

Piñol, F. & Paniagua, M. (2000). Citocinas, Gastritis Crónica y *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología Hemoter*, 16(3), 184-189.

Premoli, G., González, A., Millan, B., Percoco, T. & Vielma, A. (2004). Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(2), 85-90.

Qiang, H., Wang, J., Osato, M. & Lachman, L. (2002). Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3720-3728.

Ramírez, A., Mendoza, D., Leey, J. & Guerra, J. (2002) Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Revista Peruan de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(4), 209-214.

Ramos, M.L., Darini, E., Canavez, F.C., Canelas, C. M., Troquez da Silveira, C. A. & Camara-Lopes L. H.(2005). *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Medical Journal* 123(3), 113-118.

Rivas, F. & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomédica*, 11, 187-2005.

Roosendaal, R., Kuipers, E., Van den Brule, A., Pena, A., Uytterlinde, A., Walboomers, J., Meuwissen, S. & De Graaff, J. (1994). Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR., Journal of Clinical Microbiology, 32(4), 1123-1126.

Rotimi, O., Cairns, A., Gray, S., Moayyedi, P. & Dixon, M. F. (2000). Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. Journal of Clinical Pathology, 53, 756-759.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989-1994). Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Vols. 1-3). United States of North America: Cold Spring harbor.

Samuels, A., Windor, H., Ho, G., Goodwin, L. & Marshall, B. (2000). Culture of *Helicobacter pylori* from gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. Journal of Clinical Microbiology, 38(6), 2438-2439

Sempértegui, F., Díaz, M., Mejía, R., Rodríguez, O., Renteira, E., Guarderas, C., Estrella, B., Recalde, R., Hamer, D. & Reeves, F. (2007). Low concentrations of Zinc in gastric mucosa are associated with increased severity of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. Journal Helicobacter, 12, 43-48.

Shahamat, M., Alavi, M., Watts, J. E. M., Gonzalez, M., Sowers, K. R., Maeder, D. W. & Robb, F. T. (2004). Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology, 42(8), 3613–3619.

Shibata, A., Parsonnet, J., Longacre, T. A., Garcia M. I., Puligandla, B., Davis, R. E., Vogelmann, J. H., Orentreich, N. & Habel, L. (2002). CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. Carcinogenesis, 23(3), 419-424.

Siu, L., Leung, W., Cheng, A., Sung, J., Ling, T.K., Ling, J.M., Ng, E., Lau, J. & Chung, S. (1998). Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiolog, 36(10), 3048-3050.

Suerbaum, S. & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* Infection. *The New England Journal of Medicine*, 47(15), 175-1186.

Tiveljung, A., Borch, K., Jonasson, J., Mardh, S., Petersson, F. & Monstein, H. (1998). Identification of *Helicobacter* in gastric biopsies by PCR based on 16S rDNA sequences: a matter of little significance for the prediction of *H. pylori*-associated gastritis?. *Journal Medical Microbiology*, 47(8), 695-704.

Valentine, J. L., Arthur, R. R., Mobley, H. L. & Dick, J. D. (1991). Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(4), 689-695.

Vinette, K., Gibney, K., Proujansky, R. & Fawcett, P. (2004). Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiology*, 4, 171-178

Warren, S., & Newman, B. (1998). Designing a New study: Diagnostic test. In E. Hulley & S. Cumming (Eds.), *Designing Clinical Research* (pp. 87-93). Baltimore, CT: Williams and Wilkin.

Weiss, J., Mecca, J., Da Silva, E., & Gassner, D. (1994). Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1663-1668.

Woodford, N. & Sundsfjord, A. (2005). Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 259-261.

Yamamura, F., Yoshikawa, N., Akita, Y., Mitamura, K. & Miyasaka, N. (1999). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and histological features of gastritis in biopsy specimens in gastroduodenal diseases, including evaluation of diagnosis by polymerase chain reaction assay. *Journal of Gastroenterology*, 34, 461-466.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Tanahashi, T., Kashima, K. & Imanishib, J. (1998). Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *GUT*, 42, 609-617.

Zapatier, J., Gómez, N., Vargas, P. & Maya, S. (2007). Valoración de la serología como método diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la población local de la ciudad de Guayaquil. *Acta de Gastroenterología Latinoamericana*, 37(2), 104-109.

Zsikia, V. Hailemariam, S., Bauman, M., Mund, M., Schaub, N., Meier, R. & Cathomas, G. (2006). Increased rate of *Helicobacter pylori* infection detected by PCR in biopsies with chronic Gastritis. *American Journal of Surgical Pathology*, 30(2), 242-248.