

Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*

Silvia Giono Cerezo,* Margarita Camorlinga Ponce,** Germán Rubén Aguilar Gutiérrez***

RESUMEN. *Hp* se diagnostica por métodos invasivos con biopsia gástrica de antrópico, se cultiva y se hace estudio histológico. No invasivos, son serología o prueba de aliento. 152 *Hp* de 19 niños con gastritis (46.1%) con dolor agudo; 9 de un adulto. Hubo resistencia a ampicilina, 27.4%, claritromicina 21.8%, metronidazol 58.4% y tetraciclina 31.5%. El 21% sensibles a los cuatro. RAPD-PCR con cuatro iniciadores dio 44 perfiles, agrupó por cuadro clínico. En 7 niños, hubo dos perfiles RAPD. Tres similares pero distintos entre sí. AFLP 151 *Hp* de 23 adultos; más genotipos *cagA* y *vacA*, hubo patrones únicos para cada paciente. Los genes *cagA*, *babA* y *oipA*, se secuenciaron y con *Hp* reportadas (Genbank); dieron polimorfismo elevado. Todo indica hay colonización con múltiples cepas en los mexicanos. En 645 sueros de 352 niños: 36.9% con *Hp*, el 46.9% dio *anti-CagA* y 16.2% anticuerpos a ureasa. Adultos 293 (89.1%) con *Hp*, 78.9% dio *anti-CagA* y 59% anticuerpos a ureasa. La expresión de IL-8 fue mayor en niños infectados que en no infectados y significativa en úlcera péptica. La genoteca *Cag-PAI* reveló 90% *Hp*, tuvieron la isla completa, solo 2 incompleta y tres negativos. Se propone PCR- LiPA (Line Probe Assay) para ensayos de genotipificación.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, gastritis, PCR, genotipificación.

La importancia de *Helicobacter pylori* en las enfermedades gastroduodenales no fue entendida sino hasta que esta bacteria se descubrió accidentalmente por la incubación prolongada de un cultivo puro de una biopsia de la mucosa gástrica por Barry J. Marshall y J. Robin Warren, en 1983.⁷ Debido a esta importante contribución a las ciencias biológicas, estos dos investigadores australianos fueron galardonados con la distinción del Premio Nobel

ABSTRACT. *Hp* diagnostic is made by invasive methods using gastric biopsy of antrum, for culture and histological study. Non invasive are serology and urea breath test. 152 *Hp* from 19 children with acute gastritis (46.1%); 9 *Hp* from an adult. There had ampicillin resistance, 27.4%, claritromycin 21.8%, metronidazole 58.4% and tetracycline 31.5%, the 21% susceptible to four antimicrobial. RAPD-PCR with 4 primers gave 44 profiles, related with clinical profile. In 7 children, there were two profiles RAPD. Three were similar but different each other. AFLP 151 *Hp* of 23 adults 151 *Hp*; *cagA* and *vacA* genotypes gave unique patterns for each patient. The genes *cagA*, *babA* and *oipA*, sequencing and compared with reported *Hp* (Genbank); gave high polymorphism. Everything indicates that there are colonization with multiple *Hp* strains in Mexicans. In 645 sera from 352 children: 36.9% with *Hp*, the 46.9% gave him/her anti-shits and 16.2% antibodies to urease. Adults 293 (89.1%) with *Hp*, 78.9% gave anti-*CagA* and 59% antibodies to urease. The expression of IL-8 was bigger in infected children than in not infected and more significant in peptic ulcer. Genomic library *Cag-PAI* revealed 90% (*Hp*) positive, they had the complete PAI, 2 were incomplete and three negatives. PCR -LiPA LiPA (LineProbe Assay) is suggestive for genotyping assays.

Key words: *H. pylori*, gastritis, PCR, genotyping.

de Medicina en diciembre de 2005. Este Simposium del 4 de abril 2006, se realizó como homenaje a ellos, durante el desarrollo del 35 Congreso Nacional de Microbiología en Oaxtepec, Morelos, México. Tres de los cuatro participantes ofrecemos ahora un resumen ampliado de nuestra presentación.

H. pylori es una bacteria patógena que infecta el estómago, por lo que es reconocida como el agente causal de la gastritis crónica activa, es el principal factor de riesgo para desarrollo de úlcera gástrica y duodenal y está relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico. La prevalencia de la infección por *H. pylori* presenta una distribución diferente en el ámbito mundial, llegando hasta 50% en los países desarrollados y más de 80% en los países en vías de desarrollo. En países en desarrollo *H. pylori* se adquiere principalmente en la infancia antes de los diez años, por lo que el 80% de la población adulta se encuentra infectada por esta bacteria. Así, la mayoría de la población mundial se encuentra colonizada por *H. pylori* y permanecerá in-

* Departamento de Microbiología. ENCB-IPN Laboratorio de Bacteriología Médica. ENCB-IPN. Carpio y Plan de Ayala S/N Colonia Santo Tomás, 11340 México D. F. México. sgiono@yahoo.com. Beca Cofaa, Edi. Apoyo CONACYT y CGEPI.

** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI. margaritacamorlinga@yahoo.com

*** Departamento de Biología Molecular de Patógenos, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Col. Sta. Ma. Ahuacatitlán, 62508, Cuernavaca, Morelos, México. graguila@insp.mx. Apoyo CONACYT, donativo 37181-B.

fectadas durante décadas o incluso por toda la vida, dado que *H. pylori* es difícil de erradicar de forma natural, aun con el uso de antibióticos.¹ La infección por esta bacteria no es invasiva, por lo que está restringida a algunas secciones o “parches” en las zonas del estómago a nivel de antro, fondo y cardias gástricos, reside en condiciones microaerófilas entre el moco y el epitelio.⁹ De esta forma, los cambios inflamatorios asociados a la infección con *H. pylori* progresan durante toda la vida del individuo.⁹ Sin embargo, la manifestación de enfermedad casi siempre se presenta en la edad adulta.³

La alta prevalencia de la infección a nivel mundial ha estimulado el desarrollo de varios métodos para el diagnóstico de la infección de *Helicobacter pylori*. Estos se clasifican en invasivo y no invasivos; en el primero se necesita la biopsia gástrica, en el segundo se puede hacer serología o las pruebas de aliento. La biopsia es útil para hacer improntas teñidas con el fin de buscar a la bacteria, los cortes histológicos apoyan al diagnóstico anatomiopatológico.^{2,3,7} La zona de elección sugerida para la toma de biopsia gástrica es la zona del antro tomada mediante panendoscopia. Su cultivo es difícil dadas las condiciones nutricionales exigentes; sin embargo, es indispensable la recuperación de la bacteria porque confirma el diagnóstico y permite realizar las pruebas de identificación, genotipificación, ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, determinar factores de virulencia y diversidad genética a partir de las bacterias recuperadas de la muestra, esto permite hacer estudios de reinfecciones y recurrencias de la infección.²

El cultivo de aislamientos clínicos de *H. pylori* es un procedimiento largo y costoso ya que, se requiere de biopsias frescas de mucosa gástrica. Esto ha motivado la búsqueda de métodos alternativos que permitan la caracterización de factores de virulencia con la posibilidad de llevar a cabo, la tipificación de un gran número de cepas con fines epidemiológicos.⁹

Respuesta inmune a la infección por *H. pylori* en niños y adultos

La infección por *H. pylori* en el huésped desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar a la bacteria, pero juega un papel fundamental en la evolución de la infección hacia las distintas formas clínicas que son tan variadas como la gastritis superficial leve, úlcera duodenal o cáncer gástrico.^{2,3,10}

En la evolución de la infección influyen factores de la bacteria, del hospedero y ambientales; 60-80% de las cepas de *H. pylori* tienen el gen *cagA* que se encuentra en una isla de patogenicidad llamada *cag PAI*. La proteína Cag A es considerada como un marcador de patogenicidad,

ya que su presencia se relaciona con el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.

Otro factor de virulencia bacteriano importante es la ureasa, enzima producida por todas las cepas de *H. pylori*, que participa en la colonización del bacilo en el epitelio gástrico. La ureasa constituye el 5-10% del contenido total de proteínas de la bacteria, esta enzima convierte la urea gástrica en amonio y CO₂, lo que permite neutralizar el pH ácido del estómago. Las cepas de *H. pylori* ureasa negativas no pueden colonizar cerdos gnotobióticos, por lo que la ureasa es un factor importante en la iniciación de la infección o en favorecer la sobrevivencia del bacilo en la mucosa gástrica. Esta enzima es un poderoso inmunógeno, su papel en la colonización y su participación en la patogenicidad de la bacteria, la han convertido en un candidato aceptable para una vacuna. La inmunización oral con ureasa asociada con adyuvantes, se ha usado en experimentos de vacunación para prevenir la infección con *H. pylori* o *H. felis* en ratones, y ha mostrado que hay una protección significativa.

A pesar de su importancia en la evolución de la infección por *H. pylori*, muy pocos estudios han evaluado la respuesta inmune a los factores de virulencia como *CagA* y ureasa en niños y adultos infectados con el bacilo.¹³

En un estudio realizado en el laboratorio, se estudiaron sueros de 645 pacientes, incluyendo 352 niños y 293 adultos. La infección por *H. pylori* se detectó por serología en 130 niños (36.9%); entre los infectados, 61 (46.9%) tenían anticuerpos IgG contra *CagA* y 21 (16.2%) tenían anticuerpos contra ureasa. Entre los adultos, 261 (89.1%) de 293 estaban infectados con el bacilo: de éstos, 206 (78.9%) tenían anticuerpos contra *CagA* y 154 (59%) tenían anticuerpos contra ureasa. La magnitud de la respuesta de IgG a *CagA* y ureasa fue diferente en los niños que en los adultos estudiados. Los adultos mostraron una respuesta anti-*CagA* significativamente mayor y hubo una respuesta de IgG a ureasa significativamente menor que en los adultos. La cinética de la respuesta serológica a *CagA* y ureasa a través de la edad fue estadísticamente significativa entre ambos grupos.⁵

La respuesta inflamatoria que se observa en la mucosa gástrica por la infección con *H. pylori* es una gastritis activa con infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Además, está caracterizada por un incremento en la producción de citocinas inflamatorias tales como IL1 β , IL-8, IFN γ .

De éstas, la interleucina (IL)-8, es una quimiocina perteneciente a la familia C-X-C, que actúa como un quimiotractante en la inmunopatogénesis de la gastritis, induciendo la migración de PMN frente a una infección por *H. pylori*. La IL-8 es producida por las células epiteliales gástricas en respuesta a la infección y su expresión es induci-

da por la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Múltiples genes que están contenidos en la isla *cag* PAI, parecen estar involucrados en estimular la respuesta epitelial de IL-8 después de la adhesión de *H. pylori*.⁹

En un estudio realizado en niños infectados y no infectados con *H. pylori* y en adultos con úlcera péptica y dispepsia no ulcerosa, determinamos: la intensidad de inflamación, intensidad de colonización y la magnitud de la respuesta de IL-8.⁴

Observamos que la intensidad de la expresión de IL-8 fue significativamente mayor en los niños infectados con *H. pylori* que en los no infectados (5.1 ± 3.8 vs $2.08 \pm 2.2\%$ de área teñida, $p < 0.05$). En los adultos la producción de IL-8 en el antro fue mayor en los grupos con úlcera en comparación con los que presentaban gastritis crónica, diferencias que fueron estadísticamente significativas (gastritis 2.3 ± 2.1 , úlcera duodenal 10.1 ± 6.3 , úlcera gástrica 9.8 ± 6.4 , $p < 0.05$).

Los grupos con úlcera tuvieron niveles de IL-8 mayores en la región del cuerpo, en comparación del grupo con gastritis crónica (GC) esta diferencia también resultó significativa ($p < 0.001$). La expresión de IL-8 se observó aumentada en la superficie de células epiteliales y en algunas células mononucleares que estaban infiltrando lámina propia. Los niños no infectados mostraron la presencia débil de la señal IL-8 en el epitelio. Tanto en niños como en adultos, el marcaje de IL-8 no siempre co-localizó con *H. pylori*, hubo tejidos epiteliales en donde se observó que había una colonización por *H. pylori* en regiones distintas a las que se observaba la expresión de la interleucina.

DIVERSIDAD GENÉTICA

H. pylori muestra diversidad genética, atribuida a la derivación genética y a la transferencia horizontal de genes. Durante el largo tiempo de colonización puede haber infección por poblaciones bacterianas genética y fenotípicamente heterogéneas. Hay secuencias únicas que son producto de frecuencias de recombinación elevadas, en ausencia de mecanismos efectivos para seleccionar a la población de cepas recombinantes. *H. pylori* presenta población panmítica en equilibrio que se selecciona y exhibe cambios entre aislados clínicos, que se producen por la recombinación e intercambio horizontal de genes. Las infecciones mixtas pueden ser sólo transitorias, con múltiples cepas de *H. pylori*, con intercambios genéticos frecuentes.

La diversidad de secuencias en *H. pylori* puede reflejar una alta tasa de mutaciones debido posiblemente a “fenotipos mutadores” causados por baja actividad o falta de genes involucrados en la reparación de DNA, como se ha observado en otras especies. La naturaleza no clonal de *H. pylori* favorece que los distintos aislados puedan ser iden-

tificados usando técnicas de “huella genética” de DNA.^{1,13,14} En infección crónica hay transferencia horizontal de genes; estos eventos en *H. pylori* revelan que aunque su huella genética puede ser semejante a la cepa que se adquirió en la infancia, tienen acumulada mucha variabilidad genética que puede ser detectada empleando técnicas de diversidad.^{1,2} La técnica de RAPD-PCR puede distinguir entre cepas de diferentes individuos, así como entre cepas del mismo paciente.¹

La técnica de AFLP también es un método de amplificación que, en contraste con otras técnicas basadas en el azar, utiliza condiciones de PCR astringentes.¹² Los iniciadores para AFLP son de 17 a 21 nucleótidos y se alinean con sus secuencias blanco (el adaptador y los sitios de restricción); el número de bandas es reproducible y aceptable, ya que contiene un número de nucleótidos pequeño, que quedan adyacentes a los sitios de restricción. AFLP es por lo tanto, una técnica confiable que no es afectada por variaciones pequeñas como son las mutaciones silenciosas presentes a lo largo del genoma.⁶

Las cepas con genes *vacA* *cagA* y *babA* se usan para definir los polimorfismos, tienen una distribución geográfica particular y presentan huellas genéticas que distinguen a las cepas de *H. pylori* en “Asiáticas” y “No asiáticas”.¹¹ La separación geográfica puede ser el resultado de polimorfismos de genes asociados a virulencia y la fijación de mutaciones en distintas áreas.^{14,15}

El tratamiento incluye un inhibidor de la bomba de protones más dos agentes antimicrobianos que pueden ser: amoxicilina (Am), claritromicina (CH), metronidazol (Mtz) y tetraciclina (Tt). Sin embargo, la resistencia a antibióticos está alterando la eficacia del tratamiento de erradicación y el tratamiento en individuos asintomáticos sigue siendo discutible.⁸

La diversidad genética de cepas de *H. pylori* aisladas de niños con alteraciones gastroduodenales se estudió empleando la técnica de RAPD-PCR. Se utilizó la técnica de RAPD-PCR con cuatro iniciadores con secuencias seleccionadas al azar.

Se estudiaron 152 cepas de *H. pylori* aisladas de biopsia gástrica: 142 cepas aisladas de 19 niños y 9 cepas aisladas de un paciente adulto. Se usaron *H. pylori* ATCC 43504 y *S. aureus* ATCC 29213 de referencia para validar. La susceptibilidad a CH se hizo por tira E, para los antibióticos Am, Tt y Mtz se empleó el replicador de “Steers” para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los valores para definir resistencia a Am, CH, Mtz y Tt fueron ≥ 4 , 1, 8 y 2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

La prevalencia de la infección en niños mexicanos estudiados, fue de 13.3%. La edad de inicio de la colonización en niños fue cercana a 2 años. El dolor abdominal severo o recurrente (DAR) fue la historia prediagnóstica más

frecuente, que hizo que se enviaran por el gastroenterólogo a la Unidad de Endoscopia, para la toma de la biopsia, con objeto de poder descartar la presencia de infección por *Helicobacter pylori*. La gastritis nodular crónica se observó por endoscopia en 46.1%.

En este estudio, hubo resistencia amoxicilina en 27.4%; claritromicina 21.8%; metronidazol, 58.4% y a tetraciclina, 31.5%. El 44.3% fue resistente a dos antimicrobianos, la combinación amoxicilina-metronidazol 16.9%. El 21% fueron sensibles a los cuatro antimicrobianos. No hubo cepas de *H. pylori* multirresistentes a los cuatro antimicrobianos.

La técnica RAPD-PCR con 4 iniciadores produjo 134 marcadores y 44 perfiles RAPD reproducibles entre las 153 cepas de *H. pylori*.¹ El análisis RAPD se agrupó por cuadro clínico. La mayoría de los niños fue colonizada por un solo tipo homogéneo de patrón en cada uno; pero con RAPD diferentes entre ellos, o con diferencias muy sutiles. En siete niños hubo dos poblaciones con diferentes perfiles RAPD. Tres niños tuvieron cepas similares a otros, pero independientes entre sí. El estudio indica que existe colonización con múltiples cepas en niños mexicanos.

En pacientes adultos con enfermedad ácido péptica, que acudían al servicio de gastroenterología, se determinó por AFLP a las cepas clínicas de *H. pylori* obtenidas. La técnica de AFLP estandarizada se utilizó para obtener los perfiles AFLP de 151 cepas aisladas de 23 pacientes con *H. pylori*; además se hicieron genotipos para dos factores de virulencia *cagA* y *vacA*. Por AFLP de 23 biopsias de adultos, se obtuvieron varias colonias individuales de cada cultivo; con estas clonas, se hizo el análisis de los patrones; que fueron muy semejantes entre sí, cuando se agrupaban por paciente; pero mostraban bandas muy diversas si se comparaban los AFLP de un paciente con el otro. Por lo tanto, se concluyó que hubo diversidad genética, entre las cepas de uno y de otro paciente, aun cuando compartían algunas bandas.

Para estudiar el polimorfismo y filogenia de genes asociados a virulencia; además del AFLP, se buscó por secuenciación diferencias, *cagA*, *babA* y *oipA* de cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal procedentes de México y de otras zonas geográficas, incluyendo algunas de origen asiático y otras que se obtuvieron del banco de genes, con ellas se formó un tercer grupo de estudio. Se seleccionaron 13 cepas mexicanas para el gen *cagA*, 10 cepas para *babA* y 11 para el gen *oipA*, se obtuvo el DNA, se amplificaron los genes por PCR. Los genes *cagA*, *babA* y *oipA* se secuenciaron de manera automatizada (ABI PRIMS 100, modelo 377). Las secuencias fueron comparadas con *H. pylori* de otras zonas geográficas, reportadas en el Genbank. El polimorfismo de las secuencias fue analizado con el programa DNAsp 3.5 y

los árboles filogenéticos fueron construidos por el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA 2.1.

Brevemente, el resultado indicó que las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes de México, dieron un mayor porcentaje de polimorfismo en los tres genes asociados a virulencia, *cagA*, *babA* y *oipA* que el observado en otras cepas de origen occidental. En estos trabajos concordamos con otros autores, en el sentido de que los estudios de genotipificación son importantes.^{11,14,15}

La caracterización molecular de *Helicobacter pylori* como una medida preventiva para el desarrollo de cáncer gástrico.

Dado que *H. pylori* constituye un importante problema de salud pública, en la última década, se han desarrollado técnicas moleculares de valor diagnóstico y epidemiológico, que han permitido implementar mejores terapias de erradicación, así como conocer mejor a la bacteria.

El principal objetivo del grupo del Instituto Nacional de Salud Pública consiste en identificar a los elementos genéticos que convierten a *H. pylori* en un agente carcinogénico mediante la tipificación de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes que han desarrollado, o no, cáncer gástrico; esto con la finalidad de identificar un marcador temprano de dicha enfermedad que pueda ser utilizado como método de diagnóstico preventivo.

De este modo se han estudiado algunos aspectos genéticos que se han enfocado al estudio de la isla de patogenicidad *cagA* (cag PAI) de *H. pylori* que es uno de los factores de virulencia más importantes de este microorganismo.

cag PAI contribuye a producir inflamación y daño de la mucosa gástrica, al inducir la secreción de IL-8, además tiene la característica de experimentar inserciones, eliminaciones y rearreglos genéticos que han llevado a la generación de cepas de *H. pylori* con diferentes grados de virulencia, que determinan el grado de deterioro del epitelio gástrico y como consecuencia, la evolución de la infección.

Por lo anterior, analizamos la asociación entre el grado de virulencia con base en la estructura genética de la isla *cag PAI* y lo comparamos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La manera como abordamos este objetivo, fue mediante la determinación de la heterogeneidad genética de *cag PAI*, a través de la detección de genes con marcadores específicos de la *cag PAI* de cepas obtenidas de aislamientos clínicos de *H. pylori* de biopsias de pacientes mexicanos con distintos padecimientos gastroduodenales.

Para ello, se realizó la construcción de una biblioteca genética de la isla *cag PAI* a partir de la cepa de referencia de *H. pylori* 26695. Se obtuvieron un total de 13 plásmidos recombinantes que contenían clonados fragmentos DNA-intragénicos, de cada uno de los genes marcadores,

los cuales se utilizaron como detectores en experimentos de hibridación tipo "Southern Blot" (dot blot). El 90% de los aislamientos tuvieron la *cag* PAI completa. Dos aislamientos presentaron una isla incompleta; uno de ellos fue negativo para tres genes, en tanto que un aislamiento careció de uno de los genes marcadores. En tres aislamientos no se detectó la presencia de la isla de patogenicidad.

Los resultados obtenidos de este trabajo indican que la *cag* PAI se encuentra ampliamente distribuida en los aislamientos clínicos mexicanos, por lo que la infección con cepas *cag* PAI positivas puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades úlcero-pépticas que eventualmente pueden dar origen a enfermedades graves como el cáncer gástrico.

El método de tipificación de *cag* PAI permite determinar la integridad de la isla de patogenicidad; sin embargo, no podemos hacer una afirmación categórica a este respecto debido al tamaño pequeño de la muestra de estudio. Se hace necesario entonces, el hacer un análisis de la heterogeneidad genética de la *cag* PAI en una colección más grande de aislamientos clínicos de *H. pylori* de pacientes con diversas patologías gastroduodenales, ya que de esta forma podríamos tener un mayor apoyo a nuestra hipótesis. Asimismo, sería necesario plantear estudios de seguimiento.

Una técnica que posee la ventaja de abordar la tipificación de un gran número de cepas con fines epidemiológicos, es realizada mediante amplificación genómica por PCR seguida de hibridación reversa en tira (PCR-Line Probe Assay, o LiPA). El soporte de la hibridación consiste en tener una tira diagnóstica de nitrocelulosa marcada con sondas de oligonucleótidos específicos que quedan inmovilizadas en líneas paralelas. Estas sondas son complementarias a una secuencia del DNA, que corresponde al gene que se quiere estudiar. Posteriormente, se genera un fragmento de PCR de la región de interés, utilizando oligonucleótidos con cebadores biotinilados que permiten el revelado de la reacción. El producto biotinilado de la PCR en condiciones alcalinas, se añade a la tira diagnóstica para permitir la hibridación con los oligonucleótidos presentes en la sonda. Después de la hibridación y de hacer un lavado astringente se añade un conjugado compuesto por estreptavidina-fosfatasa alcalina, que se une al híbrido formado, sobre la tira diagnóstica. Se agrega el sustrato de la fosfatasa alcalina, que así produce un precipitado marrón-púrpura en las líneas de la posición correspondiente en la tira, el cual puede ser interpretado visualmente. Se recomienda poner un testigo negativo y un control negativo para interpretar mejor el resultado.

La técnica molecular de PCR-LiPA en *H. pylori* está siendo utilizada para la identificación de mutaciones que confieren resistencia a macrólidos.¹⁶ Esta surgió como

consecuencia de la necesidad de una técnica rápida y confiable para la detección de resistencia a los antibióticos, que permitiera un adecuado tratamiento de erradicación en pacientes infectados por esta bacteria. Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos convencionales como la dilución de agar y E-test, requieren prolongados períodos de cultivo de la bacteria. En contraste, la herramienta molecular PCR-LiPA puede aplicarse directamente a los especímenes de las biopsias gástricas, dado que este método molecular no depende de la densidad bacteriana, ni de la viabilidad y/o la velocidad de crecimiento.¹⁵ Las ventajas de dicha técnica han sido confirmadas comparando los resultados de la susceptibilidad de los aislamientos clínicos de *H. pylori* a macrólidos por procedimientos convencionales (dilución de agar o E-test), con los resultados obtenidos del análisis molecular por PCR-LiPA en seis laboratorios alrededor del mundo. Por lo tanto, este método demostró ser más confiable y reproducible que los resultados del ensayo de susceptibilidad con base en el crecimiento celular.⁸

Esta técnica molecular también está siendo utilizada como un método de diagnóstico para la tipificación del gen *vacA* y para determinar la presencia del gen *cagA* de cepas de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas.^{5,14,15} Sin embargo, aunque el gen *cagA* es un marcador de la isla *cag* PAI no es un buen marcador diagnóstico del desarrollo de enfermedades graves, como el cáncer gástrico.

De acuerdo con lo anterior, la propuesta de este proyecto de investigación es desarrollar una tira de diagnóstico preventivo basado en la técnica PCR-LiPA, como una herramienta molecular para llevar a cabo la caracterización genotípica de la isla de patogenicidad *cag* de cepas infectantes de *H. pylori* de 637 pacientes mexicanos, a partir de muestras de mucosa gástrica. La eficiencia de este método será evaluada comparando los resultados obtenidos de cultivos celulares de los aislamientos clínicos de *H. pylori*, con los de las biopsias gástricas de los pacientes estudiados.

Este trabajo presenta un resumen con parte de los resultados de tres tesis, una de maestría y dos de doctorado, asimismo representa el avance obtenido en cada uno de ellos. Cabe mencionar que será publicado en forma independiente por cada uno de los autores. Esto es un resumen con parte de esos resultados. Comunicación personal Silvia Giono C,* Sara Ochoa Pérez,* Cristina Majalca Martínez,* Araceli Torres Morquecho* y Javier Torres López.**

REFERENCIAS

1. Akopyanz, N., Bulkanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E. 1992a. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acid. Res. 20(19): 5137-5142.

2. Blaser M. J. and J.C. Atherton. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease J. Clin. Invest. 113:321–333.
3. Blaser M. J. 1999. Hypothesis: The changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans. Implications for Health and Disease. J. Infect. Dis. 179:1523–30.
4. Camorlinga-Ponce M, Avilés-Jiménez F, Cabrera L, Hernández-Pando R, Muñoz O, Torres J. 2003; Intensity of Inflammation, density of colonization and Interleukin-8 response in the gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8: 554-560.
5. Camorlinga-Ponce M, Torres-López J, Pérez-Pérez G, Leal-Herrera Y, González-Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gómez A, Y Muñoz O. 1998. Validation of a serologic test for the diagnosis for *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and Cag A in children. Am J Gastroenterol, 93: 1264-1270.
6. Gibson J.R., Slater E., Xerry J., Tompkins D.S. and Owen R.J. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 36(9):2580-2585.
7. Marshall, B. J. & Warren, J.R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. Lancet I: 1311-1315.
8. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, Unge P, Veldhuyzen Van Zanten S, Wrangstadh M, Burman CF. 1999. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* a large multicenter trial: the MACH 2 study. Antimicrob Agents Chemother 43:2747-2752.
9. Montecucco C, Rappuoli YR. 2001. Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. Nature Rev. 2:457-65.
10. Perez-Perez G, Rothenbacher, and H. Brenner. 2006. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 9(Suppl. 1): 1-6.
11. Ryan KA, Van Doorn LJ, Moran AP, Glennon M, Smith T, Maher M. 2001. Evaluation of Clarithromycin Resistance and cagA and vacA Genotyping of *Helicobacter pylori* Strains from the West of Ireland Using Line Probe Assays. J Clin Microbiol 39: 1978-1980.
12. Savelkoul, H.J.M. Aarts, J. de HAAS, L. Dijkshoorn, B. Duin, M. Otsen, J.L.W. Radermaker, L. Schouls AND J.A. Lenstra. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J. Clin. Microbiol. 57(10):3083-3091.
13. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Pérez-Pérez G, Muñoz L, Muñoz O. 2002. Specific serum immunoglobulin G response to urease and CagA antigens of *Helicobacter pylori* in infected children and adults in a country with high prevalence of infection. Clin Diag Lab Immunol, 9: 97-100.
14. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WG. 1998 Typing of *Helicobacter pylorivac A* Gene and Detection of cagA Gene by PCR and Reverse Hybridization. J Clin Microbiol May; 36(5):1271-1276.
15. Van Doorn LJ, Henskens Y, Nouhan N, Verschueren A, Vreede R, Herbrink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint W. 2000. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and vacA, cagA, and iceA genotypes. J Clin Microbiol. 38:13-17.
16. Wolle K, Leodolter A, Malfertheiner P, Konig W. 2002. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. J Med Microbiol 51:705-709.

Correspondencia:

Silvia Giono Cerezo

Departamento de Microbiología. ENCB-IPN
Laboratorio de Bacteriología Médica.
Carpio y Plan de Ayala S/No., Colonia Santo Tomás, 11340, México D. F. México.
sgiono@yahoo.com.