

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*

**Centro de Investigación en Biotecnología
Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos
CEQIATEC
Laboratorio de Bacteriología Médica, Facultad de Microbiología
Universidad de Costa Rica**

Gustavo Alonso López Cascante

CARTAGO, 2007

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*

Gustavo Alonso López Cascante*

RESUMEN

Helicobacter pylori, un microorganismo gramnegativo, microaerofílico y flagelado, es considerado uno de los factores causales más importantes de trastornos gástricos, en especial el desarrollo de cáncer gástrico, y se ha sugerido como reservorio las fuentes de agua para consumo humano. Debido a la dificultad en su cultivo, se ha recurrido a las técnicas moleculares, en especial, la técnica de PCR para su diagnóstico, principalmente cuando ha sido analizado a partir de aislamientos ambientales. En este Trabajo se evaluaron protocolos de PCR para la detección de las regiones ARNr 16S, *glmM*, *ureA*, *cagA* y *vacA* en cultivos bacterianos aislados y cultivados a partir de varias fuentes de abastecimiento de agua en Costa Rica. El ADN de las muestras fue extraído mediante el Kit Wizard® de PROMEGA, el cual resultó ser un kit eficaz en la purificación del ADN genómico de las mismas. Los protocolos de PCR evaluados fueron específicos para la detección de ADN de *H. pylori*. Los protocolos para las regiones *glmM* y *ureA* permitieron la identificación de *H. pylori* en las muestras ambientales valoradas. Debido a la generación de productos inespecíficos, no se logró definir el genotipo *vacA* de una de las muestras ambientales. Se puede concluir que los métodos desarrollados en este Trabajo se pueden utilizar como alternativa para la detección de ADN de *H. pylori* en muestras aisladas de fuentes de agua. Se recomienda una mayor optimización de los mismos para la valoración de cepas de distintas procedencias, en especial, de origen ambiental. Asimismo, se recomienda complementar la identificación molecular de *H. pylori* en cepas ambientales con otras técnicas microbiológicas y/o bioquímicas para confirmar el resultado obtenido.

Palabras Clave: *Helicobacter pylori*, PCR, Wizard®, ARNr 16S, *glmM*, *ureA*, *cagA*, *vacA*

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Johnny Peraza Moraga
Profesor Asesor-ITCR**

**Dra. Virginia Montero, M.Q.C.
Asesora- Empresa**

**Ing. Olga Rivas Solano
Lectora**

DEDICATORIA

A mis Padres y Hermana, los pilares más importantes en mi vida y en quienes me apoyo para la realización de mis sueños.

Gustavo

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento:

A Dios, en quien encomiendo en sus manos todas mis acciones y decisiones, y me da la oportunidad de atesorar todos los momentos que disfruto en mi vida y con mis seres queridos.

A mis Padres Eduardo y Nidia, y a mi hermana Samantha, quienes siempre han estado a mi lado en los buenos y en los malos momentos, y que con su apoyo incondicional he logrado superar todos aquellos obstáculos que se me han presentado.

Al MSc. Johnny Peraza Moraga por su valioso aporte y apoyo en la realización de este Trabajo Final de Graduación, así como en la autorización para el uso del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Biotecnología (ITCR) para el desarrollo de este Trabajo.

A la Dra. Virginia Montero Campos, quien depositó su confianza en mí y me brindó el consejo necesario para el desarrollo y culminación de este Trabajo Final de Graduación.

Al Dr. Fernando García, PhD, quien no dudó en ningún momento en facilitar el uso de equipo y las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología (UCR) para la realización de ciertas tareas que contempla este Trabajo.

A mis estimados compañeros de trabajo del Laboratorio CEQIATEC, quienes desde que inicié mis labores en el Centro y en especial en este Trabajo, no han dejado de demostrar su interés, apoyo y cooperación durante mi permanencia en el mismo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE GENERAL	V
INDICE DE CUADROS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN DE LITERATURA	14
DESCUBRIMIENTO DE <i>H. pylori</i>	14
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	16
Morfología	16
Formas cocoides	17
GÉNETICA	18
Genoma	18
Intercambio Genético	19
Replicación, Transcripción y Traducción	20
Regulación Génica	21
Mutagénesis	21
La Isla de Patogenicidad <i>cag</i>	22
Ureasa	23
Fosfoglucosamin Mutasa	24
Citotoxina Vacuolizante	25
EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN	25
RUTAS DE TRANSMISIÓN	26
El agua como reservorio de <i>H. pylori</i>	27

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN	28
Cultivo	28
Estudios <i>In Situ</i>	29
Prueba de Ureasa y Prueba de Aliento	29
DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE PCR	30
Técnicas de PCR basadas en Secuencias Arbitrarias	31
Genotipado basado en Loci Específicos mediante PCR	32
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
MUESTRAS	35
EXTRACCIÓN DE ADN	36
Preparación inicial de las muestras	36
Método de extracción	36
Valoración del ADN extraído por Electroforesis en Gel de Agarosa	38
Estimación de la concentración de ADN	38
EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR	39
Oligonucleótidos	39
glmM (Fosfoglucosamin Mutasa)	40
ureA (Ureasa)	41
ARNr 16S	42
cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)	43
vacA (Toxina Vacuolizante)	44
VALORACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES	46
glmM (Fosfoglucosamin Mutasa)	46
ureA (Ureasa)	46
ARNr 16S	46
cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)	47
vacA (Toxina Vacuolizante)	47
ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE PCR	47

RESULTADOS	48
EXTRACCIÓN DE ADN	48
EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR	50
glmM (Fosfoglucosamin Mutasa)	50
ureA (Ureasa)	51
ARNr 16S	52
cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)	55
vacA (Toxina Vacuolizante)	57
VALORACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES	63
glmM (Fosfoglucosamin Mutasa)	63
ureA (Ureasa)	64
ARNr 16S	65
cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)	67
vacA (Toxina Vacuolizante)	68
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	88

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Secuencias nucleotídicas para <i>H. pylori</i> utilizadas para su detección por medio de la técnica de PCR	40
2	Secuencias nucleotídicas empleadas para la amplificación de las variantes alélicas de la región <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> por PCR	40
3	Perfil térmico para PCR de región <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i>	41
4	Perfil térmico para PCR de región <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i>	42
5	Perfil térmico para PCR de región ARNr 16S de <i>H. pylori</i>	43
6	Perfil térmico para PCR de región <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i>	44
7	Perfil térmico para PCR de polimorfismos <i>vacA</i> en <i>H. pylori</i>	45
8	Concentración (ng/μl) de ADN genómico en distintas muestras	49
9	Resultados de PCR de los genes ARNr 16S, <i>glmM</i> , <i>ureA</i> y <i>cagA</i> , para todas las muestras analizadas	69
10	Resultados de PCR de la región <i>vacA</i> para varias muestras	70
11	Número y Porcentaje (%) de muestras, de tipo ambiental, positivas para cada gen evaluado por PCR para la identificación de <i>H. pylori</i>	70
12	Genotipo <i>vacA</i> sugerido para varias muestras según resultados de PCR	70

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Imagen por Microscopía Electrónica de la colonización de <i>H. pylori</i>	15
2	Polimorfismo del gen <i>vacA</i>	33
3	Visualización de ADN genómico para distintas muestras	48
4	Visualización de productos de PCR para la región <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> (294 pb)	50
5	Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> (294 pb)	51
6	Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> (411 pb)	52
7	Visualización de productos de PCR para la región ARNr 16S de <i>H. pylori</i> (992-1500 pb)	53
8	Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región ARNr 16S de <i>H. pylori</i> (992-1500 pb)	54
9	Visualización de productos de PCR (2ª modificación) para la región ARNr 16S de <i>H. pylori</i> (992-1500 pb)	55
10	Visualización de productos de PCR para la región <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> (128 pb)	56
11	Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> (128 pb)	56
12	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA s1a</i> de <i>H. pylori</i> (190 pb)	57
13	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA s1b</i> de <i>H. pylori</i> (187 pb)	58
14	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA m1</i> de <i>H. pylori</i> (290 pb)	59

Núm.	Título	Pág.
15	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA m2</i> de <i>H. pylori</i> (352 pb)	59
16	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA s1a</i> de <i>H. pylori</i> (190 pb), 2ª Evaluación	60
17	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA s1b</i> de <i>H. pylori</i> (187 pb), 2ª Evaluación	61
18	Visualización de productos de PCR para la región <i>vacA m2</i> de <i>H. pylori</i> (352 pb), 2ª Evaluación	62
19	Visualización de productos de PCR para identificar la región <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> (294 pb) en una muestra ambiental	63
20	Visualización de productos de PCR para identificar la región <i>glmM</i> de <i>H. pylori</i> (294 pb) en distintas cepas de agua	64
21	Visualización de productos de PCR para identificar la región <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> (411 pb) en distintas cepas aisladas de agua	65
22	Visualización de productos de PCR para identificar la región ARNr 16S de <i>H. pylori</i> (992-1500 pb) en una muestra ambiental	66
23	Visualización de productos de PCR para identificar la región ARNr 16S de <i>H. pylori</i> (992-1500 pb) en distintas cepas aisladas de agua	66
24	Visualización de productos de PCR para identificar la región <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> (128 pb) en una muestra	67
25	Visualización de productos de PCR para identificar la región <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> (128 pb) en distintas cepas aisladas de agua	68

INTRODUCCIÓN

A inicios del siglo XX la mayor parte de las muertes en seres humanos se debían a enfermedades infecciosas, debido al limitado control sobre los microorganismos que las causaban, pero sobre todo, al poco conocimiento que se tenía de ellos. El avance y mejoramiento de las técnicas con que se tratan estas enfermedades fue creciendo hasta la actualidad, no sólo en la forma en que la medicina ha ayudado a contrarrestarlas, sino también en la identificación y estudio de los agentes que las causan.

Aún así, resulta evidente que los microorganismos pueden ser todavía una amenaza para la supervivencia. Un caso importante de destacar es la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* y su correlación con el desarrollo de gastritis, úlceras pépticas y cáncer de estómago.

El cáncer gástrico es una de las neoplasias que produce mayor mortalidad en la población mundial. En el año 2000 el número de casos nuevos fue mayor a un millón, dos tercios de los cuales aparecieron en los países en desarrollo. Costa Rica, Japón, Corea, Portugal, Polonia y Chile son los países con más alta incidencia y mortalidad por este padecimiento. En Latinoamérica, Costa Rica ocupa el primer lugar en incidencia seguido de Chile y ambos países representan cerca del 50% de la mortalidad por cáncer gástrico en el continente (Sierra *et al*, 2002).

La infección por *H. pylori*, aislada principalmente de biopsias gástricas para su posterior análisis en laboratorio, ha sido altamente estudiada por su incidencia en el desarrollo de este padecimiento. No obstante, no se ha establecido cuál es el modo específico de transmisión de este microorganismo.

Se ha dificultado su análisis cuando se ha querido aislar de muestras ambientales, debido principalmente a su característica de modificar su morfología espiral a una forma cocoide, la cual se ha considerado “viable pero no cultivable”. Debido a la dificultad en cuanto al manejo de esta bacteria en laboratorio, se ha recurrido al uso de las técnicas de biología molecular, en especial la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Chen, 2004), con una alta sensibilidad y especificidad, y con la ventaja de poder detectar la bacteria independientemente de su viabilidad en cualquier tipo de muestra analizada.

Este Trabajo Final de Graduación pretende la identificación molecular de *H. pylori* en cepas bacterianas aisladas de fuentes de agua de consumo humano, utilizando la técnica de PCR y empleando oligonucleótidos específicos para la detección y genotipado de esta bacteria.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), en colaboración con el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos CEQIATEC, ambos centros pertenecientes al Instituto Tecnológico de Costa Rica. Asimismo, parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

El trabajo se enmarca dentro del Proyecto de Investigación “Determinación de *Helicobacter pylori* en abastecimientos de agua de consumo humano y su implicación en el manejo del agua en Costa Rica”, iniciado en el CEQIATEC a partir del año 2005, y cuyo propósito es evaluar la posible presencia de esta bacteria en diversas fuentes de agua, utilizada para consumo de la población costarricense.

El Trabajo Final de Graduación comprende tres actividades: 1) la evaluación de un kit comercial para la extracción de ADN; 2) la valoración y estandarización de los protocolos de PCR para cada oligonucleótido empleado para la caracterización de las cepas; y por último 3) el ensayo de los protocolos optimizados para la identificación de cepas de *H. pylori* aisladas de diversas procedencias.

Este trabajo pretende ofrecer una alternativa para el diagnóstico clínico y ambiental de esta bacteria, así como complementar otras técnicas de identificación de la misma, que permita la adecuada detección temprana para incidir en la toma de decisiones por parte de las autoridades a las cuales les corresponde tal acción.

REVISIÓN DE LITERATURA

DESCUBRIMIENTO DE H. pylori

Desde el último cuarto del siglo XIX se ha documentado en detalle sobre las patologías y alteraciones asociadas a la fisiología gástrica, aunque mucha de la información recabada estaba relacionada con la etiología de estas enfermedades. Esta información data desde los días de Hipócrates, a quien se le atribuye ser el primero en describir los primeros síntomas de una afección gástrica, los cuales incluían ardor epigástrico y aerofagia. A pesar de ello, a finales del siglo XVIII y principios del siglo XIX, debido a la baja resolución de la microscopía, se obtenían imágenes distorsionadas que confundían a los científicos de la época, lo que obligó a utilizar otro tipo de técnicas para la investigación de microorganismos asociados a enfermedades de tipo gástrico (Kidd & Modlin, 1998).

En 1979 Robin Warren notó la presencia de bacterias curvadas en biopsias gástricas sometidas a exámenes histológicos, las cuales estaban presentes en la capa superior de la mucosa gástrica y no dentro de ella. Estos microorganismos ya habían sido descritos a finales del siglo XIX pero no fueron aislados por las limitadas técnicas con las que contaban. Barry Marshall se interesó en las observaciones de Warren, y ambos se propusieron aislar estas bacterias a partir de biopsias gástricas, empleando métodos utilizados para aislar especies de *Campylobacter*, debido a la morfología similar que tenían con esta bacteria (Dunn *et al*, 1997).

Después de varios intentos de aislar el microorganismo, Warren y Marshall lograron aislar la bacteria después de cinco días de cultivo, logrando publicar los resultados de su trabajo en 1982 (figura 1). Sin embargo, la comunidad científica se mostró escéptica con estos resultados, lo que causó la determinación de ambos investigadores en convencerlos. Para 1985, Marshall se sometió a un estudio histológico de su condición gástrica, mostrando que no tenía enfermedad alguna y que no poseía la bacteria; se infectó a sí mismo con la bacteria, y después de dos semanas, a partir de una biopsia gástrica, se observó el desarrollo preliminar de una dolencia gástrica benigna que confirmó la relación de esta bacteria con el desarrollo de padecimientos en el estómago (Ahmed, 2005).

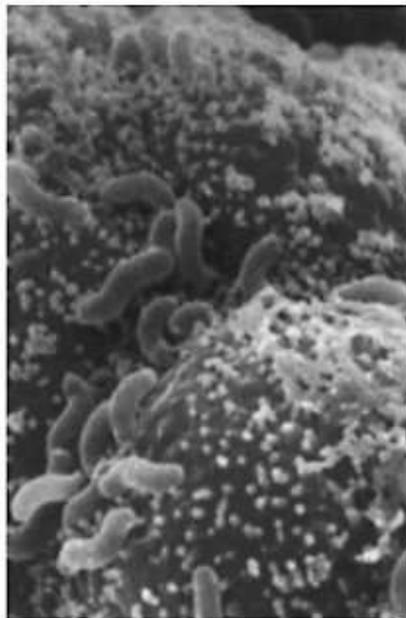


Figura 1. Imagen por Microscopía Electrónica de la colonización de *H. pylori*.
Fuente: Kidd & Modlin, 1998

El microorganismo aislado fue caracterizado y denominado *Campylobacter pyloridis*, pero luego se cambió su nombre en 1989 a *Helicobacter pylori*. Al igual que Warren y Marshall, otros investigadores lograron aislar esta bacteria, confirmando su presencia en la mucosa gástrica. Hoy en día, se conoce sobre la asociación de la infección de *H. pylori* con el desarrollo de diversos padecimientos gástricos, como lo son la gastritis crónica (superficial y activa) y el desarrollo de úlceras pépticas (ulceración duodenal y gástrica). En 1991 se publicó sobre la relación de la infección de *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico, y en 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, órgano perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), declaró a la bacteria *H. pylori* como agente carcinógeno para los seres humanos (Dunn *et al*, 1997).

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Morfología

H. pylori es un microorganismo espirilado, microaerófilo y Gramnegativo, que presenta terminaciones redondeadas (observadas en especies aisladas de biopsias gástricas) y de uno a seis flagelos (unipolar). Sin embargo, cuando se cultiva en medio sólido, la bacteria adquiere una forma esférica; después de periodos largos de cultivo, tanto en medio líquido como sólido, la morfología cocoide es predominante sobre las formas espiriladas. Estas formas cocoides son metabólicamente activas, pero no pueden ser cultivadas *in vitro* (Dunn *et al*, 1997; O'Rourke & Bode, 2001).

Formas cocoides

Se ha sugerido que la transición de la forma espirilada común de *H. pylori* a una morfología cocoide, se debe principalmente a condiciones ambientales de estrés por las que pasa este microorganismo, como la exposición a oxígeno, pH alcalino, altas temperaturas, estrés nutricional, cultivos prolongados y tratamientos con antibióticos (Chen, 2004).

El rol de la forma cocoide de *H. pylori* ha sido tema de discusión entre varios autores. Algunos la consideran una forma degenerativa o una manifestación de muerte celular de la bacteria, mientras que otros la consideran una forma en estado latente pero viable. Se han evaluado numerosos métodos para determinar, de forma directa e indirecta, la viabilidad de esta forma (Kusters *et al*, 1997; Chen, 2004; Wang & Wang, 2004).

A pesar de que las formas cocoides de *H. pylori* son viables, se ha determinado que no pueden jugar un importante papel en la transmisión de la infección mediante su supervivencia en el agua o en el ambiente, ya que estas formas sólo pueden sobrevivir por un periodo corto de tiempo fuera de su nicho (como lo es el estómago del humano o de otros seres vivos donde ha sido aislado). Es por ello que sigue prevaleciendo la idea de que las formas espiriladas, en alta concentración, tienen una mayor incidencia en el contagio que las formas cocoides no cultivables (Chen, 2004).

GÉNETICA

Existe amplia evidencia de que el genotipo de la bacteria es un factor importante en la naturaleza de la infección. La secuenciación del genoma de la cepa *H. pylori* 26695 ha proveído información acerca de su biología, la cual fue ampliada con la publicación de la secuencia del genoma de la cepa *H. pylori* J99, lo que aumentó el conocimiento sobre la diversidad de esta bacteria (Marais *et al*, 1999).

Genoma

Los genomas de *H. pylori* 26695 y J99 fueron secuenciados a partir de los cromosomas circulares conteniendo 1 667867 y 1 643831 pb, respectivamente. El contenido promedio G+C es de un 39% del total del genoma en ambas cepas, aunque para la cepa 26695, cinco regiones tienen una composición distinta (en la cepa J99 son nueve regiones). La región 2 de la cepa 26695 corresponde a la isla de patogenicidad Cag, asociada a la producción del antígeno CagA (Marais *et al*, 1999; Alm & Noonan, 2001).

Se han identificado dos elementos de inserción de secuencia (IS) diferentes en las cepas de *H. pylori*, IS605 e IS606, a menudo en múltiples copias y en diferentes puntos de los cromosomas. La cepa J99 carece del elemento IS605, mientras que la cepa 26695 tiene cinco copias, tres de ellas se mantienen en la zona de plasticidad hipervariable. También, para la cepa 26695 se han identificado 1590 marcos de lectura abierta (ORF) que abarcan el 91% del cromosoma, mientras que para la cepa J99 se identificaron 1495 ORF, representando el 90.8% del cromosoma (Alm & Noonan, 2001).

Ambos genomas contienen dos copias de los loci de ARNr 16S y 23S-5S, aunque la cepa 26695 contiene una copia extra del loci 5S. Los loci de ARNr 16S y 23S-5S no son contiguos en ninguna de las dos cepas, contrario a lo observado en la mayoría de microorganismos cuyo genoma ya ha sido secuenciado (Alm & Noonan, 2001).

El hecho de que entre los genes 16S y 23S exista un espacio extremadamente variable, tanto en secuencia como en longitud, provee una herramienta ventajosa para lograr estudios de clonación y secuenciación, por lo que la secuencia de esta región hipervariable es útil para la discriminación sensible de unidades taxonómicas. En *H. pylori*, las secuencias 16S son físicamente removidas y posicionadas en otros puntos del genoma, lo que genera un operón ARNr de estructura atípica; esta situación dificulta el estudio de esta región ribosomal debido a que es poco conservada y genera una alta variabilidad genética. A pesar de ello, cerca de esta región altamente variable se encuentra una pequeña secuencia conservada que se puede utilizar para la detección de *H. pylori* (García-Martínez *et al*, 1999; Shahamat *et al*, 2004).

Intercambio Genético

H. pylori exhibe una diversidad genética apreciable, característica que ya ha sido evidenciada en muchos trabajos donde se demuestra la variación en el orden genético entre cepas, diferencias en el contenido genético entre cepas, la naturaleza de algunos genes, y la diversidad de secuencias dentro de algunos genes conservados. Esta bacteria posee una estructura poblacional recombinante, o panmítica, lo que indica el intercambio genético frecuente entre cepas.

También, existe evidencia de que la recombinación en *H. pylori* puede ocurrir *in vivo* durante la infección. Se sugiere que el intercambio genético horizontal en *H. pylori* ocurre mediante los tres mecanismos clásicos: transformación natural, conjugación y transducción. Sin embargo, algunas barreras, como el ambiente gástrico, el aislamiento genético y la presencia de endonucleasas en la bacteria limitan el estudio sobre la variabilidad genética en esta bacteria (Akopyanz *et al*, 1992; Taylor *et al*, 1992; Atherton *et al*, 1995; Go *et al*, 1996; Suerbaum *et al*, 1998; van Doorn *et al*, 1998; Israel, 2001).

Replicación, Transcripción y Traducción

H. pylori contiene sólo cinco genes identificables, *dnaE*, *dnaN*, *dnaQ*, *dnaX* y *hoIB*, que codifican subunidades centrales de la ADN polimerasa III, lo que es consistente con la complejidad observada en muchos otros microorganismos secuenciados a la fecha (Alm & Noonan, 2001).

Los procesos de transcripción y traducción en *H. pylori* aparecen acarrear muchas similitudes con los de otras bacterias gramnegativas. Una diferencia significativa es la fusión de los genes *rpoB* y *rpoC* que codifican las subunidades β y β' de la ARN polimerasa, y es evidente en ambos genomas de *H. pylori*. También se ha encontrado que los sistemas de dos componentes son un mecanismo altamente conservado para el control bacteriano de la expresión génica, a menudo en respuesta al estímulo externo. Ambas cepas de *H. pylori* poseen 36 genes ARNt, así como todas las ARNt sintetizadas esperadas excepto las ARNt glutaminil y aspariginil sintetizadas (Alm & Noonan, 2001).

Regulación Génica

Se han encontrado cuatro proteínas en *H. pylori* que se han clasificado como proteínas de unión a ADN, o más específicamente, factores de transcripción. Estas proteínas comprenden la HspR, SecA (un componente de la maquinaria general de secreción) y dos proteínas no identificadas. Además, *H. pylori* carece de muchas proteínas reguladoras típicas encontradas en otras bacterias gramnegativas, como OxyR, Crp, y FNR, que están relacionadas con la regulación de la expresión génica en respuesta al estrés oxidativo, consumo de carbono, y condiciones anaeróbicas, respectivamente (De Vries *et al*, 2001).

Como otros microorganismos, *H. pylori* se adapta a los cambios ambientales mediante la regulación de su expresión génica que permitan la colonización exitosa y persistente en el estómago. La ausencia de algunos componentes de sistemas de regulación importantes sugieren o que la regulación está solamente presente de forma rudimentaria o que el mecanismo de regulación génica trabaja de manera diferente en *H. pylori* y que genes todavía no identificados juegan un papel en una red alternativa de regulación (De Vries *et al*, 2001).

Mutagénesis

H. pylori se ha adaptado para sobrevivir dentro del estómago humano, dentro del cual están presentes agentes tóxicos producto del metabolismo propio de la bacteria, de la respuesta inflamatoria del huésped y de otras defensas del mismo.

El análisis genómico sugiere que ciertos sistemas de reparación de ADN están ausentes en esta especie. Se piensa que la acumulación persistente de mutaciones dentro del genoma genera una contribución importante a la extraordinaria diversidad genética de *H. pylori*, lo que permite su adaptación a nuevos ambientes dentro del estómago (Labigne & Jenks, 2001).

En *H. pylori*, estimaciones de la frecuencia de mutaciones se han basado en la aparición de mutantes resistentes después de pasajes en cultivos con altas concentraciones de antibióticos, y se ha sugerido que la tasa de mutación *in vitro* es similar a la dada en otras bacterias. Asimismo, dentro del estómago, la adquisición de resistencia a antibióticos parece ocurrir predominantemente vía mutaciones más que por la adquisición de ADN extrínseco o por la presencia de genes que codifican enzimas modificantes de antibióticos (Labigne & Jenks, 2001).

La Isla de Patogenicidad *cag*

Las islas de patogenicidad (PAI) son reconocibles por su inusual contenido de G+C, lo que sugiere un origen de fuentes foráneas. Otras características son su inestabilidad, su integración a loci específicos, y la presencia de repeticiones directas en las regiones flanqueables (Stein *et al*, 2001).

La Isla PAI de *H. pylori* fue originalmente llamada *cag* (gen asociado a citotoxina) debido a que se pensó que estaba asociado a la expresión de la toxina vacuolizante (VacA). Sin embargo se demostró posteriormente que ambos factores, VacA y PAI, son independientes entre sí. Es interesante destacar que en biopsias de pacientes con severos padecimientos gástricos se detectó la presencia del gen *cagA* en más del 90 % de los casos, estableciendo una correlación directa de la presencia del gen *cagA* con la enfermedad (Stein *et al*, 2001).

La Isla PAI se divide en dos subtipos, *cagl* y *cagII*, donde las cepas tipo I son más virulentas que las cepas tipo II. Esta diferencia se debe al mayor número de elementos de inserción presentes en las cepas tipo II. También, la inestabilidad de la región *cag* se puede dar debido a deleciones o inversiones, y en algunos casos se puede perder por completo debido a la transferencia de ADN de un “sitio vacío” de una cepa deficiente de *cag* a una cepa tipo I, seguida de una recombinación homóloga (Stein *et al*, 2001).

Se han sugerido 34 marcos de lectura abierta (ORF) dentro de la región *cag*. Uno de ellos codifica el antígeno inmunodominante CagA, el cual está localizado en el extremo 3' de la isla. CagA se identificó como la primera proteína de la región PAI y parece ser el factor de mayor virulencia. El tamaño molecular de *cagA* es variable, y a nivel proteico puede traducir a una proteína de 128 kDa que induce cambios en el crecimiento de las células epiteliales humanas del estómago (Stein *et al*, 2001).

Ureasa

La metaloenzima ureasa es producida por numerosas especies bacterianas, y ha demostrado ser un potente factor de virulencia en algunas de ellas, incluida *H. pylori*. La ureasa es central en el metabolismo y virulencia de *H. pylori*, es necesaria para su colonización en la mucosa gástrica y es un potente inmunógeno que induce una vigorosa respuesta inmune. La enzima es usada para la identificación taxonómica, así como para el diagnóstico y seguimiento postratamiento de la infección (Moblely, 2001).

Los genes que codifican para la ureasa de *H. pylori* se encuentran contiguos y se transcriben en la misma dirección. Los siete genes son necesarios para sintetizar una enzima activa. Los genes se han designado *ureAB1EFGH*; excepto el *ure1*, todos los genes comparten homología con otros genes de ureasa de otras bacterias (Moblely, 2001).

La expresión de los genes *ureA* y *ureB* es suficiente para el ensamblaje de una apoenzima. La expresión de los demás genes accesorios permite la síntesis de una ureasa catalíticamente activa (Moblely, 2001).

Fosfoglucosamin Mutasa

La ureasa es uno de los factores de virulencia identificados en *H. pylori* y que se encuentra en todas las cepas de esta bacteria. Anterior a los genes estructurales *ureA* y *ureB* se encuentra una región de ADN para la producción de ureasa. Esta región presenta dos marcos de lectura abierta (ORF) designados *ureC* y *ureD*. La región *ureC* (1335 pb) se encuentra a 850 pb del codón inicial del gen *ureA*, y se transcribe en la misma dirección (De Reuse *et al*, 1997).

De Reuse *et al* (1997) encontró la existencia de una vía similar a la descrita en *E. coli* para la síntesis de peptidoglucano y lipopolisacárido de la pared celular, relacionada con la formación de la enzima fosfoglucosamin mutasa codificada por la región *ureC*, convirtiéndose éste en un gen esencial para *H. pylori*, y el cual ha sido objetivo para la detección específica de esta bacteria.

Citotoxina Vacuolizante

Todas las cepas de *H. pylori* contienen una copia del gen de la toxina *vacA*. El transcripto *vacA* es monocistrónico, e induce a la formación de vacuolas en las células epiteliales del estómago, así como otros efectos tóxicos en las mismas. Existe una considerable diversidad genética entre los alelos *vacA* en diferentes cepas, la forma más estudiada es el tipo *s1/m1*, la cual se ha asociado con el desarrollo de proteínas VacA de un alto nivel de actividad citotóxica (Atherthon *et al*, 2001).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

La infección por *H. pylori* es ubicua y se presenta tanto en hombres como mujeres. En general la prevalencia total de la infección en países desarrollados es menor que la misma en países en vías de desarrollo, y se ha atribuido esta diferencia a la tasa de adquisición de *H. pylori* en la niñez, la cual, una vez dentro de la mucosa gástrica, la bacteria persiste durante el periodo de vida del individuo. Sin embargo, en países desarrollados la disminución del nivel de infección se ha dado gracias al mejoramiento gradual en los cuidados médicos, en las condiciones sanitarias y/o en el estilo de vida (Megraud *et al*, 1989; Replogle *et al*, 1996; Mitchell, 2001).

Se han realizado numerosos estudios para determinar la fuente de infección de *H. pylori*.

Se ha observado que la bacteria es capaz de colonizar experimentalmente el estómago de los cerdos, aunque su identificación mediante técnicas serológicas y de cultivo ha sido inefectiva. Otro estudio reportó la asociación entre la prevalencia de la infección en pastores de ovejas y el contacto con ovejas y perros pastores (Engstrand *et al*, 1990; Mitchell, 2001).

Otra investigación sugería la posible transmisión de la infección por medio de la mosca doméstica. Sin embargo, esta idea fue refutada ya que la bacteria no pudo ser aislada, lo que concluyó que la mosca no es un reservorio o un vector de transmisión de *H. pylori* (Osato *et al*, 1998).

RUTAS DE TRANSMISIÓN

Aunque *H. pylori* está presente en el estómago de aproximadamente la mitad de la población mundial, no se conoce con certeza su modo predominante de transmisión.

El contacto persona-persona es la ruta más probable de transmisión, y se han descrito tres posibles rutas de transmisión desde el estómago de una persona hacia el de otra.

La vía iatrogénica es una posible ruta de transmisión, cuando tubos o endoscopios han estado en contacto con la mucosa gástrica de un individuo, para luego ser utilizados en otro. Sin embargo, esta ruta se considera marginal en términos cuantitativos. La segunda vía de transmisión es la fecal-oral, principalmente por el agua contaminada con heces, ya sea utilizada para el consumo o para la preparación de alimentos, sobre todo en países en vías de desarrollo.

Finalmente, se ha reportado sobre una tercera ruta que es oral-oral. *H. pylori* ha sido aislada de la cavidad oral, principalmente de la placa dental y saliva. También se ha sugerido la posible transmisión de la bacteria por contacto íntimo entre esposos y niños con individuos infectados (Van Duynhoven & de Jonge, 2001).

A pesar de los estudios en este campo, aún no ha sido establecida realmente la vía predominante de acuerdo a la cantidad de personas infectadas.

El agua como reservorio de *H. pylori*

Uno de los primeros trabajos en sugerir que el agua de consumo podría ser una fuente de infección de *H. pylori* se dio en Perú, donde se encontró que para los niños peruanos, cuyos hogares poseían un abastecimiento de agua externo, era tres veces más probable que fueran infectados con *H. pylori* que los niños cuyos hogares tenían un abastecimiento de agua interno. También, en Colombia, se ha asociado la infección de *H. pylori* en niños que han ido a nadar, más de una vez al año, en ríos, riachuelos o piscinas. En contraste con estos estudios, investigaciones hechas en China, Corea y Bangladesh no encontraron relación entre la infección de *H. pylori* con alguna fuente natural de agua (Klein et al, 1991; Clemens et al, 1996; Goodman et al, 1996; Malaty et al, 1996; Mitchell, 2001).

Se ha reportado la presencia de ADN específico de *H. pylori* en fuentes de agua como pozos, manantiales, ríos y lagunas, así como en fuentes municipales y de agua residual, en Japón y Suecia; es importante destacar que la detección de ADN de *H. pylori* no indica la presencia de células viables o de otras especies de *Helicobacter spp* (Hulten et al, 1996; Hulten et al, 1998; Sasaki et al, 1999; Mitchell, 2001).

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN

En el presente, no hay una prueba confiable absoluta para la detección de la infección de *H. pylori*, y si la prueba es factible, se requieren al menos dos para confirmar la infección (Kogfelt *et al*, 2005).

Cultivo

Para el crecimiento de *H. pylori* usualmente se usan jarras con kits generadores de gas o empleando una atmósfera microaeróbica estándar, en incubadoras de CO₂ o en cámaras anaeróbicas con atmósfera modificada. Muchos estudios han demostrado que para el crecimiento óptimo de *H. pylori* se requiere de 2 a 5 % de O₂, de 5 a 10 % de CO₂ y de 0 a 10 % de H₂ (Nichols *et al*, 1991; Andersen & Esperson, 1992; Andersen & Wadström, 2001).

H. pylori puede crecer en diferentes medios sólidos suplementados con sangre. En muchos estudios se ha empleado el agar Brucella o el agar Columbia como agar base. El uso de sangre de caballo, oveja o carnero, incrementa el rendimiento del crecimiento de la bacteria, y se ha estudiado en concentraciones entre 5 y 10 %, siendo una concentración al 5 % el más utilizado. Otro medio descrito, sin emplear sangre, para el crecimiento de *H. pylori* es el agar con emulsión de yema de huevo. El uso de antibióticos no aumenta significativamente el crecimiento de *H. pylori*; tampoco se recomienda el uso de medio líquido debido a que induce a la formación de formas cocoides, asimismo se presenta el riesgo de crecimiento de microorganismos contaminantes como levaduras o estafilococos (Westblom *et al*, 1991; Andersen & Wadström, 2001, Degnan *et al*, 2003).

En cultivos sólidos, las colonias de *H. pylori* son pequeñas. Dependiendo del tipo de medio empleado, se observan como colonias translúcidas, amarillentas o grisáceas. Después de 3 a 5 días de incubación, la bacteria adquiere una forma en "U"; en cultivos prolongados las bacterias aparecen como formas cocoides difícilmente distinguibles mediante la tinción de Gram (Andersen & Wadström, 2001).

Para solventar los problemas de identificación mediante la tinción de Gram, se ha recurrido al uso de fucsina fenicada para lograr visualizar la bacteria en el microscopio (Shan *et al*, 1996; Figura *et al*, 1998; Al-Marhoon *et al*, 2005).

Estudios *In Situ*

El uso de varios tipos de tinción: Giemsa, con azul de toluidina y la inmunotinción han permitido la detección de *H. pylori*. La técnica FISH también se ha utilizado para la detección de la bacteria en biopsias, así como para la determinación de la resistencia a claritromicina. También el uso de oligonucleótidos específicos para Cag, empleando la técnica de hibridización *in situ*, ha permitido la identificación de cepas *cagA* positivas en biopsias obtenidas de diferentes áreas del estómago (Kogfelt *et al*, 2005). Es importante aclarar que estas técnicas en biopsias no son altamente específicas y que pueden detectar otras especies de *Helicobacter* spp.

Prueba de Ureasa y Prueba de Aliento

La prueba de Ureasa es una de las más rápidas, y se ha llegado a desarrollar utilizando un anticuerpo monoclonal contra la ureasa de *H. pylori*, incrementando tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba.

Asimismo, la prueba de aliento ha sido reconocida como una excelente prueba no invasiva, aunque también se corre el riesgo de falsos positivos por la posible presencia de bacterias ureasa positivas en la cavidad oral (Kogfelt *et al*, 2005).

En los últimos años también se han desarrollado nuevas pruebas serológicas y pruebas con antígenos, con una alta sensibilidad para la detección de *H. pylori* en biopsias gástricas. Sin embargo, la dificultad y la generación de posibles falsos positivos ha hecho que se recurran a los métodos moleculares, de mayor especificidad, para la determinación no sólo de la presencia de la bacteria, sino también para el análisis de los factores genéticos relacionados a la infección y colonización en el estómago.

DETECCIÓN DE H. pylori MEDIANTE PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de uso biotecnológico que tiene como fin el amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica de ADN, para reproducir una cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación.

Dada la gran especificidad y sensibilidad de esta técnica, se ha abierto una nueva etapa de diagnóstico, denominado diagnóstico molecular, de gran utilidad en los microorganismos de difícil cultivo como es el caso del *H. pylori*. El diagnóstico por PCR de *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad del 95 % y su principal ventaja es que se puede detectar el microorganismo sin importar la viabilidad de la bacteria en las muestras (Premoli *et al*, 2004).

En los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria por medio de PCR basándose en:

- Oligonucleótidos provenientes del gen de la ureasa (*ureA*).
- Oligonucleótidos provenientes de los genes que codifican el 16s ARN ribosomal (ARNr 16S).
- Oligonucleótidos provenientes de la Isla de Patogenicidad Cag (*cagA*).
- Oligonucleótidos provenientes de secuencias al azar.
- Oligonucleótidos provenientes del gen de la fosfoglucoamin mutasa (*glmM*).
- Oligonucleótidos que determinan variantes alélicas del gen *vacA*.

Técnicas de PCR basadas en Secuencias Arbitrarias

Mediante la técnica REP-PCR se identificaron secuencias palindrómicas extragénicas en el genoma de *H. pylori*. Esta técnica fue utilizada para generar “huellas” de ADN específicas de cepas de *H. pylori*, aunque por sí sola no pudo demostrar la presencia de ciertos determinantes de virulencia. También la REP-PCR ha sido utilizada para caracterizar colonias aisladas del antro, cuerpo y duodeno de pacientes con cáncer gástrico (Kwon *et al*, 1998; Miehke *et al*, 1999; Owen *et al*, 2001).

Las técnicas RAPD y AP-PCR han proveído un alto grado de discriminación entre varios aislamientos clínicos de *H. pylori*. Principalmente la técnica RAPD ha permitido el estudio de poblaciones de *H. pylori* provenientes de biopsias antrales de pacientes individuales (Akopyantz *et al*, 1992; Taylor *et al*, 1995; Owen *et al*, 2001).

El análisis AFLP ha sido modificado para la caracterización de aislamientos de *H. pylori*, ofreciendo las ventajas de velocidad, reproducibilidad y capacidad de análisis de segmentos de ADN distribuidos en todo el genoma de la bacteria (Gibson *et al*, 1998; Owen *et al*, 2001).

Estas técnicas, a pesar de su utilidad, tienen la desventaja de producir perfiles complejos de interpretar, por ende, dificultan el análisis de variantes genotípicas entre aislamientos de la bacteria.

Genotipado basado en Loci Específicos mediante PCR

El gen asociado a citotoxina (*cagA*) está presente en aproximadamente el 50-70 % de las cepas de *H. pylori* y es considerado un marcador de la presencia de la Isla Genómica de Patogenicidad (*cag* PAI). Muchas de las cepas *cagA*⁺ tienen contigua la región *cag* PAI y el orden génico es relativamente bien conservado. Es posible que en un mismo paciente se encuentren cepas *cagA*⁺ y *cagA*⁻. La región *cagA* puede ser detectada por PCR, pero debido a su heterogeneidad en la secuencia, la eficacia de los imprimadores debe ser evaluada en diferentes poblaciones. Asimismo, la presencia de un “sitio vacío” (que indica ausencia de la región *cag* PAI), también puede ser detectada por PCR, permitiendo la identificación de cepas *cagA* negativo o inclusive discriminar cepas *cag* tipo II de las cepas tipo I (Covacci *et al*, 1993; Tummuru *et al*, 1993; Cover *et al*, 1995; Censini *et al*, 1996; Owen *et al*, 2001; Tomasini *et al*, 2003).

La región *vacA* codifica para una toxina secretada por *H. pylori*, causando vacuolas en las células epiteliales. Está presente en todas las cepas de *H. pylori*, se divide en dos subregiones cuya secuencia presenta una particular heterogeneidad (figura 2). La región *s* (que codifica para el péptido señal) se encuentra en el extremo 5', y se pueden distinguir dos tipos, *s1* y *s2*; a la vez, para *s1* se presentan tres subtipos: *s1a*, *s1b* y *s1c*. Dentro de la región *m* (región media) se distinguen los tipos *m1* y *m2*; para *m2* se reconocen dos subtipos, *m2a* y *m2b*.

Los genotipos *vacA* se pueden detectar mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las regiones que conforman este gen (Atherton *et al*, 1995; Gunn *et al*, 1998; van Doorn *et al*, 1998; Atherton *et al*, 1999; Owen *et al*, 2001).

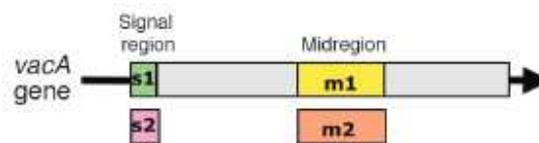


Figura 2. Polimorfismo del gen *vacA*.
Fuente: Blazer & Atherton, 2005

Otros loci específicos de *H. pylori* que permiten su detección e identificación son las regiones *flaA* y *flaB* (flagelinas), *iceA* (proteína inducida al contacto con el epitelio), *babA* (asociada a antígenos del grupo sanguíneo), y los genes que componen el operón que codifica para la ureasa, además de *ureA*. Para todos estos loci se han evaluado oligonucleótidos específicos que han demostrado que la técnica de PCR es muy valiosa para la caracterización de *H. pylori*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la detección molecular de *H. pylori*, mediante la técnica de PCR para la valoración de cepas provenientes de diversas fuentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el Kit Comercial Wizard® (PROMEGA) de Purificación de ADN para la extracción de ADN de *H. pylori*.
2. Estandarizar los protocolos de PCR para distintos oligonucleótidos que permiten la detección de las regiones ARNr 16S, *glmM*, *ureA*, *cagA* y *vacA*, para la identificación y caracterización de cepas de *H. pylori*.
3. Valorar los protocolos optimizados para la determinación, mediante PCR, de la presencia de *H. pylori* aislada de distintas procedencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo y mantenimiento de las muestras bacterianas se realizó en el Área de Microbiología del Centro de Investigación CEQIATEC. La extracción de ácidos nucleicos, así como la optimización y valoración de los protocolos de PCR para *H. pylori* se desarrollaron en el Laboratorio de Biología Molecular del CIB (ITCR) y en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología (UCR).

MUESTRAS

Para este trabajo se empleó un total de 27 muestras, de las cuales 6 muestras corresponden a controles y 21 muestras son aislamientos de diversas fuentes. Las muestras control fueron las siguientes:

- Dos cepas de *H. pylori* de la colección ATCC (American Type Culture Collection, Estados Unidos): ATCC 51932 y ATCC 700392.
- Dos muestras de ADN de cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas, identificadas como 12455 y y99 (Lab. Bacteriología Médica, UCR).
- Un cultivo de *Escherichia coli* de 48 horas (usada como control negativo).
- Un cultivo de *Salmonella typhi* de 48 horas (usada como control negativo).

Las otras 21 muestras fueron proveídas por el Laboratorio CEQIATEC entre diciembre del 2006 y junio del 2007, y corresponden a aislamientos ambientales realizados a partir de fuentes de agua de consumo de Cartago y San José. La identificación de las mismas fue la siguiente:

- | | | |
|------------|------------|----------|
| a) 20 | h) 07-07 | ñ) 18-07 |
| b) 01-07 | i) 08-07 | o) 19-07 |
| c) 02-07 | j) 10-07 | p) 21-07 |
| d) 03-07 | k) 12.1-07 | q) 25-07 |
| f) 04.1-07 | l) 14.1-07 | r) 28-07 |
| g) 04.2-07 | m) 15-07 | s) 29-07 |
| h) 06-07 | n) 16-07 | t) 30-07 |

Las muestras corresponden a cepas purificadas en medio sólido, de las cuales se recuperaron algunas colonias que fueron utilizadas para la extracción de ADN. La muestra código 20 correspondió a una muestra procesada en medio líquido; de ella se tomó un volumen de 1.5 ml, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 13200 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se recuperó el "pellet bacteriano".

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN de las muestras fue realizada entre diciembre del 2006 y junio del 2007, en el Laboratorio de Biología Molecular del CIB (ITCR).

Preparación inicial de las muestras

En cámara de flujo laminar las colonias bacterianas tomadas de cada cultivo se resuspendieron en 200 µl de buffer TE 1X en tubos eppendorf de 1.5 ml.

Método de extracción

Se empleó el Kit Comercial para Purificación de ADN Genómico Wizard® (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA).

Este método está basado en un proceso de cuatro pasos: lisis celular, digestión con ARNasa, precipitación salina de las proteínas celulares y finalmente la concentración y precipitación del ADN genómico mediante la adición de isopropanol. Este método permite obtener una concentración final entre 20 y 100 µg/ml de ADN genómico para *E. coli* y *Enterobacter cloacae* (Millar *et al*, 1988; Promega Corporation, 2005).

La extracción de ADN se hizo según instrucciones recomendadas de la casa fabricante del kit para bacterias gramnegativas. Éste se describe a continuación:

1. Las suspensiones bacterianas en buffer TE 1X se centrifugaron a 13200 rpm para obtener un “pellet” de células. Se removió el sobrenadante, dejando el “pellet” en el tubo eppendorf.
2. Se adicionaron 600 µl de la Solución de Lisis Nuclear. Se pipeteó levemente hasta que las células fueron resuspendidas. Se agitó en vórtex para completar la resuspensión.
3. Se incubó a 80° C en baño María por 5 minutos para lisar las células; luego se enfrió a temperatura ambiente.
4. Se adicionaron 3 µl de la Solución de ARNasa al lisado celular. Se invirtieron los tubos 2-5 veces para mezclar.
5. Se incubó a 37° C en baño María durante 60 minutos. Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente.
6. Se adicionaron 200 µl de la Solución de Precipitación de Proteínas a cada lisado tratado con ARNasa. Se mezcló en vórtex vigorosamente a máxima velocidad durante 20 segundos para mezclar la Solución de Precipitación con el lisado celular.
7. Se incubaron las muestras en hielo por 5 minutos.
8. Se centrifugaron a 13200 rpm por 3 minutos.
9. Se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de 1.5 ml por muestra, cada tubo contenía 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
10. Se mezcló ligeramente por inversión cada tubo hasta observar “hebras” del ADN; se siguió mezclando hasta que se formara una masa visible.
11. Las muestras se centrifugaron a 13200 rpm por 2 minutos.

12. Con cuidado se removió completamente el sobrenadante, dejando el "pellet" de ADN. Se adicionaron 600 μ l de etanol 70 % (temperatura ambiente) y ligeramente se invirtieron los tubos varias veces para lavar el "pellet" de ADN.
13. Se centrifugó a 13200 rpm por 2 minutos. Se removió completamente el etanol.
14. Se dejó secar el "pellet" de ADN de cada muestra al aire (en cámara de flujo laminar) durante 15 minutos.
15. El "pellet" de ADN se resuspendió en 100 μ l la Solución de Rehidratación de ADN (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) y luego se incubaron las muestras a 65° C durante 1 hora en baño María, mezclando las muestras por inversión de los tubos de forma periódica.
16. Finalmente las muestras de ADN se conservaron a -15 °C.

Valoración del ADN extraído por Electroforesis en Gel de Agarosa

Se determinó la presencia de ADN genómico inicial para cada extracción por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (m/v), teñido con bromuro de etidio, después de una electroforesis realizada durante una hora a 75 voltios. De cada muestra se tomaron 5 μ l y se mezcló con 1 μ l de Buffer de Carga 6X. Se utilizó el Marcador de Tamaño Molecular FastRuler Low-Range (Fermentas SM1103).

Estimación de la concentración de ADN

Para estimar la concentración de ADN para cada muestra se utilizó el método espectrofotométrico basado en la absorbancia de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó como blanco buffer TE 1X. Se tomaron de cada muestra 5 μ l y se diluyeron en 995 μ l de buffer TE 1X, obteniendo un factor de dilución de 5/1000.

La lectura de absorbancia se hizo a 260 nm. También se calculó la relación Abs_{260}/Abs_{280} para valorar la pureza de los ácidos nucleicos. Se calculó la concentración de ADN por:

$$\text{Conc ADN}_{\text{muestra}} \text{ (ng/}\mu\text{l)} = \text{Abs}_{\text{muestra}} \times (50 \text{ ng/}\mu\text{l}) \times (1000/5)$$

Para las muestras 20, 12455 y y99 no se hizo la estimación de su concentración de ADN.

EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR

Oligonucleótidos

Para este trabajo se emplearon nueve parejas de oligonucleótidos para la detección y caracterización de las muestras. En los cuadros 1 y 2 se detalla la información para cada pareja de iniciadores.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Biotecnología (ITCR) y en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología (UCR). Para cada protocolo de PCR se realizó la evaluación preliminar del mismo y de la pareja de oligonucleótidos empleada, para luego utilizarlo en la evaluación de las muestras bacterianas aisladas de diversas fuentes.

Cuadro 1.
Secuencias nucleotídicas para *H. pylori* utilizadas para su detección por medio de la técnica de PCR

Región a amplificar	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencias de los iniciadores 5' – 3'	Referencia
ARNr 16S	992-1500	GGCGTTATCAACAGAATGGC CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC	Shahamat <i>et al</i> (2004)
<i>ureA</i>	411	GCCAATGGTAAATTAGTT CTCCTTAATTGTTTTAC	Clayton <i>et al</i> (1992)
<i>glmM</i>	294	AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC	Lage <i>et al</i> (1995)
<i>cagA</i>	128	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA AGAAACAAAAGCAATACGATCATT	Tomasini <i>et al</i> (2003)

Cuadro 2.
Secuencias nucleotídicas empleadas para la amplificación de las variantes alélicas de la región *vacA* de *H. pylori* por PCR

Región a amplificar	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencias de los iniciadores 5' – 3'	Referencia
<i>vacA s1a</i>	190	GTCAGCATCACACCGCAAC CTGCTGGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA s1b</i>	187	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTGGAATGCGCCAAAC	Atherton <i>et al</i> (1995); Lu <i>et al</i> (2002)
<i>vacA s2</i>	199	GCTAACACGGGAAATGATCC CTGCTGGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA m1</i>	290	GGTCAAAATGCGGTCATGG CCATTGGTACCTGTAGAAAC	
<i>vacA m2</i>	352	GGAGCCCCAGGAAACATTG CATACTAGCGCCTTGCAC	

glmM (Fosfoglucosamin Mutasa)

Se evaluó el método descrito por Lage *et al* (1995), también empleado por Lu *et al* (1999) y Smith *et al* (2004), con las siguientes modificaciones:

Para un volumen de reacción de 50 μ l, se adicionaron los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.4 μ M, cada uno); y *Taq* polimerasa (0.05 U/ μ l). Se emplearon 10 μ l de muestra de ADN.

En el cuadro 3 se describe el perfil térmico empleado para la amplificación de la región *glmM* de *H. pylori*.

Cuadro 3.
Perfil térmico para PCR de región *glmM* de *H. pylori*

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	94	5 min	1
2(1)	Desnaturalización	94	1 min	
2(2)	Apareamiento	55	1 min	35
2(3)	Extensión	72	1 min	
3	Extensión Final	72	5 min	1
4	Almacenamiento	4	Lo necesario	1

De acuerdo a los resultados se evaluaron los siguientes cambios:

- a) Reducción del volumen de reacción a 25 μ l.
- b) Reducción del volumen añadido de ADN de muestra a 5 μ l.

ureA (Ureasa)

Se evaluó el método descrito por Clayton *et al* (1992), también utilizado por Lu *et al* (1999) y Smith *et al* (2004), con las siguientes modificaciones:

Para un volumen de reacción de 50 μ l, se adicionaron los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 μ M, cada uno); y *Taq* polimerasa (0.03 U/ μ l). Se emplearon 2 μ l de muestra de ADN.

En el cuadro 4 se describe el perfil térmico empleado para la amplificación de la región *ureA* de *H. pylori*.

Cuadro 4.
Perfil térmico para PCR de región *ureA* de *H. pylori*

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
2(1)	Desnaturalización	94	1 min	
2(2)	Apareamiento	45	1 min	35
2(3)	Extensión	72	1 min	
3	Extensión Final	72	5 min	1
4	Almacenamiento	4	Lo necesario	1

De acuerdo a los resultados obtenidos, se evaluaron los siguientes cambios:

- a) Aumento en la concentración de *Taq* polimerasa a 0.04 U/ μ l.
- b) Reducción en el volumen de reacción a 25 μ l.
- c) Aumento en el volumen añadido de ADN de muestra a 5 μ l.

ARNr 16S

Para la evaluación de los oligonucleótidos y de las condiciones de reacción, se empleó el método descrito por Shahamat *et al* (2004) con las siguientes modificaciones:

Para un volumen de reacción de 25 μ l, se adicionaron los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (2.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.4 μ M, cada uno); y *Taq* polimerasa (0.04 U/ μ l). Se empleó 1 μ l de muestra de ADN.

En el cuadro 5 se describe el perfil térmico empleado para la amplificación de la región ARNr 16s, específica de *H. pylori*.

Cuadro 5.
Perfil térmico para PCR de región ARNr 16S de *H. pylori*

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	95	2 min	1
2(1)	Desnaturalización	95	30 seg	
2(2)	Apareamiento	60	30 seg	30
2(3)	Extensión	72	1 min	
3	Extensión Final	72	5 min	1
4	Almacenamiento	4	Lo necesario	1

De acuerdo a los resultados obtenidos, se evaluaron los siguientes cambios:

- a) Reducción de la concentración de MgCl₂ a 1.5 mM.
- b) Aumento de la concentración de MgCl₂ a 2.0 mM.

cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)

Se empleó el método descrito por Tomasini *et al* (2003) con las siguientes modificaciones:

Para un volumen de reacción de 50 μ l, se adicionaron los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (2.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 μ M, cada uno); y *Taq* polimerasa (0.03 U/ μ l). Se empleó 2 μ l de muestra de ADN.

En el cuadro 6 se describe el perfil térmico empleado para la amplificación de la región *cagA* de *H. pylori*.

Cuadro 6.
Perfil térmico para PCR de región *cagA* de *H. pylori*

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2(1)	Desnaturalización	94	1 min	
2(2)	Apareamiento	48	45 seg	35
2(3)	Extensión	72	45 seg	
3	Extensión Final	72	5 min	1
4	Almacenamiento	4	Lo necesario	1

De acuerdo a los resultados obtenidos se evaluaron los siguientes cambios:

- a) Reducción del volumen de reacción a 25 μ l.
- b) Reducción del volumen añadido de ADN de muestra a 1 μ l.

***vacA* (Toxina Vacuolizante)**

Para la detección de cada una de las variantes alélicas de la región *vacA*, se utilizó el método de Lu *et al* (2002) con las siguientes modificaciones:

En un volumen de 25 µl se adicionaron los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (2.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 µM, cada uno); y *Taq* polimerasa (0.03 U/µl). Se empleó 1 µl de muestra de ADN.

En el cuadro 7 se describe el perfil térmico empleado para la amplificación de cada una de las variantes alélicas de *vacA* en *H. pylori*. La amplificación de cada variante alélica se diferencia solamente en la temperatura de apareamiento, siendo 55 °C para *s1a*, *s1b* y *s2*, 50 °C para *m1* y 47 °C para *m2*.

Cuadro 7.
Perfil térmico para PCR de polimorfismos *vacA* en *H. pylori*

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	94	2 min	1
2(1)	Desnaturalización	94	45 seg	
		55 (<i>s1a</i>, <i>s1b</i> y <i>s2</i>)		
2(2)	Apareamiento	50 (<i>m1</i>) 47 (<i>m2</i>)	45 seg	35
2(3)	Extensión	72	1 min	
3	Extensión Final	72	7 min	1
4	Almacenamiento	4	Lo necesario	1

De acuerdo a los resultados obtenidos se evaluó el siguiente cambio:

a) Reducción en la concentración de MgCl₂ a 1.5 mM.

Finalmente el protocolo para la amplificación de las variantes alélicas *vacA* utilizó un volumen de 25 µl con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 µM, cada uno); *Taq* polimerasa (0.03 U/µl); y 1 µl de muestra de ADN. Se empleó el perfil térmico descrito en el cuadro 7.

VALORACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES

glmM (Fosfogluocosamin Mutasa)

Para la valoración de las muestras ambientales se empleó un volumen de reacción de 25 µl con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.4 µM, cada uno); *Taq* polimerasa (0.05 U/µl); y 5 µl de muestra de ADN. Se utilizó el perfil térmico descrito en el cuadro 3.

ureA (Ureasa)

Las muestras ambientales fueron valoradas empleando un volumen de reacción de 25 µl, con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 µM, cada uno); *Taq* polimerasa (0.04 U/µl); y 5 µl de muestra de ADN. Se utilizó el perfil térmico descrito en el cuadro 4.

ARNr 16S

Para la valoración de las muestras ambientales se utilizó un volumen de reacción de 25 µl con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); MgCl₂ (2.0 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.4 µM, cada uno); *Taq* polimerasa (0.04 U/µl); y 1 µl de muestra de ADN. Se empleó perfil térmico descrito en el cuadro 5.

cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)

Para la valoración de las muestras ambientales se empleó un volumen de reacción de 25 μ l con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); $MgCl_2$ (2.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 μ M, cada uno); *Taq* polimerasa (0.03 U/ μ l); y 1 μ l de muestra de ADN. El perfil térmico utilizado está descrito en el cuadro 6.

vacA (Toxina Vacuolizante)

El protocolo final para la amplificación de las variantes alélicas *vacA* utilizó un volumen de 25 μ l con los siguientes componentes: Buffer para PCR (1x); $MgCl_2$ (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM); oligonucleótidos (0.5 μ M, cada uno); *Taq* polimerasa (0.03 U/ μ l); y 1 μ l de muestra de ADN. Se empleó el perfil térmico descrito en el cuadro 7.

ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 % (m/v), teñido con bromuro de etidio, después de realizada la electroforesis durante una hora a 100 voltios. Se empleó el Marcador de Tamaño Molecular FastRuler Low-Range (Fermentas SM1103).

RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE ADN

En la figura 3 se visualiza la presencia y pureza de ADN genómico extraído con el Kit Wizard® para las muestras ambientales.

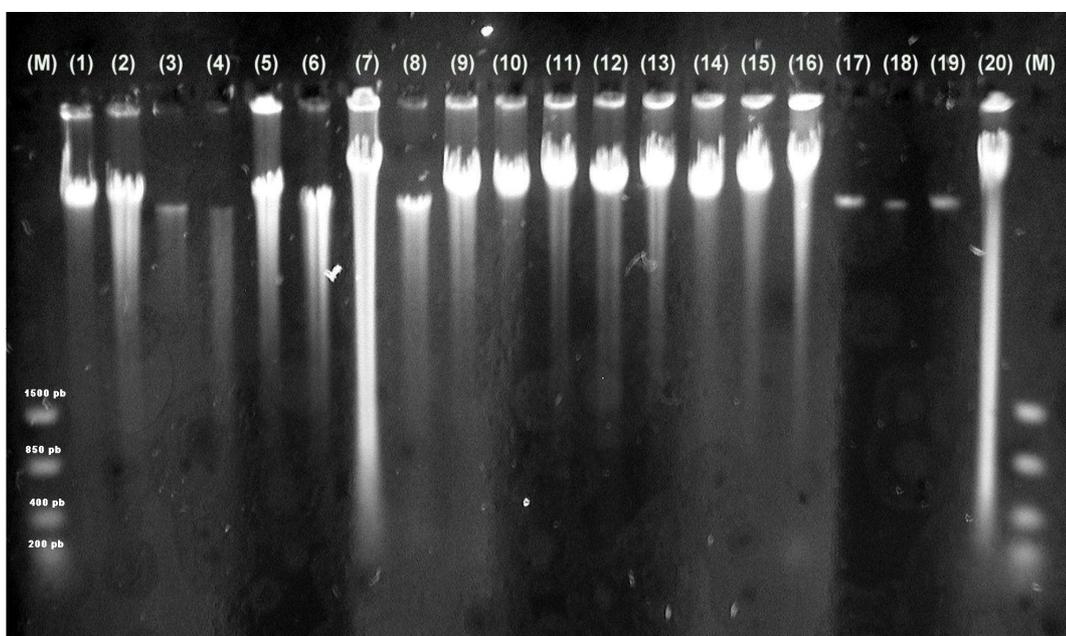


Figura 3. Visualización de ADN genómico para distintas muestras. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) 01-07; (2) 02-07; (3) 03-07; (4) 04.1-07; (5) 04.2-07; (6) 06-07; (7) 07-07; (8) 08-07; (9) 10-07; (10) 12.1-07; (11) 14.1-07; (12) 15-07; (13) 16-07; (14) 18-07; (15) 19-07; (16) 21-07; (17) 25-07; (18) 28-07; (19) 29-07; (20) 30-07. Fuente: CIB (2007).

Asimismo, en el cuadro 8 se detalla la información con respecto a la concentración (ng/μl) de las muestras de ADN genómico visualizadas en el gel de agarosa (figura 3), así como otros datos sobre la pureza de los ácidos nucleicos extraídos.

Cuadro 8.
Concentración (ng/μl) de ADN genómico en distintas muestras

MUESTRA	ABS 260 nm	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	RELACIÓN ABS₂₆₀/ABS₂₈₀
<i>H. pylori</i> 700392	0.007	70.0	1.300
<i>H. pylori</i> 51932	0.080	80.0	1.107
01-07	0.028	280.0	1.546
02-07	0.038	380.0	1.567
03-07	0.174	1740.0	2.029
04.1-07	0.023	230.0	1.708
04.2-07	0.054	540.0	1.570
06-07	0.068	680.0	2.129
07-07	0.028	280.0	1.506
08-07	0.025	250.0	2.069
10.1-07	0.020	200.0	1.573
12.1-07	0.026	260.0	2.041
14-07	0.030	300.0	1.671
15-07	0.021	210.0	1.435
16-07	0.018	180.0	1.483
18-07	0.012	120.0	1.388
19-07	0.040	480.0	1.380
21-07	0.033	330.0	1.641
25-07	0.005	50.0	1.480
28-07	0.016	160.0	2.855
29-07	0.009	90.0	1.162
30-07	0.088	880.0	1.671

Otros datos que se pueden extraer del cuadro 8 son los siguientes:

1. La concentración promedio obtenida para las muestras de ADN de las cepas es de 354.09 ng/μl.
2. La relación promedio (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀) que permite determinar la pureza de los ácidos nucleicos es de 1.65.

EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR

glmM (Fosfoglucoamin Mutasa)

En la figura 4 se muestra la visualización de los productos de PCR para la evaluación preliminar del protocolo para la identificación de la región *glmM* de *H. pylori*.

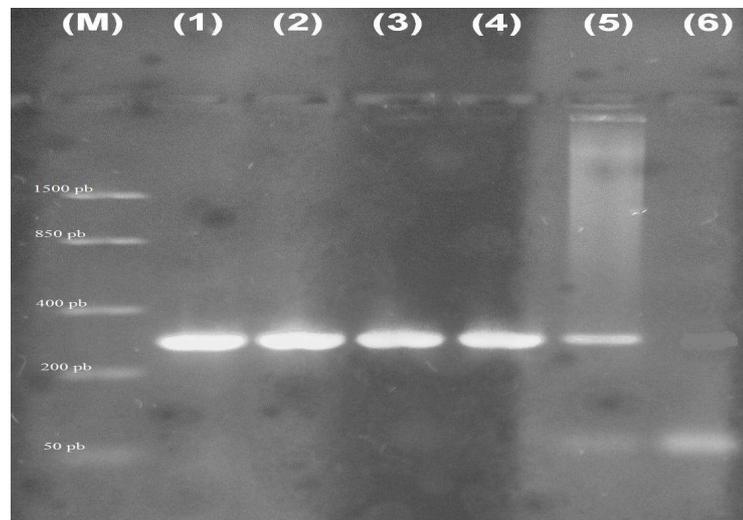


Figura 4. Visualización de productos de PCR para la región *glmM* de *H. pylori* (294 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* 12455; (4) *H. pylori* y99; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua). Fuente: CIB (2007)

Hubo amplificación del producto de tamaño esperado (294 pb) para las cuatro muestras de *H. pylori*. No hubo amplificación para el control negativo (agua).

Luego al protocolo inicial se le hicieron dos modificaciones: se redujo el volumen de reacción a 25 μ l y se emplearon 5 μ l de muestra de ADN. El resultado se presenta en la figura 5.

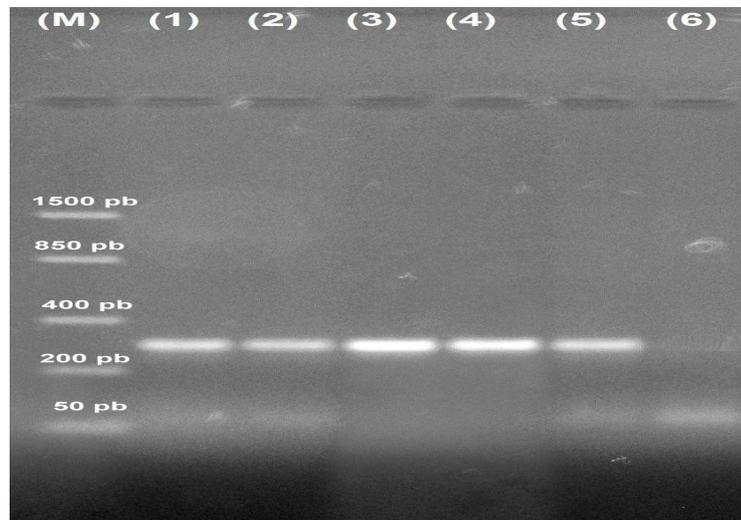


Figura 5. Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región *glmM* de *H. pylori* (294 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* 12455; (4) *H. pylori* y99; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua).

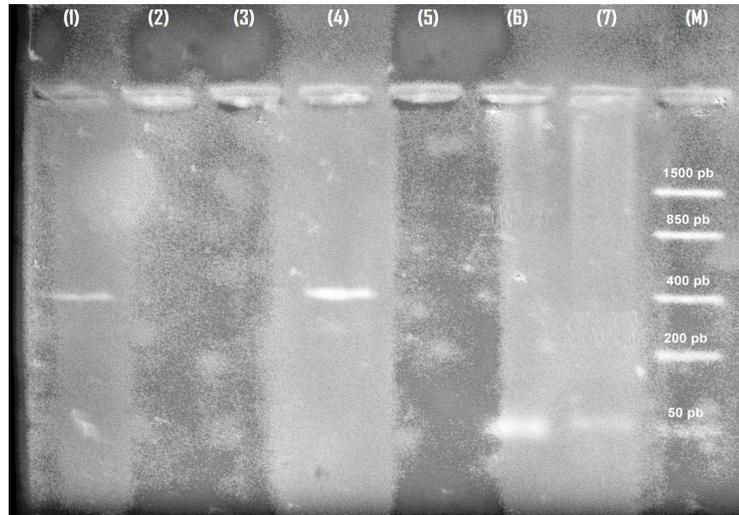
Fuente: CIB (2007)

Según la figura 5, se obtuvo de nuevo la amplificación del producto esperado para las cuatro cepas de *H. pylori*. No se obtuvo ningún producto para el control negativo con agua. No se observó diferencia en cuanto al rendimiento de los productos obtenidos con respecto a la evaluación inicial (figura 4).

ureA (Ureasa)

Se realizó el protocolo preliminar de PCR para detectar la región *ureA* de *H. pylori*. Se analizaron las cepas ATCC y las muestras 12455 y y99. Sin embargo, con el protocolo inicial no se obtuvo ningún producto esperado (411 pb).

En la figura 6 se muestra el resultado obtenido al hacer las tres modificaciones propuestas (de forma simultánea) al protocolo de PCR inicial.



**Figura 6. Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región *ureA* de *H. pylori* (411 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* 12455; (4) *H. pylori* ATCC 51932; (5) *E. coli*; (6) *S. typhi*; (7) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)**

Según la figura 6, con los cambios realizados al protocolo, se obtuvo amplificación para las cepas ATCC de *H. pylori* del producto esperado (411 pb). No se obtuvo una amplificación esperada para las muestras 12455, y99, *E. coli* ni *S. typhi*. Tampoco se obtuvo el producto esperado para el control con agua.

ARNr 16S

En la figura 7 se muestra la visualización de los productos de PCR para la evaluación preliminar del protocolo para la identificación de la región ARNr 16S de *H. pylori*.

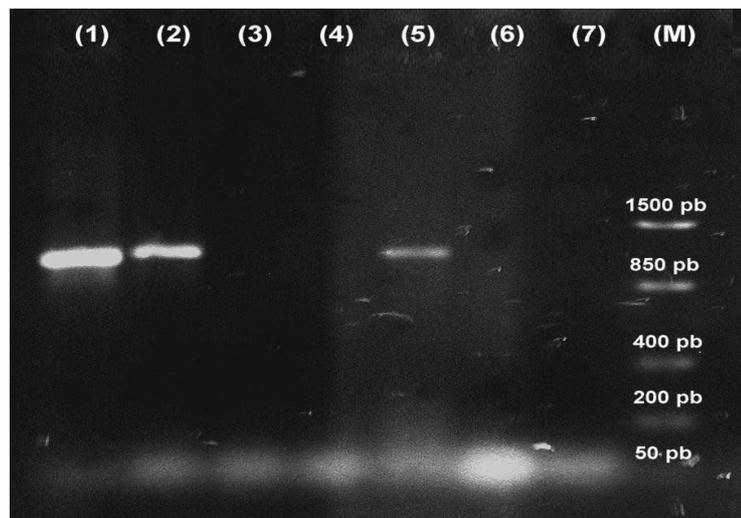
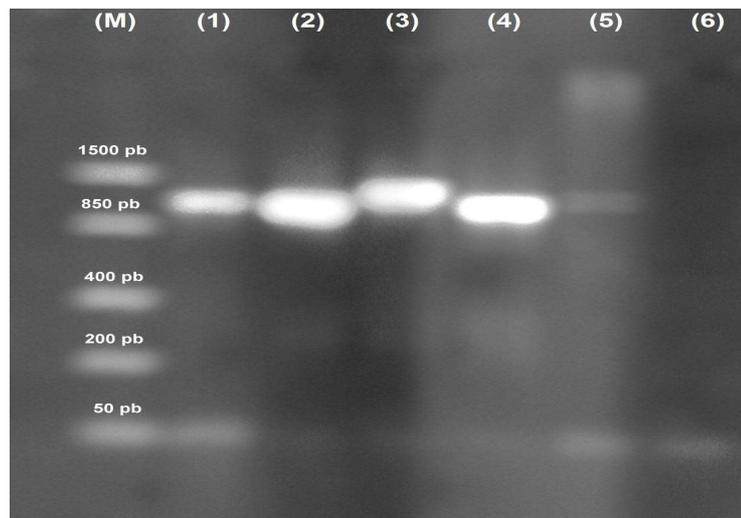


Figura 7. Visualización de productos de PCR para la región ARNr 16S de *H. pylori* (992-1500 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *E. coli*; (4) *S. typhi*; (5) *H. pylori* ATCC 700392; (6) *H. pylori* ATCC 51932; (7) Control (Agua).

Fuente: CIB (2007)

Se puede observar amplificación del producto dentro del tamaño esperado (992-1500 pb) para tres de las cuatro muestras de *H. pylori*. No hubo amplificación esperada para *E. coli* ni para *S. typhi*; tampoco para el control negativo con agua.

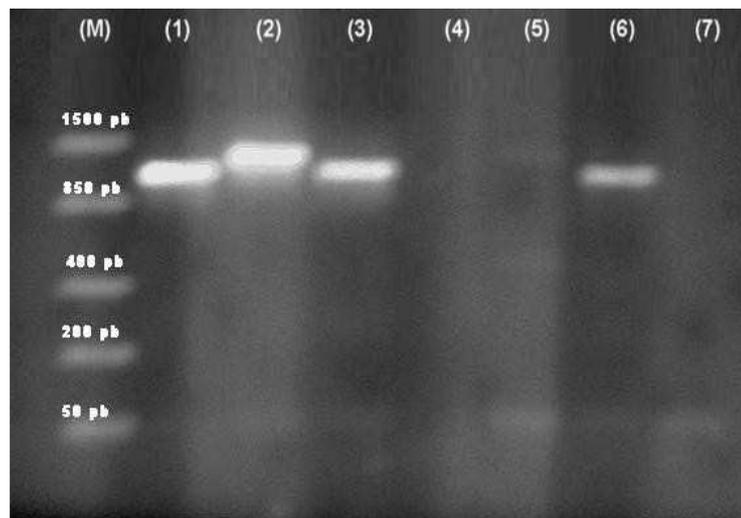
En la figura 8 se visualizan los productos de amplificación de la región ARNr 16S, con la modificación en la concentración de $MgCl_2$ a 1.5 mM.



**Figura 8. Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región ARNr 16S de *H. pylori* (992-1500 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* ATCC 51932; (4) *H. pylori* ATCC 700392; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

En esta ocasión se obtuvo amplificación del producto dentro del rango esperado para todas las muestras de *H. pylori*, incluso se observa una diferencia en cuanto al tamaño entre ambas cepas de la colección ATCC, donde el tamaño para la cepa ATCC 51932 es mayor al de la cepa ATCC 700392; no se obtuvo amplificación para el control negativo con agua.

En la figura 9 se muestra la visualización de los productos de PCR para esta región con la última modificación en la concentración de $MgCl_2$ (aumento a 2.0 mM).

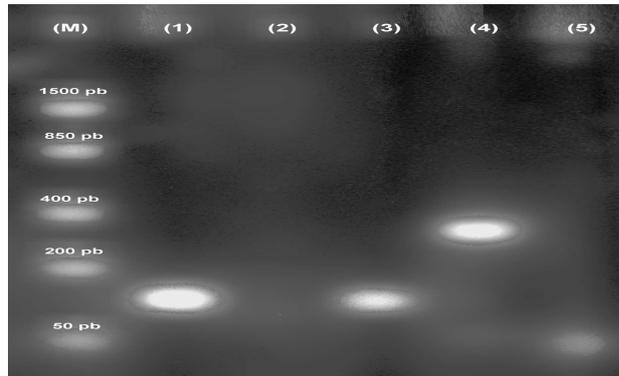


**Figura 9. Visualización de productos de PCR (2ª modificación) para la región ARNr 16S de *H. pylori* (992-1500 pb). (M) Marcador Fast Ruler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) *E. coli*; (5) *S. typhi*; (6) Muestra 20; (7) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)**

Para esta segunda modificación se observa la amplificación de las tres muestras de *H. pylori* empleadas. No se observan productos esperados para *E. coli* ni para *S. typhi*; tampoco para el control negativo con agua.

cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)

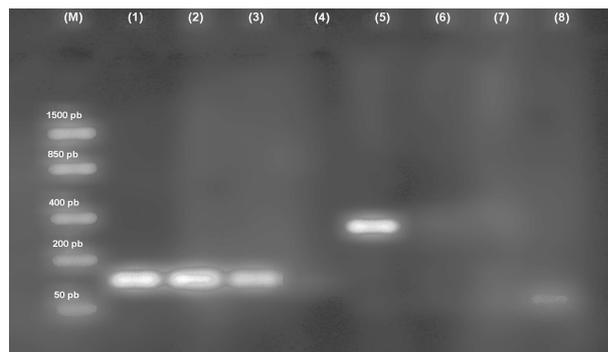
En la figura 10 se muestra la visualización de los productos de PCR para la evaluación preliminar del protocolo para la identificación de la región *cagA* de *H. pylori*.



**Figura 10. Visualización de productos de PCR para la región *cagA* de *H. pylori* (128 pb). (M) Marcador FastRuler Low Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) Muestra 20; (5) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

Según la figura 10 se obtuvo amplificación esperada para las muestras 12455 y ATCC 700392; para la cepa ATCC 51932 no se obtuvo el producto esperado, así como para el control negativo (agua).

Posteriormente se hicieron las modificaciones, de forma simultánea, en cuanto al volumen final de reacción y al volumen de ADN añadido a la reacción. El resultado se muestra en la figura 11.



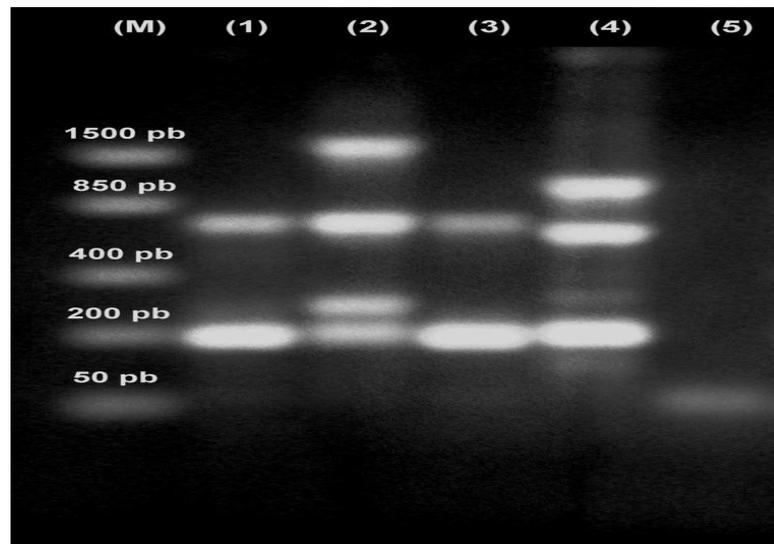
**Figura 11. Visualización de productos de PCR (1ª modificación) para la región *cagA* de *H. pylori* (128 pb). (M) Marcador FastRuler Low Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) *H. pylori* ATCC 51932; (5) Muestra 20; (6) *E. coli*; (7) *S. typhi*; (8) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

En esta reacción de PCR se obtuvo el producto esperado para las muestras 12455 y y99, así como para la cepa *ATCC 700392*. No se obtuvo amplificación esperada para la cepa *ATCC 51932*, *E. coli*, *S. typhi* ni para el control negativo con agua.

vacA (Toxina Vacuolizante)

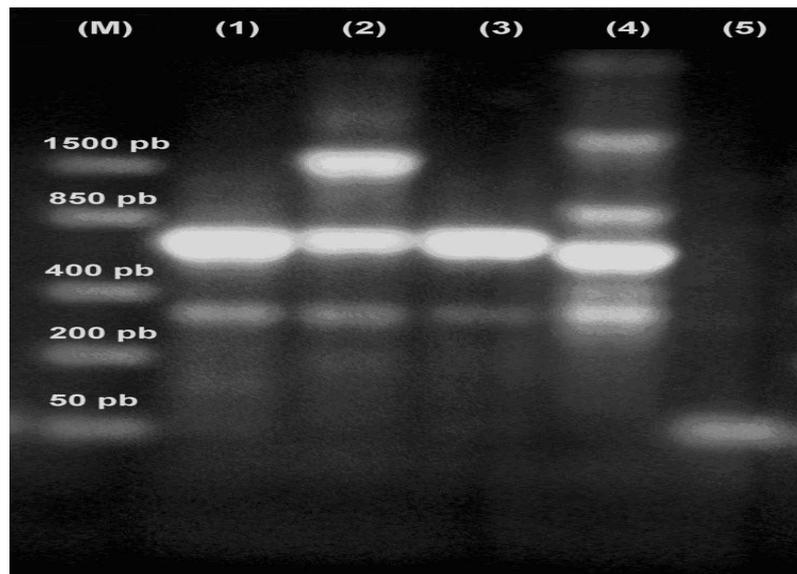
Los protocolos para la determinación de las variantes alélicas de la región *vacA* se valoraron utilizando las muestras de *H. pylori* utilizadas para los protocolos anteriores.

Los resultados correspondientes a la valoración de los protocolos para la región *vacA* se muestran a continuación (figuras 12, 13, 14 y 15).



**Figura 12. Visualización de productos de PCR para la región *vacA s1a* de *H. pylori* (190 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) Muestra 20; (5) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)**

Según la figura 12, se obtuvo el producto de amplificación esperado para *s1a* (190 pb) para todas las muestras de *H. pylori* analizadas. Asimismo, se obtuvieron varios productos inespecíficos de mayor tamaño al esperado. No se obtuvo ningún producto para el control negativo con agua.



**Figura 13. Visualización de productos de PCR para la región *vacA s1b* de *H. pylori* (187 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) Muestra 20; (5) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)**

Para todas las muestras de *H. pylori* utilizadas en la evaluación del protocolo para la variante *s1b*, no se obtuvo el producto esperado (187 pb), pero sí se obtuvieron varios productos inespecíficos, mayores al tamaño esperado. No se obtuvo ningún producto para el control negativo con agua (figura 13)

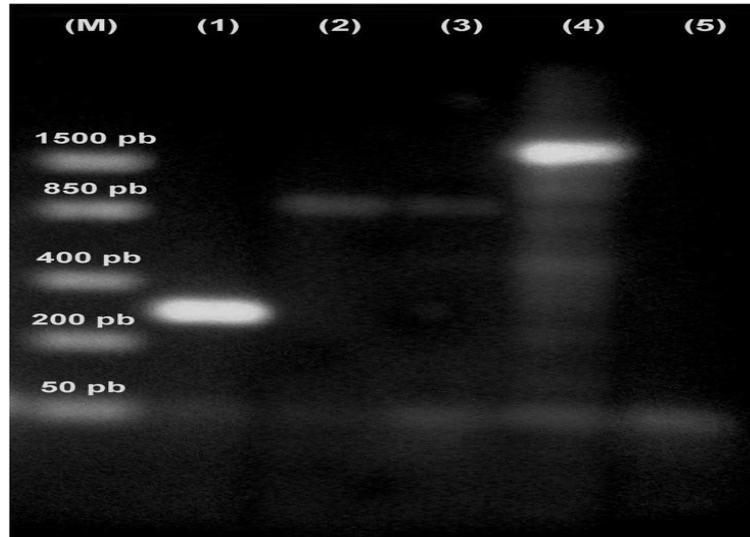


Figura 14. Visualización de productos de PCR para la región *vacA m1* de *H. pylori* (290 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* y99; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) Muestra 20; (5) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)

Según la figura 14, sólo la muestra y99 amplificó el producto esperado para *m1* (290 pb); las demás muestras de *H. pylori* no presentaron este producto. No se presentó el producto esperado para el control negativo con agua.

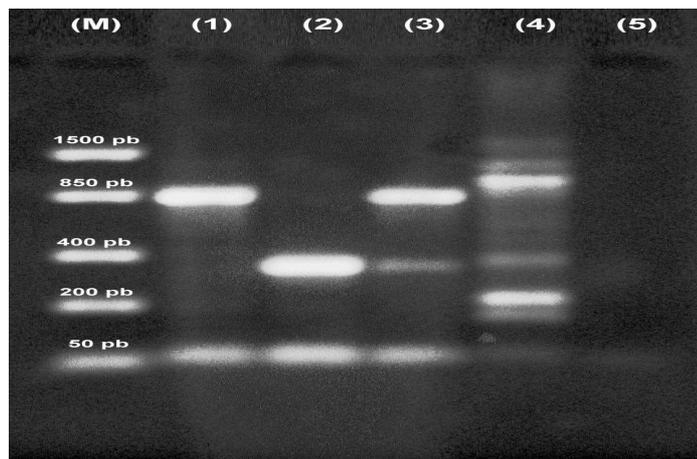


Figura 15. Visualización de productos de PCR para la región *vacA m2* de *H. pylori* (352 pb). (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) Muestra 20; (5) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)

Según la figura 15, se obtuvo amplificación del producto esperado para *m2* (352 pb) para la cepa *ATCC 51932*. Para la muestra 12455 se obtuvo un producto de aproximadamente 850 pb, similar a la cepa *ATCC 700392*. No se obtuvo ningún producto para el control con agua.

En la evaluación del protocolo preliminar de PCR para la variante *s2* se obtuvo el producto esperado (199 pb) para la cepa *ATCC 51932*, aunque también para esta cepa se observaron productos inespecíficos de mayor tamaño al esperado. Para la cepa *ATCC 700392* también se observaron productos inespecíficos de mayor tamaño, pero no se presentó el producto esperado. Tampoco hubo amplificación el control negativo con agua.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los distintos protocolos de PCR para al región *vacA*, se hizo una reducción de la concentración de $MgCl_2$ a 1.5 mM en cada protocolo para cada variante alélica. Los resultados obtenidos con esta modificación se visualizan en las figuras 16, 17 y 18.

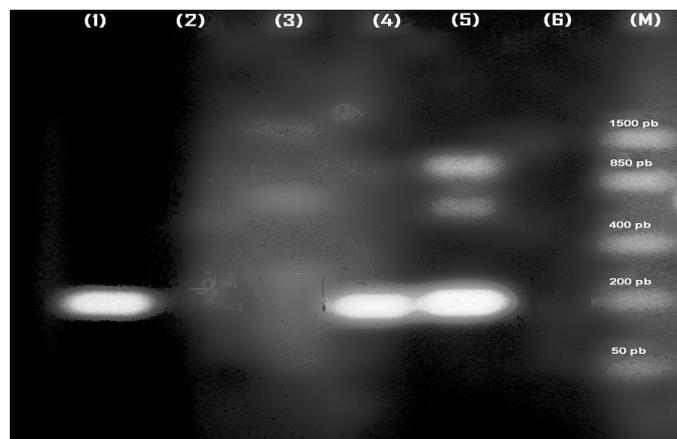


Figura 16. Visualización de productos de PCR para la región *vacA s1a* de *H. pylori* (190 pb), 2ª Evaluación. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* ATCC 51932; (4) *H. pylori* ATCC 700392; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua)

Fuente: CIB (2007)

Se puede apreciar según la figura 16, la amplificación del producto esperado para *s1a* (190 pb) para las muestras 12455 y *ATCC 700392*. No se observan productos de amplificación para las muestras y99 y *ATCC 51932*, ni tampoco para el control negativo con agua.

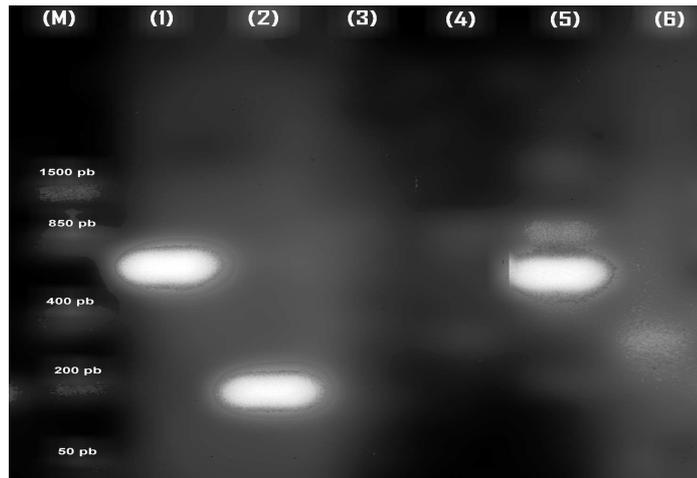
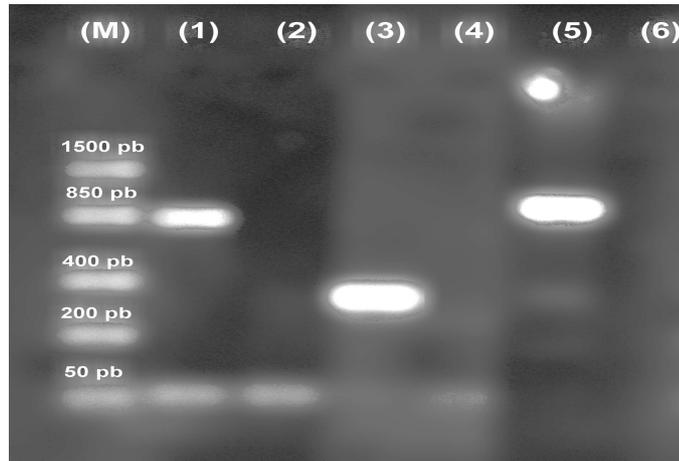


Figura 17. Visualización de productos de PCR para la región *vacA s1b* de *H. pylori* (187 pb), 2ª Evaluación. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori ATCC 51932*; (4) *H. pylori ATCC 700392*; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua)

Fuente: CIB (2007)

Para la reacción de PCR mostrada en la figura 17, la muestra y99 presenta el producto esperado para *s1b* (187 pb), mientras que para la muestra 12455 se visualiza un producto no esperado (también obtenido en la reacción de PCR anterior) entre 400 y 850 pb. No se obtuvieron productos para las cepas *ATCC 51932* ni para *ATCC 700392*, tampoco para el control negativo con agua.



**Figura 18. Visualización de productos de PCR para la región *vacA m2* de *H. pylori* (352 pb), 2ª Evaluación. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* ATCC 51932; (4) *H. pylori* ATCC 700392; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)**

Según la figura 18, se obtuvo el producto esperado para *m2* (352 pb) para la cepa ATCC 51932; no se obtuvo este producto en las cepas y99 ni ATCC 700392. Para la muestra 12455 se obtuvo un producto de tamaño mayor al esperado, resultado similar al obtenido en la reacción de PCR anterior (figura 15). No se obtuvo ningún producto para el control negativo con agua.

En la segunda evaluación del protocolo de PCR para la variante *m1*, el resultado fue el siguiente: se obtuvo el producto esperado (290 pb) para la muestra y99 y la cepa ATCC 700392; no se obtuvo producto para la muestra 12455 ni para la cepa ATCC 51932, así como tampoco para el control negativo con agua.

Igualmente, cuando se reevaluó el protocolo para la variante *s2*, sólo se obtuvo un producto para la cepa ATCC 51932, de tamaño esperado (199 pb). No se obtuvo ningún producto para las muestras 12455 ni y99, tampoco para la cepa ATCC 700392. Asimismo, el control negativo con agua tampoco presentó algún producto de amplificación.

Según los resultados para los protocolos de *vacA*, la disminución de la concentración de $MgCl_2$ redujo la formación de productos inespecíficos para las cepas ATCC de *H. pylori*.

VALORACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES

glmM (Fosfoglucoamin Mutasa)

Según las figuras 19 y 20, se obtuvo el producto de amplificación de tamaño esperado (294 pb) para las muestras 20, 01-07, 02-07, 04.2-07, 06-07, 07-07, 08-07, 12.1-07, 14-07, 15-07, 16-07, 18-07, 19-07 y 21-07. Para algunas de estas muestras también se visualizó un producto de mayor tamaño al esperado (mayor a 1500 pb). No se obtuvo amplificación esperada para las cepas 03-07 ni 04.1-07. También se evaluaron las cepas 25-07, 28-07, 29-07 y 30-07. Para estas últimas no se obtuvo el producto de tamaño esperado.

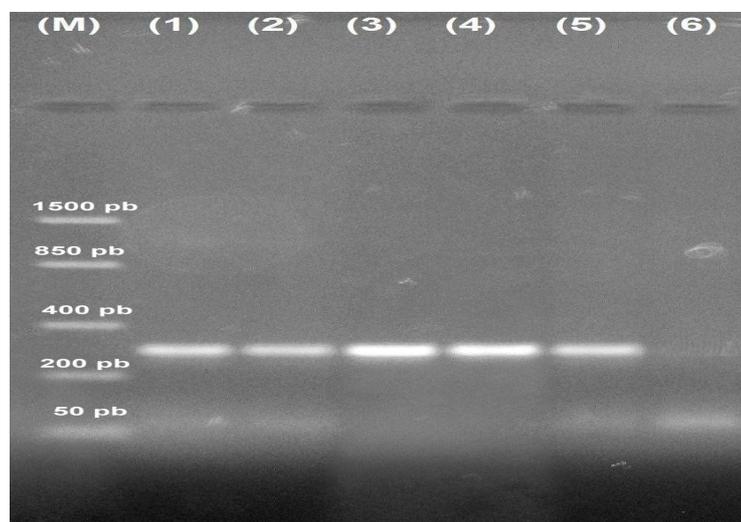
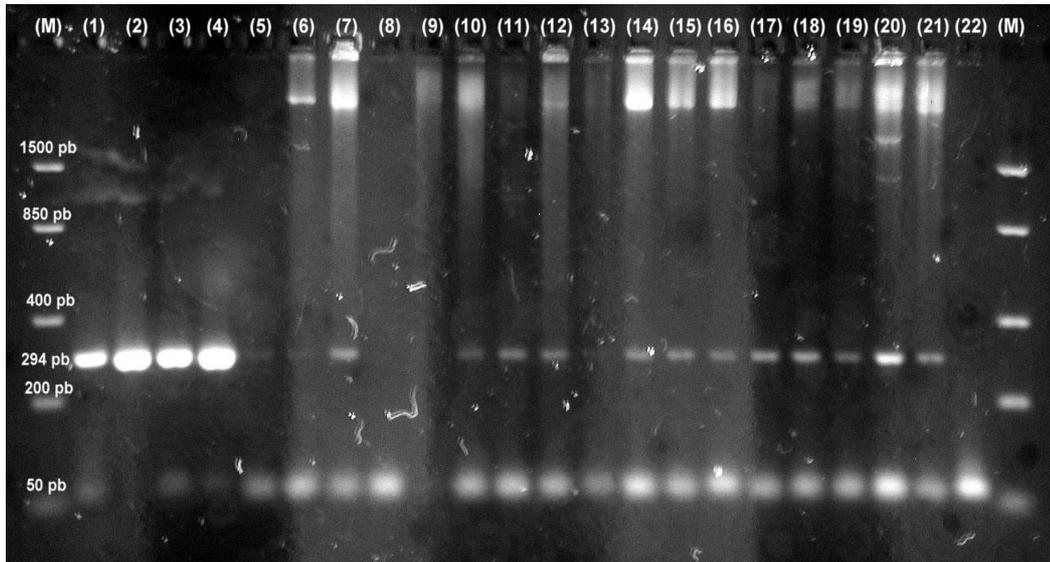


Figura 19. Visualización de productos de PCR para identificar la región *glmM* de *H. pylori* (294 pb) en una muestra ambiental. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* 12455; (4) *H. pylori* y99; (5) Muestra 20; (6) Control (Agua).

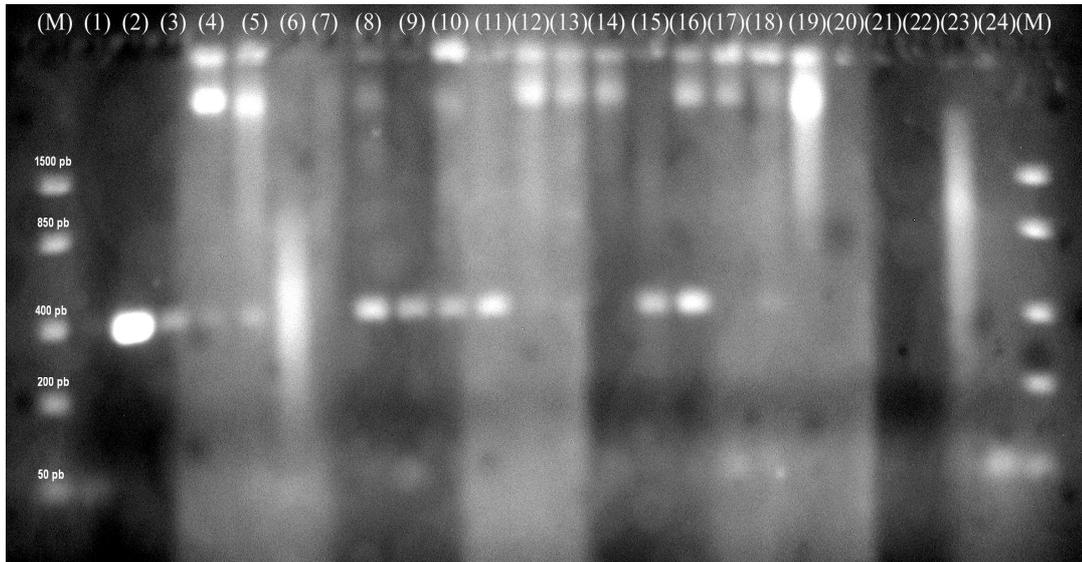
Fuente: CIB (2007)



**Figura 20. Visualización de productos de PCR para identificar la región *glmM* de *H. pylori* (294 pb) en distintas cepas aisladas de agua. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *E. coli*; (4-21) muestras desde 01-07 hasta 21-07; (22) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

ureA (Ureasa)

Se valoraron las muestras ambientales (a excepción de la muestra 20) para la región *ureA*; el resultado se visualiza en la figura 21. Se obtuvo el producto de amplificación esperado para las cepas 01-07, 02-07, 04.2-07, 06-07, 07-07, 08-07, 10.1-07, 12.1-07, 15-07, 16-07, 19-07 y 21-07, así como un producto de mayor tamaño (mayor a 1500 pb) en la mayoría de ellas. No se observó el producto esperado para las cepas 03-07, 04.1-07, 14-07, 18-07, 25-07, 28-07, 29-07 y 30-07.



**Figura 21. Visualización de productos de PCR para identificar la región *ureA* de *H. pylori* (411 pb) en distintas cepas aisladas de agua. M: Marcador Fast Ruler Low-Range; 1: *H. pylori* ATCC 700392; *H. pylori* ATCC 51932; 3: *E. coli*; 4-24: cepas desde 01-07 hasta 30-07, según Cuadro 2; 24: Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

ARNr 16S

Por último, en las figuras 22 y 23 se visualiza la valoración final de las muestras ambientales para la región ARNr 16S. De acuerdo a las figuras 22 y 23, de los aislamientos ambientales sólo la muestra 20 generó el producto de tamaño esperado. Para ninguna de las cepas bacterianas valoradas se observó un producto dentro del rango de tamaño esperado, aunque en algunas de ellas se observa un producto mayor a 1500 pb.

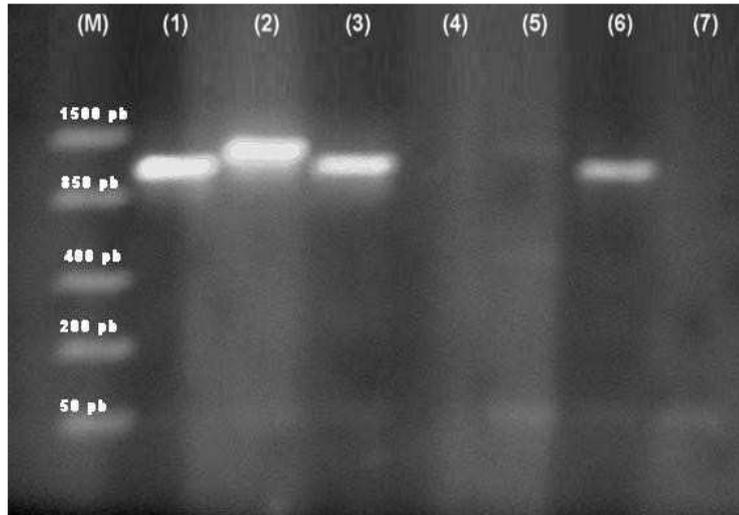


Figura 22. Visualización de productos de PCR para identificar la región ARNr 16S de *H. pylori* (992-1500 pb) en una muestra ambiental. (M) Marcador Fast Ruler Low-Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) *E. coli*; (5) *S. typhi*; (6) Muestra 20; (7) Control (Agua)
Fuente: CIB (2007)

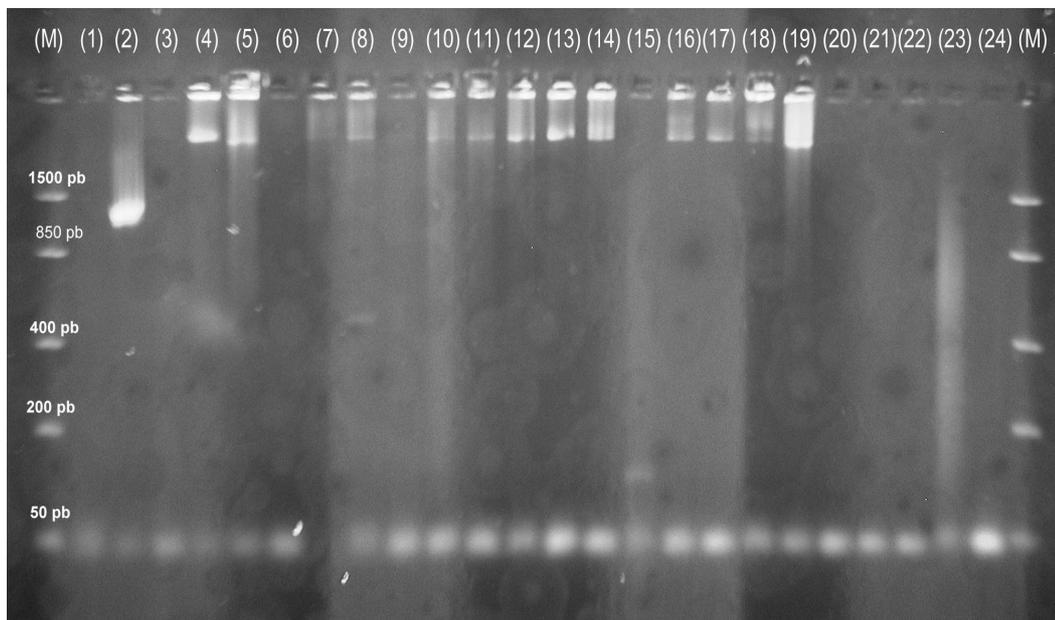
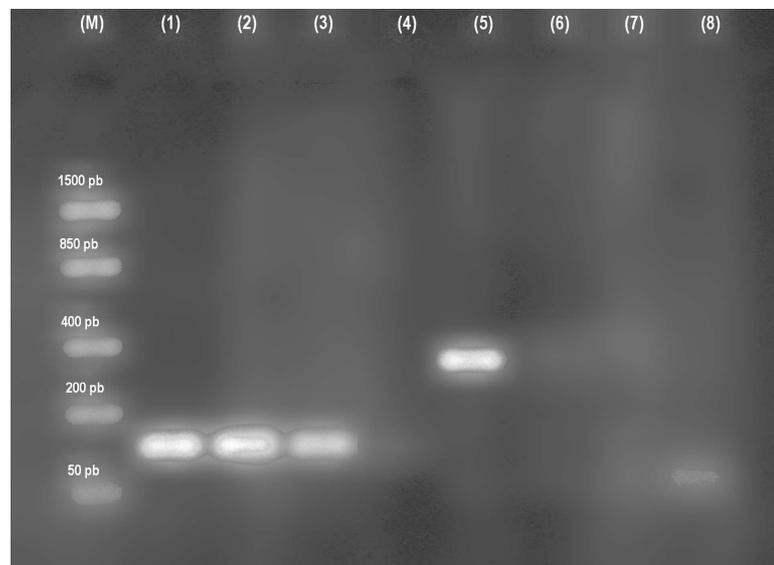


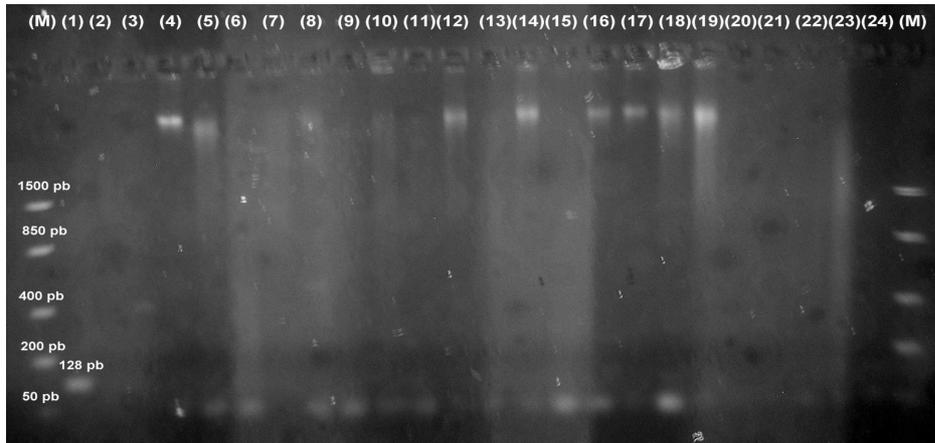
Figura 23. Visualización de productos de PCR para identificar la región ARNr 16S de *H. pylori* (992-1500 pb) en distintas cepas aisladas de agua. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *E. coli*; (4-24) muestras desde 01-07 hasta 30-07; (24) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)

cagA (Proteína Asociada a Citotoxina)

Las muestras ambientales se valoraron para la región *cagA*. Los resultados se visualizan en las figuras 24 y 25. No hubo amplificación del producto esperado para ninguna de las muestras ambientales valoradas. En el caso de la muestra 20 (figura 24), se obtuvo un producto entre 200 y 400 pb no esperado, mientras que para algunas de las demás cepas valoradas (figura 25) se obtuvo un producto no esperado, de más de 1500 pb.



**Figura 24. Visualización de productos de PCR para identificar la región *cagA* de *H. pylori* (128 pb) en una muestra ambiental. (M) Marcador FastRuler Low Range; (1) *H. pylori* 12455; (2) *H. pylori* y99; (3) *H. pylori* ATCC 700392; (4) *H. pylori* ATCC 51932; (5) Muestra 20; (6) *E. coli*; (7) *S. typhi*; (8) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**



**Figura 25. Visualización de productos de PCR para identificar la región *cagA* de *H. pylori* (128 pb) en distintas cepas aisladas de agua. (M) Marcador FastRuler Low-Range; (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *E. coli*; (4-24) muestras desde 01-07 hasta 30-07; (24) Control (Agua).
Fuente: CIB (2007)**

***vacA* (Toxina Vacuolizante)**

Además de las muestras ATCC de *H. pylori*, también se puede sugerir el genotipo *vacA* para las muestras 12455, y99 y la muestra 20. Esta última se evaluó en su región *vacA*, utilizando los protocolos modificados por segunda vez. Según los resultados obtenidos (figuras 16, 17 y 18) para cada una de las variantes alélicas evaluadas en esta muestra, se generaron productos inespecíficos que dificultaron la determinación del genotipo *vacA*.

A continuación, en los cuadros 9 y 10 se resumen los principales resultados de PCR para todas las muestras analizadas en este trabajo.

Cuadro 9.
Resultados de PCR de los genes ARNr 16S, *glmM*, *ureA* y *cagA*, para todas las muestras analizadas

MUESTRA	PCR			
	ARNr 16S	<i>glmM</i>	<i>ureA</i>	<i>cagA</i>
<i>H. pylori</i> ATCC 51932	+	+	+	-
<i>H. pylori</i> ATCC 700392	+	+	+	+
<i>H. pylori</i> 12455	+	-	-	+
<i>H. pylori</i> y99	+	-	-	+
20	+	+	N.D.	(b)
01-07	(a)	+	+	(a)
02-07	(a)	+	+	(a)
03-07	-	-	-	-
04.1-07	-	-	-	-
04.2-07	(a)	+	+	-
06-07	-	+	+	-
07-07	(a)	+	+	-
08-07	(a)	+	+	-
10-07	(a)	+	+	(a)
12.1-07	(a)	+	+	-
14-07	(a)	+	-	(a)
15-07	-	+	+	-
16-07	(a)	+	+	(a)
18-07	(a)	+	-	(a)
19-07	(a)	+	+	(a)
21.1-07	(a)	+	+	(a)
25-07	-	-	-	-
28-07	-	-	-	-
29-07	-	-	-	-
30-07	-	-	-	-

+: Positivo

- : Negativo

(a): Producto mayor a 1500 pb

(b): Producto entre 400 y 200 pb.

N.D.: No Determinado (muestra no analizada para este gen).

Cuadro 10.
Resultados de PCR de la región *vacA* para varias muestras

MUESTRA	PCR <i>vacA</i>				
	<i>s1a</i>	<i>s1b</i>	<i>s2</i>	<i>m1</i>	<i>m2</i>
<i>H. pylori</i> ATCC 51932	-	-	+	-	+
<i>H. pylori</i> ATCC 700392	+	-	-	+	-
<i>H. pylori</i> 12455	+	-	-	-	+*
<i>H. pylori</i> y99	-	+	-	+	-
Muestra 20**	+	-	-	-	+

+: Positivo

- : Negativo

*: Producto de mayor tamaño al esperado.

** : Para cada variante alélica se presentaron varios productos inespecíficos.

En el cuadro 11 se detalla el porcentaje de muestras positivas para cada gen evaluado en PCR.

Cuadro 11.
Número y Porcentaje (%) de muestras, de tipo ambiental, positivas para cada gen evaluado por PCR para la identificación de *H. pylori*

GEN	TOTAL DE MUESTRAS	NÚMERO DE MUESTRAS		
		(+)	(-)	N.C.
ARNr 16S	21	1 (4.76%)	8 (38.10%)	12 (57.14%)
<i>glmM</i>	21	15 (71.43%)	6 (28.57%)	0 (0.00%)
<i>ureA</i>	20	12 (60.00%)	8 (40.00%)	0 (0.00%)
<i>cagA</i>	21	0 (0.00)	12 (57.14%)	9 (42.86%)

(+): Positivo

(-): Negativo

N.C.: No Confirmado (por presencia de productos inespecíficos)

En el cuadro 12 se describe el genotipo *vacA* sugerido para las muestras analizadas para esta región.

Cuadro 12.
Genotipo *vacA* sugerido para varias muestras según resultados de PCR

MUESTRA	GENOTIPO <i>vacA</i>
<i>H. pylori</i> ATCC 51932	s2/m2
<i>H. pylori</i> ATCC 700392	s1a/m1
<i>H. pylori</i> 12455	s1a/m2 ^a
<i>H. pylori</i> y99	s1b/m1
Muestra 20	s1a/m2 ^b

a: El alelo m2 requiere mayor estudio para ser confirmado.

b: El genotipo es preliminar pero no definitivo por la presencia de productos inespecíficos en cada variante

DISCUSIÓN

El análisis de *H. pylori* a partir de fuentes ambientales ha sido ampliamente estudiado, mas el principal problema es su manejo en laboratorio mediante las técnicas microbiológicas convencionales. Es por ello que en la actualidad se ha recurrido a las técnicas moleculares, especialmente la técnica de PCR, para la identificación y caracterización de este microorganismo aislado de este tipo de muestras.

En este trabajo se realizó la evaluación de varios protocolos de PCR para la detección de *H. pylori*, partiendo de muestras de ADN genómico extraído con un kit comercial, para luego valorar distintas cepas aisladas de fuentes de agua de abastecimiento para consumo humano.

Diversos procedimientos de extracción de ADN genómico se han evaluado en el estudio de *H. pylori*. Se han empleado desde métodos que involucran el uso de lisozima y/o proteinasa K, hasta métodos sencillos como la lisis acuosa descrita por Atherton (1997).

Se escogió el Kit Wizard® de entre varios métodos comerciales debido a su amplio uso en diversos estudios que se han llevado a cabo para el análisis molecular de *H. pylori*. Estos estudios han involucrado análisis por PCR de genes de identificación y de caracterización, así como de genes relacionados a resistencia. También se ha utilizado para actividades más específicas como estudios de transcripción, transformación genética, construcción de librerías de ADN e hibridización (Salama *et al*, 2000; Harris *et al*, 2002; Brahmachary *et al*, 2004; Mills *et al*, 2004; Minami *et al*, 2004; Grahn *et al*, 2005; Rabbani *et al*, 2005; Nimri *et al*, 2006; Baldwin *et al*, 2007).

De acuerdo al cuadro 8, la concentración promedio de ADN obtenida para las muestras bacterianas en estudio (354.09 ng/ μ l) es mucho mayor a lo que indica la casa fabricante del kit, lo que significa que éste no se limita a un rango de concentración esperado y más bien se comprobó que es posible obtener concentraciones altas de ADN genómico que se convierten en “reservas madre” de ADN por muestra, de las cuales se pueden usar directamente en reacciones de PCR (como se hizo en este trabajo) o se pueden preparar diluciones a concentraciones más bajas según se desee y/o se requiera, lo que también podría contribuir en evitar o reducir la generación de amplificaciones inespecíficas.

Mediante la relación Abs_{260}/Abs_{280} se pudo comprobar que el promedio obtenido (1.65) es cercano al rango esperado entre 1.7 y 2.0 (Manchester, 1995; Glasel, 1997; Wilfinger *et al*, 1997), lo que permitió establecer que en este trabajo se logró la extracción de ADN de alta calidad, aceptable para su uso en PCR. Esta pureza también fue confirmada mediante la visualización de los ácidos nucleicos en gel de agarosa (figura 3), donde se observan muestras de ADN (en su mayoría) de alta concentración, y para las cuales no se visualizó trazas de ARN o ADN degradado.

De acuerdo a la metodología descrita para el Kit Wizard® y lo realizado en este trabajo, se comprobó que para una extracción eficaz, el paso más importante es la recuperación de las células bacterianas, suspendidas inicialmente en buffer TE 1X, en forma de “pellet” bacteriano al finalizar la centrifugación a 13200 rpm, siendo la masa de este “pellet” el material inicial para su lisis y posterior extracción de ADN genómico. Entre mayor sea esta masa recuperada, mayor será la concentración de ADN genómico, de alta calidad, obtenida para cada muestra procesada.

Luego de confirmar la eficacia del Kit Wizard® para la extracción de ADN genómico de alta pureza, se procedió a evaluar los protocolos de PCR para la identificación de *H. pylori*.

Muchos de los estudios de detección e identificación hechos a aislamientos de *H. pylori* de fuentes ambientales han utilizado las técnicas de PCR estándar y PCR-RT (Reverso Transcriptasa) para la detección de los genes de ARNr 16S, adhesina y ureasa, encontrándose variabilidad en la sensibilidad y especificidad de los métodos para la detección de la bacteria; a pesar de ello, la detección de la región ARNr 16S se ha convertido en el método más adecuado para la identificación de este microorganismo aislado del ambiente, aunque también ha existido variabilidad en los imprimadores empleados para la amplificación de esta región (Enroth & Engstrand, 1995; Hulten *et al*, 1996; Horiuchi *et al*, 2001; Bunn *et al*, 2002).

Debido a la diversidad de metodologías de PCR diseñadas para la identificación de *H. pylori*, y con la finalidad de determinar el o los métodos más adecuados para confirmar la identificación de este microorganismo, en este trabajo se seleccionaron nueve protocolos, los cuales permiten la detección de las regiones ARN 16S, *glmM* (gen codificante de la fosfoglucosamin mutasa), *ureA* (gen de la enzima ureasa), *cagA* (proteína asociada a citotoxina) y *vacA* (toxina vacuolizante). Luego de su evaluación y modificación, estos protocolos fueron utilizados para la valoración de muestras bacterianas aisladas de fuentes de agua para consumo.

Cada protocolo de PCR tomado de la literatura planteaba condiciones muy distintas entre sí, por lo que el mejoramiento y estandarización requiere evaluar tanto la concentración de los componentes de la reacción de PCR como el perfil térmico empleado, lo que puede llevar a un gasto de tiempo y recursos elevado. Es por ello que en este trabajo, la optimización de cada uno de los protocolos se basó principalmente en la obtención del producto esperado para cada región, la reducción de posibles productos inespecíficos, la estandarización del volumen final de reacción a 25 µl, y el uso de 1 a 5 µl de muestra inicial de ADN. Esta optimización también planteó la idea de reducir costos en cuanto a reactivos, si se llegara a implementar como un servicio (más a nivel comercial) para la detección de *H. pylori*.

El protocolo para la detección del gen *glmM* (fosfoglucoamin mutasa, anteriormente conocido como *ureC*) fue tomado de acuerdo a Lage *et al* (1995), que también había sido evaluado por Lu *et al* (1999) y Smith *et al* (2004). En estos estudios se obtuvo el producto esperado de 294 pb para *H. pylori* en distintas muestras aisladas de biopsias gástricas. En este trabajo se evaluó y modificó este protocolo para finalmente valorar las muestras ambientales.

En la primera evaluación del protocolo para *glmM* (figura 4) se obtuvo el producto esperado para las cuatro muestras control de *H. pylori*, y no se obtuvo ningún producto para el control con agua. El rendimiento de cada producto fue aceptable, confirmando la eficacia de este protocolo inicial, tanto en la concentración de los componentes de la reacción de PCR como en el perfil térmico.

Con la idea de reducir el gasto en reactivos, para la segunda evaluación del protocolo *glmM* se redujeron tanto el volumen final de reacción a 25 µl como el volumen de muestra de ADN añadido a 5 µl. Como se observa en la figura 5, estos cambios no influyeron en el rendimiento del producto obtenido para las muestras control de *H. pylori*, por lo que se fijaron estas condiciones en el protocolo final para la valoración de las muestras ambientales.

Según las figuras 19 y 20, del total de muestras ambientales valoradas, 15 presentaron el producto esperado para la región *glmM*, mientras que para 6 muestras no se obtuvo el producto esperado, por lo que no se consideraron como muestras de *H. pylori*.

El protocolo propuesto por Lage *et al* (1995) para la detección de la región *glmM*, evaluado y modificado en este trabajo, logró la identificación diferencial de *H. pylori* sobre otras bacterias de diferente género, permitiendo además la detección de ADN de este microorganismo en diversas muestras ambientales.

El gen *ureA* ha sido uno de los segmentos más ampliamente estudiados por PCR para la detección de *H. pylori*, principalmente en aislamientos de tejido gástrico. Esto porque la prueba del aliento (para determinar la presencia de la enzima ureasa) es característica para detectar la infección por *H. pylori*, y la región *ureA* forma parte del operón que codifica la ureasa. En este trabajo se empleó el protocolo diseñado por Clayton *et al* (1992) para detectar la región *ureA*.

El equipo de Clayton *et al* (1992) diseñó una pareja de oligonucleótidos que amplificaron la región *ureA* (mediante un producto de 411 pb), para así poder identificar la presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas.

En comparación con otros géneros bacterianos, esta región resultó ser específica para *H. pylori*. Esta metodología también fue utilizada por otros autores para el estudio tanto de biopsias como de placa dental, y así determinar los posibles reservorios de *H. pylori* (Lu *et al*, 1999; Berroteran *et al*, 2002; Smith *et al*, 2004).

En la evaluación preliminar de este protocolo, no se obtuvo ningún producto esperado para ninguna de las cuatro muestras control de *H. pylori*. Tampoco se obtuvo amplificación para los controles negativos. Debido a este resultado, se hicieron las modificaciones en la concentración de *Taq* polimerasa (a 0,04 U/ μ l), en el volumen final de reacción (a 25 μ l) y en el volumen de muestra de ADN añadida a la reacción (a 5 μ l).

En la segunda evaluación del protocolo para *ureA* (figura 6) se obtuvo el producto esperado para las cepas control ATCC de *H. pylori*, no así para las otras dos muestras control 12455 y y99. Tampoco se obtuvo el producto esperado para las muestras de *E. coli* y *S. typhi*, ni tampoco para el control con agua. Ya se ha reportado que el aumento de la concentración de *Taq* polimerasa incrementa el rendimiento de los productos de PCR (Henegariu, 2000). Este efecto se confirmó durante esta segunda evaluación, por lo que fue incluida en el establecimiento final del protocolo para la región *ureA*, empleado para la valoración de las muestras ambientales, manteniendo el perfil térmico utilizado en la primera evaluación.

Según la figura 21, para 12 de las 20 muestras ambientales analizadas para *ureA*, se generó el producto de tamaño esperado, mientras que para 8 muestras no se generó ningún producto, por lo que no se logró confirmar que estas cepas corresponden a *H. pylori*.

De acuerdo a los resultados, el protocolo propuesto por Clayton *et al* (1992), con las modificaciones hechas en este trabajo, permitió la identificación de *H. pylori*, diferenciándola de otras bacterias. Además, este protocolo logró detectar la presencia de ADN de *H. pylori* en distintas muestras ambientales.

El protocolo empleado para la detección de la región ARNr 16S de *H. pylori* fue el desarrollado por Shahamat *et al* (2004), el cual utiliza una pareja de oligonucleótidos diseñados a partir del análisis de una región ligada a la región hipervariable del gen ARNr 16S de *H. pylori*, amplificando un producto de entre 992 y 1500 pb, según la cepa de *H. pylori*. Esta pareja de iniciadores mostró ser muy específica para *H. pylori*, diferenciándola de especies de *Helicobacter spp.*

El protocolo fue modificado para ser utilizado a partir de un volumen final de reacción de 25 µl, utilizando 1 µl de muestra de ADN. La primera evaluación del mismo (figura 7) mostró la amplificación dentro del rango de tamaño esperado para las cepas control de *H. pylori* (12455, y99 y ATCC 700392), a excepción de la cepa ATCC 51932. Para esta última se requirió una segunda evaluación para verificar este resultado preliminar.

Se corroboró además la especificidad de los oligonucleótidos, puesto que no se obtuvo amplificación para las demás bacterias evaluadas (*E. coli* y *S. typhi*); igual resultado se mostró para el control con agua. También se comprobó que las condiciones del perfil térmico fueron las idóneas para obtener el producto con un rendimiento aceptable, por lo que no fue necesario modificarlas.

En la segunda evaluación de este protocolo (figura 8), se decidió reducir la concentración de $MgCl_2$ de 2.5 a 1.5 mM, con la premisa de reducir el gasto de este reactivo y establecer alguna diferencia en el rendimiento del producto obtenido. Se obtuvo el producto dentro del rango esperado para las cuatro muestras control de *H. pylori* empleadas, inclusive para la cepa ATCC 51932 que no había mostrado este resultado en la primera evaluación. Asimismo, se logró diferenciar a las cepas ATCC 700392 y ATCC 51932 por el tamaño del producto (en la primera es menor), lo que confirma lo descrito por Shahamat *et al* (2004) en cuanto a que es posible obtener diferencias en el tamaño del producto dependiendo de la cepa de *H. pylori*.

En la tercera evaluación del protocolo para la región ARNr 16S (figura 9), se decidió establecer la concentración de $MgCl_2$ en 2.0 mM. Para las cepas control de *H. pylori*, el rendimiento del producto obtenido fue muy similar al obtenido en la segunda evaluación. No se obtuvo ningún producto para las cepas de *E. coli* ni *S. typhi*, ni para el control con agua.

Una vez evaluado y modificado el protocolo para la región ARNr 16S, se procedió a valorar las muestras ambientales. De ellas, sólo la muestra 20 presentó el producto esperado, mientras que para la demás muestras bacterianas (figuras 22 y 23) no se observó el producto esperado. En demás muestras se observan productos inespecíficos que no permiten confirmar si son cepas de *H. pylori*; puede que sea necesario optimizar algunas condiciones del protocolo para lograr obtener el producto esperado.

El efecto del $MgCl_2$ en la optimización de las reacciones de PCR ha sido ampliamente descrito, y su concentración puede afectar tanto el rendimiento del producto esperado como en la aparición de productos inespecíficos (Blanchard *et al*, 1993; Henegariu, 2000).

Este efecto se comprobó durante la valoración de la muestra 20, la cual arrojó un resultado positivo en el protocolo para la región ARNr 16S, y donde se observó un aumento en el rendimiento del producto esperado cuando se modificó la concentración del MgCl₂ de 1.5 a 2.0 mM.

El protocolo propuesto por Shahamat *et al* (2004) para la región ribosomal de *H. pylori*, evaluado y modificado en este trabajo, permitió una detección diferencial de este microorganismo sobre otros géneros de bacterias. También permitió la detección de ADN de *H. pylori* en una muestra ambiental, persistiendo duda sobre la identificación de otras muestras ambientales.

La región *cagA* está presente en aproximadamente entre el 50 y el 70 % de las cepas de *H. pylori*, principalmente cepas aisladas de biopsias gástricas (Tomasini *et al*, 2003). Es por ello que para este trabajo se empleó el método descrito por Tomasini *et al* (2003) para la detección de la región *cagA* (mediante la amplificación de un producto de 128 pb).

Tomasini *et al* (2003) encontró que una vez detectado este gen en cepas de *H. pylori* aisladas de tejido gástrico, era posible hacer un análisis más a fondo sobre la heterogeneidad en la Isla Genómica de Patogenicidad, debido a que el gen *cagA* es considerado un marcador para esta Isla. En este trabajo solamente se evaluó el protocolo, con algunas modificaciones, para la identificación de cepas *H. pylori cagA*⁺.

En la primera evaluación del protocolo para *cagA* (figura 13) se obtuvo el producto esperado para las muestras 12455 y ATCC 700392. No se obtuvo el producto para la cepa ATCC 51932 ni para el control negativo con agua.

El rendimiento de los productos fue adecuado lo que corroboró la eficacia del protocolo tanto en la concentración de los componentes de reacción como en el perfil térmico. Esto permitió solamente modificar el volumen final de reacción a 25 µl y el volumen de ADN añadido a la reacción a 1 µl, principalmente con el objetivo de reducir el gasto en reactivos.

Las modificaciones en el volumen de reacción y en el volumen de ADN añadido no provocaron diferencias en la generación del producto esperado durante la segunda evaluación del protocolo para *cagA* (figura 14), ya que se obtuvo para las muestras control ATCC 700392, 12455 y y99; no se obtuvo el producto esperado para las muestras ATCC 51932, *E. coli*, *S. typhi* ni para el control con agua.

En ambas evaluaciones se confirmó la condición *cagA* de las cepas ATCC de *H. pylori*, ya que la cepa ATCC 700392 (conocida como *H. pylori* 26695) es *cagA*⁺, mientras que la cepa ATCC 51932 (conocida como *H. pylori* Tx30a) es *cagA*⁻ (Atherton, 1997). Asimismo, se logró determinar que las muestras 12455 y y99 también son *cagA*⁺.

Debido a que no produjeron diferencia en la generación del producto *cagA*, pero sí significan una reducción en cuanto a costo en reactivos, las modificaciones en el volumen final de reacción y de ADN añadido fueron incluidas para el establecimiento final del protocolo para *cagA* que sería utilizado finalmente para la valoración de las muestras ambientales.

De 21 muestras ambientales analizadas (figuras 14 y 15) con el protocolo para *cagA*, en ninguna se presentó el producto esperado de 128 pb. En el caso de la muestra 20 se generó un producto no esperado de entre 200 y 400 pb, lo que no permite clasificarla como *cagA*⁺.

No se ha reportado en otros estudios, en donde se ha analizado la región *cagA* por PCR, la generación de un producto similar al obtenido para esta muestra; tampoco se ha reportado la obtención de otros resultados no esperados para esta región. Esto puede sugerir que esta muestra ambiental, previamente identificada como *H. pylori* presenta una región *cagA* atípica que no se ha reportado a la fecha.

Además, debido a la ausencia de formación de algún producto, 11 de las otras 20 muestras valoradas se consideraron *cagA*⁻.

La evaluación y modificación, en este trabajo, del protocolo utilizado por Tomasini *et al* (2003) para la detección de la región *cagA* de *H. pylori*, permitió la diferenciación entre una cepa *cagA*⁺ y otra *cagA*⁻, lo que indica que es posible utilizar este método para analizar muestras previamente identificadas como *H. pylori* y clasificarlas según su condición *cagA*. Para este método no se obtendría amplificación para otras bacterias, por lo que sería un método de caracterización específico para *H. pylori*. Para una muestra ambiental, este protocolo permitió la amplificación de un producto no esperado que podría ser analizado (por ejemplo, mediante secuenciación) para verificar si se está ante la presencia de una muestra con una región *cagA* atípica, no reportada aún.

Preliminarmente los cuatro procedimientos de PCR evaluados hasta ahora (ARNr 16S, *glmM*, *ureA* y *cagA*) resultaron ser específicos para *H. pylori* en este trabajo. Se verificó que los protocolos para las regiones ARNr 16S, *glmM* y *ureA* permiten la detección e identificación de ADN de *H. pylori*, mientras que el método para *cagA* sería útil para la clasificación de muestras previamente identificadas como *H. pylori*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se establecerían los protocolos para las regiones *glmM* y *ureA* propuestos en este trabajo como los métodos más útiles para la identificación de *H. pylori* en muestras ambientales. Ya Lu *et al* (1999) y Smith *et al* (2004) confirmaron mediante estos protocolos la identificación de *H. pylori* en muestras aisladas de biopsias, previamente analizadas mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas.

Estos resultados permiten determinar que existe una alta probabilidad de que las muestras ambientales valoradas en este trabajo sean *H. pylori*, aunque sería conveniente complementar este resultado con el uso de otras técnicas.

Un detalle importante a acotar es la presencia de un producto de tamaño mayor a 1500 pb presente en un porcentaje de las muestras ambientales valoradas con los protocolos de PCR para las regiones ARNr 16S, *glmM*, *ureA* y *cagA*. Muchas de estas muestras presentan este producto en los cuatro protocolos (algunas sólo lo presentan en algunos protocolos, pero no en todos), lo que ha dejado duda en cuanto a la identificación específica de *H. pylori*.

Durante la realización de este trabajo las condiciones de laboratorio fueron muy variables, como lo fueron: traslados a otro laboratorio y con ello el traslado de las muestras de un lugar a otro, sometiéndolas a periodos de descongelación/congelación, así como el uso de diferentes termocicladores. Estos cambios en las condiciones de laboratorio pueden influir en los resultados esperados, y posiblemente la diferencia obtenida entre la optimización de los protocolos y la valoración de las muestras ambientales se pudo deber a estos cambios. Esto indica que mantener constantes las condiciones de trabajo permitirían evitar diferencias en los resultados obtenidos cuando se realiza trabajos de detección molecular.

También estos resultados de la valoración indican la necesidad de una mayor optimización de los protocolos para lograr la amplificación del producto esperado, especialmente para el protocolo para la región ARNr 16S, el cual se considera clave para la detección específica de *H. pylori*.

Por último, se evaluaron cinco protocolos para el análisis de la región *vacA* de *H. pylori*. Para este trabajo se emplearon las condiciones descritas por Atherton (1995), las cuales también fueron evaluadas por Lu *et al* (2002) para muestras de agua residual. Se propuso un protocolo para los alelos *s1a*, *s1b*, *s2*, *m1* y *m2*. Se utilizó 1 µl de ADN de muestra para un volumen final de reacción de 25 µl. El perfil térmico fue el mismo para cada protocolo, con la diferencia en la temperatura de apareamiento para cada alelo (cuadro 8).

La evaluación preliminar de la cepa *ATCC 700392* dio como resultado la amplificación del producto esperado para el alelo *s1a* (figura 16), mientras que se obtuvieron productos inespecíficos para los alelos *s1b* (figura 17) y *m2* (figura 19). Para la cepa *ATCC 51932* se obtuvo amplificación del producto esperado para los alelos *s2* y *m2* (figura 19), mientras que para los alelos *s1a* (figura 16) y *s1b* (figura 17) se amplificaron varios productos inespecíficos.

Según Lu *et al* (2002), la cepa *ATCC 700392* posee un genotipo *s1a/m1*, mientras que para la cepa *ATCC 51932*, el genotipo es *s2/m2*. La generación de productos inespecíficos, aún en alelos en los cuales no debería haber amplificación, se podía haber estado dando debido a la alta concentración de $MgCl_2$ inicial (2.5 mM) utilizada en cada protocolo. Por ello, se decidió evaluar nuevamente las cepas, pero utilizando una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$, descrita por Atherton (1997).

Este cambio provocó la desaparición de los productos inespecíficos presentes en ambas cepas ATCC para las variantes alélicas *vacA* (figuras 20, 21 y 22) que anteriormente los habían presentado, logrando corroborar el genotipo de cada cepa según lo descrito por Lu *et al* (2002).

Blanchard *et al* (1993) y Henegariu (2000) ya habían descrito que concentraciones de MgCl₂ mayores a 2.0 mM en una reacción de PCR pueden incurrir en la aparición de productos inespecíficos, como ocurrió en la evaluación preliminar de los protocolos *vacA*. La reducción de la concentración a 1.5 mM permitió la desaparición de estos productos no esperados y la corroboración de los genotipos *vacA* para las cepas ATCC de *H. pylori*.

Se fijó la modificación en la concentración de MgCl₂ a 1.5 mM para cada uno de los protocolos para cada variante alélica de la región *vacA*, los cuales finalmente permitieron la valoración de otras muestras, como lo fueron las muestras 12455, y99 y la muestra 20.

Según las figuras 20, 21 y 22, se puede sugerir para la muestra 12455 un genotipo *s1a/m2*, el cual no puede ser definitivo debido a que el producto obtenido para el polimorfismo *m2* fue mayor al esperado (aproximadamente 850 pb).

Esto indica que el alelo *m2* requiere mayor estudio (se sugiere la secuenciación del producto) para confirmar el genotipo sugerido. En el caso de la muestra y99, el genotipo obtenido fue *s1b/m1*, sin que se presente duda alguna al respecto.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, ambos genotipos, *s1a/m2* y *s1b/m1* no son tan comunes entre los genotipos estudiados para *H. pylori*, por lo que estas muestras presentan una condición *vacA* poco frecuente en la naturaleza.

Para el caso de la muestra 20, el genotipo *vacA* preliminar no queda claro, ya que se da la presencia de productos inespecíficos en cada variante alélica analizada, a excepción de la región *s2*. Debido a la amplificación del producto esperado para los alelos *s1a* y *m2*, se podría sugerir el genotipo de la muestra 20 como *s1a/m2*, similar al de la muestra 12455. Sin embargo, este genotipo no llega a ser definitivo debido, como se dijo anteriormente, a la presencia de productos inespecíficos en todos los alelos evaluados.

Aunque el origen de esta muestra puede estar jugando un papel importante en el análisis de esta región (pues es un cultivo líquido con presencia de otras bacterias, y no corresponde a una cepa pura), en el trabajo realizado por Lu *et al* (2002) también se obtuvieron productos de tamaño inesperado para algunas muestras en algunas variantes alélicas, específicamente para las regiones *s2* y *m1*, por lo que no sería extraño que por ser una muestra de tipo ambiental también se presente esta variabilidad en ella.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los protocolos sugeridos por Atherthon (1995) y Lu *et al* (2002), los cuales fueron evaluados y modificados en este trabajo, permiten la caracterización de muestras, en las que previamente se ha detectado la presencia de ADN de *H. pylori*, en su región *vacA*. Para una muestra ambiental no se logró establecer su genotipo *vacA* de forma concluyente debido a la presencia de productos inespecíficos para cada una de sus variantes alélicas analizadas, esto posiblemente por la presencia de ADN de otras bacterias presentes en la muestra original que pudiera estar interfiriendo con la especificidad de la reacción.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- a) El Kit Wizard® para Purificación de ADN Genómico (PROMEGA) resultó ser un método eficaz para la extracción de ADN genómico, de alta concentración y con una alta pureza, a partir de muestras bacterianas de origen ambiental, específicamente aisladas de fuentes naturales de agua.
- b) Los protocolos de PCR para las regiones ARNr 16S, *glmM*, *ureA* y *cagA*, modificados y descritos en este trabajo fueron específicos para la detección de ADN de *H. pylori* en muestras ambientales.
- c) El protocolo para la región ARNr 16S, además de ser específico para la identificación de *H. pylori*, permite diferenciar entre cepas de esta especie de acuerdo al tamaño de producto obtenido.
- d) El protocolo para la región *cagA*+ permitió la diferenciación de cepas de *H. pylori cagA*+ de las cepas *cagA*-, pero es necesario identificar previamente estas cepas con algún otro protocolo de PCR, como los utilizados en este trabajo.
- e) Los protocolos de PCR evaluados en este trabajo para la caracterización de la región *vacA* permiten sugerir para distintas muestras un genotipo *vacA* de acuerdo a la presencia de cada polimorfismo en la muestra. En muestras ambientales se recomienda utilizar esta caracterización cuando en ellas ha sido previamente detectado ADN de *H. pylori* por otros métodos de PCR como los descritos en este trabajo.

- f) Los protocolos para las regiones *glmM* y *ureA* permitieron la detección preliminar de *H. pylori* en muestras aisladas de fuentes de agua.

- g) De acuerdo con los resultados, se recomienda una mayor optimización de los protocolos de PCR utilizados en este trabajo para la valoración de muestras ambientales.

- h) Para el estudio de cepas ambientales de *H. pylori*, se recomienda que la detección molecular sea precedida con una identificación microbiológica y bioquímica, así como el uso de técnicas de microscopía específica, para una mayor certeza del resultado,

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, N. 2005. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4(17): 1-3.

Akopyanz, N; Bukanov, NO; Westblom, TU; Kresovich, S; Berg, DE. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD finger-printing. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142.

Al-Marhoon, MS; Nunn, S; Soames, RW. 2005. Effects of *cagA*⁺ and *cagA*⁻ strains of *Helicobacter pylori* on the human gastric mucus layer thickness. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 20(8): 1246–1252.

Alm, RA & Noonan, B. 2001. The Genome. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *American Society for Microbiology Press*, Washington D. C.

Andersen, LF & Wadström, T. 2001. Basic Bacteriology and Culture. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *American Society for Microbiology Press*, Washington D. C.

Andersen, LP; Espersen, F. 1992. Immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms investigated by the Western immunoblot technique. *J Clin Microbiol* 30: 1743-1751.

Atherton, JC. 1997. Molecular Methods for Detecting Ulcerogenic Strains of *H. pylori*. En: Methods in Molecular Medicine, *Helicobacter pylori* Protocols. Clayton, C.L.; Mobley, H.L.T. eds. Humana Press Inc. Totowa, NJ, US. 133-143 p.

Atherthon, JC; Cover, TL; Papini, E; Telford, TL. 2001. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Atherthon, JC; Cao, P; Peek, Jr RM; Tummuru, MK; Blazer, MJ; Cover, TL. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270: 17771-17777.

Atherthon, JC; Cover, TL; Twells, RJ; Morales, MR; Hawkey, CJ; Blazer, MJ. 1999. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 37: 2979-2982.

Baldwin, DN; Shepherd, B; Kraemer, P; Hall, MK; Sycuro, LK; Pinto-Santini, DM; Salama, NR. 2007. Identification of *Helicobacter pylori* Genes That Contribute to Stomach Colonization. *Infection and Immunity* 75(2): 1005–1016.

Berroteran, A; Perrone, M; Correnti, M; Cavazza, ME; Tombazzi, C; Goncalvez, R; Lecuna, V. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J. Med. Microbiol* 51: 764 – 760.

Blanchard, MM; Taillon-Miller, P; Nowotny, P; Nowotny, V. 1993. PCR buffer optimization with uniform temperature regimen to facilitate automation. *PCR Methods Appl.* 2: 234 – 240.

Blazer, M & Atherthon, JC. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113:321–333.

Brahmachary, P; Dashti, MG; Olson, JW; Hoover, TR. 2004. *Helicobacter pylori* FlgR Is an Enhancer-Independent Activator of σ^{54} -RNA Polymerase Holoenzyme. *Journal of Bacteriology* 186(14): 4535–4542.

Bunn, JEG; MacKay, WG; Thomas, JE; Reid, DC; Weaver, LT. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology* 34: 450 – 454.

Censini, S; Lange, C; Xiang, Z; Crabtree, JE; Ghiara, P; Borodovsky, M; Rappuoli, R; Covacci, A. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14648-14653.

Chen, TS. 2004. Is the Coccoid Form of *Helicobacter pylori* Viable and Transmissible? *J Chin Med Assoc* 67: 547-548.

Clayton, CL; Kleanthous, H; Coates, PJ; Morgan, DD; Tabaqchali, S. 1992. Sensitive Detection of *Helicobacter pylori* by Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 30(1): 192 – 200.

Clemens, J; Albert, MJ; Rao, M; Huda, S; Qadri, F; Vanloon, FPL; Pradhan, B; Naficy, A; Banik, A. 1996. Sociodemographic, hygienic and nutritional correlates of *Helicobacter pylori* infection of young Bangladeshi children. *Pediatr Infect Dis J* 15: 1113-1118.

Covacci, A; Censini, S; Bugnoli, M; Petracca, R; Burroni, D; Macchia, G; Massone, A; Papini, E; Xiang, Z; Figura, N. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immuno-dominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5791-5795.

Cover, TL; Glupczynski, Y; Lage, AP; Burette, A; Tummuru, MK; Perez-Perez, GI; Blaser, MJ. 1995. Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 33: 1496-1500.

De Reuse, H; Labigne, A; Mengin-Lecreulx, D. 1997. The *Helicobacter pylori ureC* Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase. *J Bacteriol* 179(11): 3488 – 3493.

De Vries, N, Van Vliet, AHM; Kusters, JG. 2001. Gene Regulation. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Degnan, AJ; Sonzogni, WC; Standridge, JH. 2003. Development of a Plating Medium for Selection of *Helicobacter pylori* from Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2914 – 2918.

Dunn, B; Cohen, H; Blazer, MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 10(4): 720-741.

Engstrand, L; Gustavsson, S; Jorgensen, A; Schwan, A; Scheynius, A. 1990. Inoculation of barrier-born pigs with *Helicobacter pylori*: a useful animal model for gastritis type B. *Infect Immun* 58: 1763-1768.

Enroth, H & Engstrand, L. 1995. Immunomagnetic Separation and PCR for Detection of *Helicobacter pylori* in Water and Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 33(8): 2162 – 2165.

Figura, N; Vindigni, C; Covacci, A; Presenti, L; Burroni, D; Vernillo, R; Banducci, T; Roviello, F; Marrelli, D; Biscontri, M; Kristodhullu, S; Gennari, C; Vairae, D. 1998. *cagA* positive and negative *Helicobacter pylori* strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance to histological damage. *Gut* 42: 772 – 778.

García-Martínez, J; Acinas, SG; Antón, AI; Rodríguez-Valera, F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* 36: 54 – 64.

Gibson, JR; Slater, E; Xerry, J; Tompkins, DS; Owen, RJ. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 36: 2580-2585.

Glasel, JA. 1997. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18: 62–63.

Go, MF; Kapur, V; Graham, DY; Musser, JM. 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 178: 3934-3938.

Goodman, KJ; Correa, P; Aux, HJT; Ramirez, H; Delany, JP; Pepinosa, OG; Quinones, ML; Parra, TC. 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes—a population-based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol* 144: 290-299.

Grahn, N; Hmani-Aifa, M; Fransén, K; Söderkvist, P; Monstein, H. 2005. Molecular identification of *Helicobacter* DNA present in human colorectal adenocarcinomas by 16S rDNA PCR amplification and pyrosequencing analysis. *Journal of Medical Microbiology* 54: 1031–1035.

Gunn, MC; Stephens, JC; Stewart, JA; Rathbone, BJ; West, KP. 1998. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 51: 761-764.

Harris, AG; Hinds, FE; Beckhouse, AG; Kolesnikow, T; Hazell, SL. 2002. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). *Microbiology* 148: 3813–3825.

Henegariu, O. 2000. PCR Page (En línea). Transylvania, Romania. Consultado 16 ago. 2007. Disponible en <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>.

Horiuchi, T; Ohkusa, T; Watanabe, M; Kobayashi, D; Miwa, H; Eishi, Y. 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol. Inmunol.* 45(7): 515 – 519.

Hulten, K; Enroth, H; Nystrom, T; Engstrand, L. 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol* 85: 282-286.

Hulten, K; Han, SW; Enroth, H; Klein, PD; Opekun, AR; Gilman, RH; Evans, DG; Engstrand, L; Graham, DY; Elzaatari, F. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 110: 1031-1035.

Israel, DA. 2001. Genetic Exchange. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *American Society for Microbiology Press*, Washington D. C.

Kidd, M & Modlin, IM. 1998. A Century of *Helicobacter pylori*: Paradigms Lost – Paradigms Regained. *Digestion* 59: 1-15.

Krogfelt, KA; Lehours, P; Mégraud, F. 2005. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 10 (Suppl. 1): 5–13.

Kusters, JG; Gerrits, MM; Van Strijp, JAG; Vandenbroncke-Grauls, CM. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immuno* 65: 3672-9.

Kwon, DH; El-Zaatari, FA; Woo, JS; Perng, CL; Graham, DY; Go, MF. 1998. REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci*. 43: 980-987.

Labigne, A & Jenks, PJ. 2001. Mutagenesis. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *American Society for Microbiology Press*, Washington D. C.

Lage, AP; Godfroid, E; Fauconnier, A; Burette, A; Butzler, JP; Bollen, A; Glupczynski, Y. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of *cagA* Gene in Gastric Biopsy Specimens. *J Clin Microbiol* 33(10): 2752 – 2756.

Lu, JJ; Perng, CL; Shyou, RY; Chen, CH; Lou, Q; Chong, SKF; Lee, CH. 1999. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *J Clin Microbiol* 37(3): 772 – 774.

Lu, Y; Redlinger, TE; Avitia, R; Galindo, A; Goodman, K. 2002. Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1436 – 1439.

Malaty, HM; Kim, JG; Kim, SD; Graham, DY. 1996. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean children—inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. *Am J Epidemiol* 143: 257-262.

Manchester, KL. 1995. Value of A_{260}/A_{280} ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19: 208–210.

Marais, A; Mendz, GL; Hazell, SL; Mégraud, F. 1999. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 642-674.

Mégraud, F; Brassens Rabbe, MP; Denis, F; Belbouri, A; Hoa, DQ. 1989. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 27: 1870-1873.

Miehlke, S; Thomas, R; Gutierrez, O; Graham, DY; Go, MF. 1999. DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric cancer patients suggests infection with a single predominant strain. *J Clin Microbiol* 37: 245-247.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16: 1215.

Mills, SC; Yang, W; MacCormack, K. 2004. Molecular Characterization of Benzimidazole Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy* 48(7): 2524–2530.

Minami, M; Ando, T; Hashikawa, S; Torii, K; Hasegawa, T; Israel, DA; Ina, K; Kusugami, K; Goto, H; Ohta, M. 2004. Effect of Glycine on *Helicobacter pylori* In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(10): 3782–3788.

Mitchell, HM. 2001. Epidemiology of Infection. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Mobley, HLT. 2001. Urease. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Nichols, L; Sughayer, M; DeGirolami, PC; Baloch, K; Pleskow, D; Eichelberger, K; Santos, M. 1991. Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Pathol* 95: 769-773.

Nimri, LF; Matalaka, I; Bani-Hani, KE, Ibrahim, M. 2006. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *BMC Gastroenterology* 6(27): 1-6.

O'Rourke, J & Bode, G. 2001. Morphology and Ultrastructure. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Osato, MS; Ayub, K; Le, HH; Reddy, R; Graham, DY. 1998. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 36: 2786-2788.

Owen, RJ; Taylor, DE; Wang, G; van Doorn, LJ. 2001. Heterogeneity and Subtyping. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Premoli, G; González, A; Millán-Mendoza, B; Percoco, T; Vielma, A. 2004. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop* 56(2): 85-90.

Promega Corporation, US. 2005. Abstract for Wizard® Genomic DNA Purification Kit (en línea). Madison, US. Consultado 16 ago. 2005. Disponible en <http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.html>

Rabbani, S; Miksa, V; Wipf, B; Ernst, B. 2005. Molecular cloning and functional expression of a novel *Helicobacter pylori* α -1,4 fucosyltransferase. *Glycobiology* 15(11): 1076–1083.

Replogle, ML; Kasumi, W; Ishikawa, KB; Yang, SF; Juji, T; Miki, K; Kabat, GC; Parsonnet, J. 1996. Increased risk of *Helicobacter pylori* associated with birth in wartime and post-war Japan. *Int J Epidemiol*. 25: 210-214.

Salama, N; Guillemin, K; McDaniel, TK; Sherlock, G; Tompkins, I; Falkow, S. 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *PNAS* 97(26): 14668–14673.

Shahamat, M; Alavi, M; Watts, JE; González, JM; Sowers, KR; Maeder, DW; Robb, FT. 2004. Development of Two PCR-Based Techniques for Detecting Helical and Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 42(8): 3613-3619.

Shan, ZW; Shen, H; Zhang, MJ; Xu, JG. 1996. *China Natl J New Gastroenterol* 2: 73 – 75.

Sierra, R. 2002. Cáncer Gástrico, Epidemiología y Prevención. *Acta Médica Costarricense* 44(2): 55-61.

Smith, SI; Oyedeji, KS; Arigbabu, AO; Cantet, F; Megraud, F; Ojo, OO; Uwaifo, AO; Otegbayo, JA; Ola, SO; Coker AO. 2004. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 10(13): 1958 – 1960.

Stein, M; Rappuoli, R; Covacci, A. 2001. The *cag* Pathogenicity Island. En: Mobley, HLT; Menz, GL; Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D. C.

Suerbaum, S; Smith, JM; Bapumia, K; Morelli, G; Smith, NH; Kunstmann, E; Dyrek, I; Achtman, M. 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12619-12624.

Taylor, DE; Eaton, M; Chang, N; Salama, SM. 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol* 174: 6800-6806.

Taylor, NS; Fox, JG; Akopyantz, NS; Berg, DE; Thompson, N; Shames, B; Yan, L; Fontham, E; Janney, F; Hunter, FM; Correa, P. 1995. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 33: 918-923.

Tomasini, ML; Zanussi, S; Sozzi, M; Tedeschi, R; Basaglia, G; De Paoli, P. 2003. Heterogeneity of *cag* Genotypes in *Helicobacter pylori* Isolates from Human Biopsy Specimens. *J Clin Microbiol* 41(3): 976-980.

Tummuru, MK; Cover, TL; Blaser, MJ. 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61: 1799-1809.

Van Doorn, LJ; Figueiredo, C; Sanna, R; Pena, S; Midolo, P; Ng, EK; Atherton, JC; Blazer, MJ; Quint, WG. 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 36: 2597-2603.

Van Duynhoven, ITHP & de Jorge, R. 2001. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? *Bulletin of the World Health Organization* 79: 455–460.

Wang, XF & Wang, KX. 2004. Cloning and expression of *vacA* gene fragment of *Helicobacter pylori* with coccoid form. *J Chin Med Assoc* 67: 549-56.

Westblom, TU; Madan, E; Midkiff, BR. 1991. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 29: 819-821.

Wilfinger, W; Mackey, M; Chanczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22: 474–80.