



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE LA CUERDA
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR
Helicobacter pylori

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ROSSI BILLIE VELAPATIÑO COCHACHI

LIMA – PERU

2006

ASESORA

DRA. MANUELA VERASTEGUI PIMENTEL

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Laboratorio de Investigación y Desarrollo

Facultad de Ciencias y Filosofía

MIEMBROS DEL JURADO

DRA. PATRICIA HERRERA VELIT

PRESIDENTA

MG. DORA MAURTUA TORRES

VOCAL

MG. MIRKO ZIMIC PERALTA

SECRETARIO

DEDICATORIA

Para Juana y Seferino

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas; a todo el personal por su colaboración para la realización de este trabajo, en especial a los miembros del área de “HP”. A Manuela Verastegui por su apoyo total.

Al servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional Cayetano Heredia, a los participantes del estudio por su valiosa donación de muestras, al personal técnico, enfermeras, y médicos gastroenterólogos en especial al Dr. Alejandro Bussalleu por su incansable apoyo a la investigación.

A mi familia y amigos por el respaldo y apoyo siempre.

RESUMEN

El método de recuperación de ADN de la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) o de bacterias viables desde una cuerda que una persona ha tragado, y que es retirada una hora después (método de la cuerda encapsulada), resultó ser una alternativa útil para el análisis tradicional de células o de ADN a comparación de la endoscopía, la cual es invasiva, incomoda, relativamente costosa e inconveniente para estudios pediátricos o en comunidades. En este estudio, se ha ensayado la sensibilidad y la viabilidad del método de la cuerda encapsulada versus la endoscopía para la detección y el análisis de la infección por *H. pylori*. Cuarenta y cuatro biopsias y cuerdas provenientes de personas con síntomas fueron estudiadas, usando los métodos de cultivo y de PCR (para el gen de la ureasa (*ureB*)). Las secciones de biopsia fueron también coloreadas con H&E y Plata para detectar la bacteria. Los aislados de *H. pylori* de las cuerdas y de las biopsias de los mismos pacientes fueron tipificados por el método del RAPD. De las cuerdas de los participantes de quienes las biopsias fueron positivas a *H. pylori* por cultivo, PCR y/o histología, el *H. pylori* fue aislado en el 80% y detectado por PCR en el 91%. Los aislados recuperados de las cuerdas y de las biopsias de un mismo paciente mostraron patrones idénticos o cercanamente relacionados mediante RAPD en cada uno de los 24 casos ensayados. En conclusión, el método de la cuerda encapsulada es una técnica útil para la recuperación y análisis de *H. pylori* cuando los procedimientos no invasivos son requeridos.

ABSTRACT

The method of recovering *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) DNA or viable cells absorbed on a string that a person has swallowed and that is retrieved an hour later (string test) resulted in a useful alternative to traditional analysis of cells or DNA obtained by endoscopy, which is invasive, uncomfortable, relatively costly, and ill-suited of community-based and pediatric studies. This study assayed the sensitivity and viability of the string test versus conventional endoscopic biopsy for detecting and analyzing *H. pylori* infection. Forty-four people with gastric complains were studied using both *H. pylori* culture and urease gen (*ureB*) PCR. *H. pylori* organisms cultured from string test and biopsy specimens from the same patients were fingerprinted by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Biopsy sections were also hematoxylin and eosin and silver stained for *H. pylori* detection. *H. pylori* was cultured from 80% of string and detected by PCR from 91% of strings from participants whose biopsies had been *H. pylori* positive by culture, PCR, and/or histology. Strains recovered from strings and biopsy specimens yielded identical or closely resulted RAPD profiles in each of the 24 cases tested. In conclusion, the string test is a useful method for *H. pylori* recovery and analysis when relatively non-invasive procedures are needed.

I. INDICE

I.	INDICE	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	FORMULACION DE HIPOTESIS Y OBJETIVOS	4
IV.	MATERIAL Y METODOS	5
V.	RESULTADOS	11
VI.	DISCUSIÓN	17
VII.	CONCLUSIONES	20
VIII.	RECOMENDACIONES	21
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
X.	ANEXOS	28

II. INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria-gram negativa que infecta crónicamente la mucosa gástrica de millones de personas a nivel mundial, y que constituye una causa principal de las úlceras pépticas y un factor de riesgo temprano para el cáncer gástrico¹. La higiene deficiente y el hacinamiento son factores de riesgo considerados para la transmisión de *H. pylori*^{2, 3, y 4}. Por ejemplo, entre los peruanos adultos el 90% de los residente de un pueblo joven de Lima, pero solo alrededor de la mitad de la población de clase media alta están infectados con *H. pylori*^{4, 5 y 6}. Además, la infección por *H. pylori* está asociada con la gastritis crónica atrófica y con la hiperclorhidria, este último es un factor de riesgo de enfermedades diarreicas^{7 y 8}. El diagnóstico definitivo de la infección por el *H. pylori* se ha basado primariamente en la endoscopia y luego en el cultivo y/o en el análisis histológico de una sección de biopsia gástrica^{9 y 10}. Cada uno de estos métodos es altamente sensible y específico, pero requieren de una endoscopía, la cual es costosa, invasiva e incomoda, haciéndola inapropiada para estudios a gran escala en comunidades o para un despistaje rutinario en niños; el grupo en el cual la mayoría de las infecciones empieza.

El método de la cuerda (también denominado “Entero-test”) consiste en una cápsula de gelatina que está diseñada para que pueda ser tragada fácilmente y contiene una cuerda absorbente del cual un extremo se sostiene afuera de boca. Esto permite que la cuerda ingerida sea retirada y los microbios gastrointestinales absorbidos en la cuerda sean recuperados y estudiados. Este método ha sido muy

usado para detectar parásitos gastroduodenales tales como *Giardia lamblia* por microscopía^{11, 12 y 13}, *Samonella enterica serovar Typhi* y *Mycobacterium tuberculosis* por cultivos bacteriológicos^{14, 15 y 16}. Estudios recientes también ensayaron su potencial uso para el cultivo de *H. pylori*^{17 y 18}, pero con resultados muy variables: Existen sensibilidades reportadas de casi 100%, 81% y 75% en Australia, Alemania y México respectivamente, relacionado al método de detección del aliento estándar (UBT)^{19, 20 y 21}; y 38% en China relacionado al examen histológico y cultivo de biopsia²². Un estudio en el Perú encontró que el *H. pylori* puede ser detectado eficientemente mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de la cuerda de residentes del Amazonas; la cuerda fue positivo en el 79% de los participantes que fueron positivos con el método de detección de *H. pylori* en heces (HpSA)²³. Sin embargo, lo que no se ha ensayado en estos estudios, es la suposición o hipótesis de que los *H. pylori* obtenidos mediante el método de la cuerda encapsulada sean representativos de la población residente gástrica de bacterias, como de las muestras tomadas de un cultivo de la biopsia gástrica.

En este estudio, se reporta el cultivo eficiente de *H. pylori* de muestras de la cuerda, y la evidencia genotípica de que el ADN (Ácido dexociribonucleido) de los aislados cultivados de la cuerda son muy cercanamente relacionados a aquellos de las biopsias gástricas de los mismos individuos.

III. FORMULACION DE HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS

La prueba de la cuerda encapsulada tiene una validación como instrumento diagnóstico y epidemiológico en la detección eficiente de *Helicobacter pylori*.

3.1 OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1.1 Objetivo General:

- Validar la prueba de la cuerda encapsulada para el diagnóstico de *H. pylori* mediante el uso de varios métodos para analizar la muestra del jugo gástrico, incluyendo PCR, cultivos bacteriológicos y preparaciones histológicas.

3.1.2 Objetivos Específicos:

- Calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba de la cuerda encapsulada con un análisis de la muestra por cultivo bacteriológico para la detección de *H. pylori* en el jugo gástrico contenido en la cuerda.
- Calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba de la cuerda encapsulada con un análisis de la muestra por PCR para la detección de *H. pylori* en el jugo gástrico contenido en la cuerda.
- Analizar los patrones de ADN de *H. pylori* obtenidos de cuerda y biopsia gástrica usando la técnica del RAPD.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Participantes

Todos los participantes incorporados en este estudio dieron su consentimiento informado y cumplieron los criterios de inclusión para ser elegibles. Los criterios de inclusión fueron: adultos (entre 18 y 70 años de edad), de ambos sexos, que presentaron dolores abdominales o dispepsia y que fueron referidos para una endoscopia según criterio del médico tratante. Fueron excluidos aquellos participantes que presentaron cirugía gástrica previa, cáncer gástrico, VIH, cirrosis o en quienes siete días previos a la endoscopia recibieron antibióticos o inhibidores de bomba. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; código 03171 (ver Anexo 1).

4.2 Cuerda Encapsulada y Examen Endoscópico

Esta parte del estudio fue realizado en el Servicio de Gastroenterología Endoscopia del Hospital Cayetano Heredia (Lima - Perú). Estando los participantes en ayunas, tragaron una cápsula de gelatina que se disolvió en el estómago y que contenía un peso de metal y un hilo de algodón absorbente (“la cuerda encapsula”) junto con 100 mL de agua. Un extremo de la cuerda que sale de la cápsula vía un pequeño agujero, fue adherido a la mejilla del participante con una cinta adhesiva antes que la cápsula sea tragada ^{19, 20, 21 y 22}. La cuerda fue retirada del participante una hora después, y 20-30 cm. de la porción distal fue colocada en 500 µL de medio de transporte el cual contiene caldo “Brain Heart Infusión” (BHI) (Difco, 0037-17-8), 20 % de glicerol (Sigma, G7893) y 1% de suplemento Skirrow (Oxoid, SR0069E). Cada muestra fue mantenida a 4 °C y procesada para cultivo y PCR

dentro de las cuatro horas después de haberse realizado la prueba. La cuerda encapsulada usada en este estudio fue fabricada en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (ver Anexo 2).

Luego de extraerle la cuerda al participante, y previa anestesia orofaríngea con una solución de xilocaína al 10% se realizó examen endoscópico (la esofagogastroduodenoscopia), procediéndose a la toma de biopsias. 3 biopsias de antro fueron colectadas de cada participante: uno para la prueba de la hidrólisis de la urea y PCR, uno para el cultivo del *H. pylori*, y uno para la histopatología.

4.3 Cultivo de la cuerda y de biopsia

El vial conteniendo la cuerda en su medio de transporte fue mezclado vigorosamente por 3 minutos, y una alícuota de 150 µL fue sembrada por duplicado en una placa de Agar BHI (Difco, 241830) conteniendo suplemento Skirrow (Oxoid, SR0069E) y en una placa de Agar Columbia CNA (Colistin, Ácido Nalidixico) (Difco, 212104) con suplemento Dent (Oxoid, SR014E). Las biopsias gástricas fueron homogenizadas y una alícuota de 100 µL fue sembrada en Agar BHI con suplemento Skirrow (Oxoid, SR0069E) (ver Anexo 3). Las placas tanto de la cuerda como de la biopsia fueron incubadas bajo condiciones microaerobias (5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂ (Praxair) a 37 °C durante 4 a 7 días. Las colonias del *H. pylori* fueron identificadas por sus características morfológicas, por la prueba de la hidrólisis de la urea (Difco, 0140-01), por la prueba de Citocromo Oxidasa (Pathotec® Cytochrome Oxidase paper strips, Organon Teknika Co.), por la prueba

de la Catalasa (ChemDrops®, Adams Scientific) y por la apariencia de las bacterias recuperadas después de una tinción “Gram”⁶.

Para cada placa de cultivo positivo de *H. pylori* (cuando el participante fue positivo tanto en cuerda como en biopsia) 5 colonias representativas fueron escogidas, y las colonias restantes fueron agrupadas en “pools” (conjunto de colonias). Cada uno de los aislados resultantes (en general 12 aislados por participante) fue procesado separadamente para la extracción de ADN. Las cepas fueron guardadas a -80 °C hasta su análisis. Los cultivos bacteriológicos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas UPCH.

4.4 Prueba de la hidrólisis de la urea

Una biopsia fue colocada en agar Urea, el cual contiene 1.5% de Agar Bacto (Difco, 0140-01) y 1.5% de Agar Urea Base Concentrado 10X (BBL, 21100/21101). La prueba fue considerada de ser positivo si el color cambiaba de amarillo a rosado dentro de 1 hora a temperatura ambiente. El cambio de color se debe a al aumento del pH como producto del hidrólisis de la urea por la Ureasa, una enzima presente en la bacteria. La biopsia usada en esta prueba fue también usada para la extracción de ADN y para realizar el PCR.

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.5.1 Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las bacterias a partir de la cuerda, el líquido remanente del vial conteniendo la cuerda fue colectado y centrifugado a $13,000 \times g$ por 10 minutos. El precipitado o “pellet” resultante fue tratado de acuerdo a las instrucciones del kit QIAamp DNA (Quiagen)⁶. Similarmente, para extraer el ADN de la biopsia usada en la prueba de la hidrólisis de la Urea se realizó usando el mismo kit (ver Anexo 4).

4.5.2 Amplificación

Para evidenciar la presencia de *H. pylori* mediante el PCR, se usó “primers” o cebadores diseñados específicamente para la detección una secuencia de 463 pares de bases en el gen de la ureasa *ureB* (subunidad B) (UreB-F 5'-CGTCCGGCAATAGCTGCCATAGT y UreB-R 5'-GTAGGTCCTGCTACTGAAGCCTTA)^{23 y 24}. El PCR se realizó en condiciones estándar^{6 y 23} en un volumen de 25 uL conteniendo 2.5 uL de ADN, 0.5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 5 pmol de cada primer, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio (Invitrogen) y 0.25 mmol de cada deoxynucleosido trifosfato en un buffer estándar (Invitrogen). Las condiciones de ciclamiento fueron de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 67°C por 30 s, y 72°C por 30 s. Los productos del PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de bromuro de etidio conteniendo 1.5% de agarosa. Los procedimientos arriba mencionados fueron realizados en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas UPCH.

4.6 Amplificación al Azar de Polimorfismos de ADN (RAPD; Random Amplified Polymorphic DNA)

Se realizó un análisis de los patrones de polimorfismo de ADN de los aislados; de “pools y de colonias individuales, mediante la técnica de Amplificación al Azar de Polimorfismos de ADN (RAPD) para la identificación de las posibles diferencias entre los “pools” y colonias aisladas desde la biopsia gástrica y desde la cuerda. El RAPD es un método que sirve para distinguir aislados bacterianos; ésta técnica emplea un cebador o “primer” de una secuencia elegida arbitrariamente para iniciar la síntesis de ADN de sitios en los cuales los cebadores aparecen total o parcialmente en una PCR realizada en condiciones de baja estringencia. Esto resulta en la formación de productos de PCR específico y reproducible de ADN de cada aislado y que son fácilmente separados por electroforesis en geles de agarosa. La técnica del RAPD fue realizada como se describe en Akopyanz N, ²⁵ 1992. Brevemente, el ADN geonómico fue preparado usando el Kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), y cuantificado por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se uso cada uno de los 4 “primers” en cada uno de los 12 aislados de cada participante. Las condiciones de ciclamiento están descritas en el Anexo 5.

Se uso el siguiente criterio para su clasificación: Si los patrones de RAPD obtenidos de los aislados fueron idénticos con cada uno de los 4 “primers” entonces fueron clasificados como “mismos o iguales” dentro de los límites de resolución. Cuando solo una de aproximadamente 20 bandas obtenidas (~ 5 bandas por “primer”, en promedio) fue diferente, los aislados fueron considerados cercanamente relacionados pero no idénticos; es decir “similares”. Si más de dos bandas fueron

diferentes entonces los pares de muestras fueron provisionalmente designados como no relacionados o “diferentes”. Estos análisis de los patrones se realizó en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas UPCH.

4.7 Histología

Una biopsia de antro fue fijada en una solución al 10% de formalina y luego embebidas en parafina. Las secciones de parafina se cortaron fueron coloreadas con Warthin-Starry y H&E (Hematoxilina-Eosina) y leídos microscópicamente para determinar la presencia de *H. pylori* (ver anexo 6). El criterio patológico se realizó como se describe en Recavarren–Arce S.²⁶ 1997. Esta parte del estudio fue realizado en el Servicio de Patología UPCH. Las muestras de biopsias positivas o por cultivo o por histología fueron considerados de ser *H. pylori* positivos, y luego tomados como la prueba “patron de oro” contra la sensibilidad encontrada por la prueba de la cuerda encapsulada.

4.8 Análisis de Datos

Los análisis estadísticos fueron calculados usando el test de proporción (Stata versión 8.0).

V. RESULTADOS

Cuarenta y cuatro de los 50 participantes elegibles (21 hombres, 23 mujeres; cada uno de diferente vivienda) que fueron invitados a participar en este estudio dieron su consentimiento informado. La edad promedio fue de 41.6 años (SD \pm 15.08), y el nivel socioeconómico fue bajo a bajo-medio; 38 de los 44 (86.3%) tuvieron casa de material noble con agua potable y conexión de desagüe, y los otros tuvieron casa de material rústico (adobe o madera). Las observaciones endoscópicas de estos 44 participantes indicaron que tres (6.8%) tuvieron úlceras duodenales, dos (4.5%) tuvieron úlceras gástricas, uno (2.3%) tuvo cáncer gástrico temprano, 33 (75%) tuvieron solo gastritis y cinco (11.3%) tuvieron mucosa aparentemente normal. Sin embargo, histológicamente, ninguna de las 42 biopsias que fueron informativas fueron normales (dos biopsias fueron superficiales y no apropiadas para el análisis histológico): 10 (24%) de ellos tuvieron gastritis crónica superficial, 20 de ellos (47.6%) tuvo gastritis crónica activa, uno (2.4%) tuvo gastritis crónica profunda y cinco (11.9%) tuvo gastritis crónica atrófica solamente y seis (14.3%) tuvo gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del examen endoscópico y de la lectura de histología de los 44 participantes de este estudio.

Observaciones Endoscópicas		Observaciones Histológicas	
Diagnóstico	N (%)	Diagnóstico	N (%)
Úlcera duodenal	3 (6.8)	Gastritis crónica superficial	10 (24)
Úlcera gástrica	2 (4.5)	Gastritis crónica activa	20 (47.6)
Cáncer gástrico temprano	1 (2.3)	Gastritis crónica profunda	1 (2.4)
Gastritis	33 (75)	Gastritis crónica atrófica	5 (11.9)
Mucosa Normal	5 (11.3)	Gastritis crónica atrófica con MI	6 (14.3)
Total	44 (100)	Total	* 42 (100)

* 2 muestras de biopsia fueron superficiales,
MI: metaplasia intestinal

H. pylori fue encontrado por ambos métodos de histología y de cultivo de biopsias en 34 de los 44 participantes (77.27%) y por histología pero no por cultivo en un participante. Sólo 29 de los 35 (82.8%) participantes que fueron positivos por estos dos métodos fueron también positivos por la prueba de la hidrólisis de la urea (un resultado típico, probablemente debido a la baja densidad de la infección o la colonización irregular). Las nueve biopsias que fueron negativas para *H. pylori* por cultivo e histología fueron también negativas por el método de la prueba de la hidrólisis de la urea. El resultado de PCR de las biopsias fue positivo para 34 de los 35 participantes considerados positivos por cultivo o por histología, mientras que un participante fue positivo por histología (observadas separadamente por dos patólogos), pero negativas por cultivo y por PCR.

Lo más importante para el presente estudio, fue que el *H. pylori* fue cultivado de la cuerda de 28 de los 35 participantes con resultados positivos para *H. pylori* en

biopsias (80% de sensibilidad), mientras que ninguno fue cultivado de las cuerdas de los 9 participantes de quienes sus biopsias tuvieron resultados negativos (Tabla 2). Esto indica una sensibilidad de 80% y una especificidad de 100%, con valor predictivo negativo y positivo de 56.2% y 100% respectivamente (95% intervalo de confianza [0.63-0.92]). No se ha logrado cultivar *H. pylori* de las cuerdas de 7 de los 35 participantes en quienes los resultados fueron positivos por otros métodos de detección para *H. pylori*. En tres de los casos hubo contaminación significativa con otras bacterias que pudieron haber impedido el crecimiento de alguna posible colonia de *H. pylori*; los otros 4 no se estudiaron adicionalmente.

El PCR de la cuerda de los 34 participantes con resultado positivo para *H. pylori* por histología y/o cultivo de biopsia indican la presencia de *H. pylori* en 31 de los casos, y además una sensibilidad de 91% (uno de los 35 cuerdas no fue ensayado por PCR debido al material insuficiente). De igual forma, el *H. pylori* fue detectado por PCR en la cuerda en 31 de los 34 (91.1 %) participantes considerados de ser *H. pylori* positivos por PCR en biopsia gástrica. Las tres cuerdas con resultado negativo por PCR dieron resultado positivo por cultivo; la ausencia de producto de PCR podría ser atribuido a la divergencia en la secuencia de unión del “primer”.

Tabla 2. Comparación de biopsia gástrica al método de la cuerda usando cultivos, Coloración de Warthin-Starry y PCR.

Muestras de Biopsia gástrica (N)	No. de Positivos al ensayo de Cultivos/ No. total de cepas (% sensibilidad) ^a		No. de Positivos al ensayo de PCR/No. total de cepas (% sensibilidad) ^c	
	Cuerda	Biopsia gástrica	Cuerda	Biopsia gástrica
Grupo con coloración Histológica y/o cultivo positivo (35)	28/35 (80%)	34/35 ^a (97.1%)	31/34 ^b (91.1%)	34/35 (97.1%)
Grupo con coloración Histológica y/o cultivo negativo (9)	0/9	0/9	4/9	3/9
Total (44)				

^aUna biopsia gástrica fue positiva sólo por coloración.

^bUna muestra de cuerda no tuvo suficiente material para el PCR.

^cNo hubo diferencia significativa entre el PCR y el Cultivo de la cuerda ni entre el PCR de cuerda versus el PCR de la Biopsia. El cultivo de la biopsia fue significativamente más sensible en detectar el *Helicobacter pylori* que la cuerda encapsulada ($P = 0.021$).

El *H. pylori* aislado de la biopsia y de la cuerda fueron ensayados para encontrar similitud por comparación de los patrones obtenidos por RAPD de las colonias y también de los “pools” de 24 participantes (Tabla 3). En 13 de los 24 (54%) participantes se observaron que los patrones de los RADP de cada una de las colonias y de cada uno de los “pools”, fueron “Idénticos” con cada uno de los 4 primers usados (en general, de 4 a 6 fragmentos informativos por primer). En 11 de los 24 participantes (46%) todos los aislados cultivados mostraron patrones muy

“Similares”; con una banda de diferencia. En ningún participante se observó clara diferencia entre los aislados de biopsia y de cuerda. Resultados parecidos se obtuvieron cuando los “pools” de las colonias y las colonias fueron usados para la comparación de biopsia y de cuerda.

Tabla 3. Comparación de cepas de *Helicobacter pylori* aislados de muestras de la cuerda y de muestras de biopsias gástricas, “pools” y 5 colonias mediante la técnica de RAPD.

Resultado de comparación de RAPD	No. (%) de participantes con resultado de comparación con RAPD:			
	Pool vs colonias aislados de biopsia gástrica	Pool vs colonias aislados de la cuerda	Pool de biopsia vs pool de cuerda	Colonias de biopsia vs colonia de cuerda
Igual ^a	15 (62.5)	15 (62.5)	13 (54.1)	13 (54.1)
Similares ^b	9 (37.5)	9 (37.5)	11 (45.8)	11 (45.8)
Diferentes ^c	0	0	0	0
Total	24 ^d	24	24	24

^aPatrones idénticos.

^bPatrones similares; fueron aquellos en los cuales solo 1 banda fue diferente entre las ~20 bandas presentes

^c Patrones diferentes; fueron aquellos en los cuales se observó múltiples bandas diferentes.

^dSolo 24 de 28 participantes cultivo positivos fueron ensayados usando RAPD-PCR.

Los patrones de RAPD de los aislados de *H. pylori* de un mismo participante a partir de la biopsia versus la de cuerda y que dieron resultado muy similar; con una banda de diferencia, se ilustra en la Fig. 1. Los patrones en el panel A fueron

generados con el “primer” 1281 y fue escogido para ilustrar un caso de una diferencia sutil pero real entre los genotipos predominantes de los aislados a partir de la biopsia versus los de la cuerda: la banda polimórfica mas baja en el doblete de 0.9-kb está indicado con una flecha en la línea 12. (Las diferencias adicionales obtenidas por los productos mas grandes por el RAPD ≥ 1.8 kb podría reflejar diferencias en el tamaño del ADN genómico usado para el RAPD y no diferencias en el genotipo del aislado). Los patrones en el panel B fueron generados con el “primer” 1283, y pertenecen a otro participante y fue escogido para mostrar heterogeneidad entre los aislados (en este caso, presencia/ausencia de bandas de 1.2-kb y 1.5-kb entre los aislados de la cuerda).

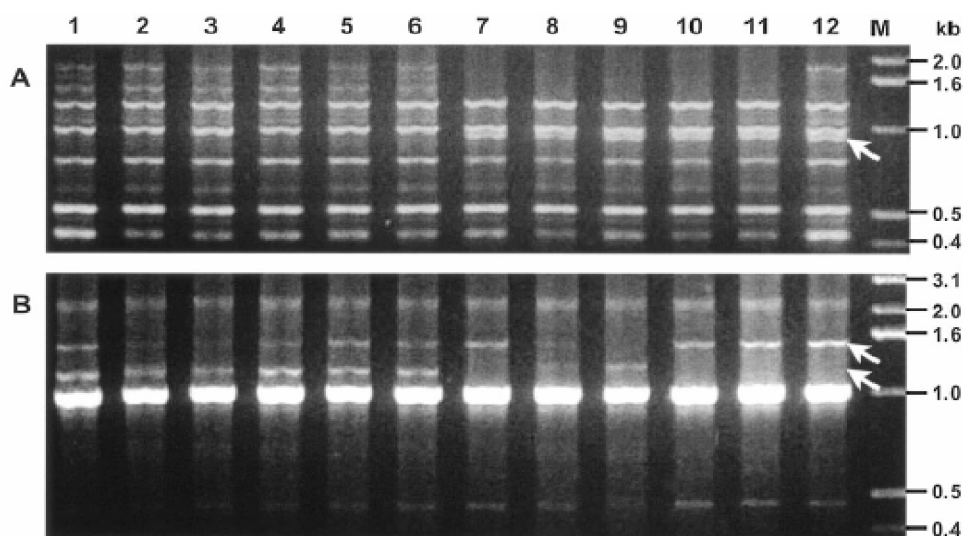


Fig. 1. Patrones representativos de RAPD. Los patrones mostrados aquí fueron generados con ADNs provenientes de un pool de colonias y 5 colonias. Línea M, marcador de peso molecular (los tamaños mostrados son 0.4, 0.5, 1.6, 2.0 y 3.1 kb); líneas del 1 al 6, son “pool” y 5 colonias de los aislados de *H. pylori* a partir de biopsia; líneas del 7 al 12, aislados equivalentes de la cuerda del mismo participante.

VI. DISCUSION

El presente estudio demuestra que la prueba de la cuerda encapsulada, la cual es mínimamente invasiva, económica, barata y no depende de equipos sofisticados o costosos o de radioactividad, permite obtener el cultivo de *H. pylori* de personas infectadas en alrededor del 80% tan eficiente como el logrado con una biopsia gástrica mediante una endoscopia. La contaminación con bacterias del tracto gastrointestinal superior; ya que la cuerda atraviesa el esófago y la faringe, podría ser la principal causa de la ligera baja eficiencia del cultivo de la cuerda versus el cultivo de la biopsia; quizás cambios en el medio de cultivo o la inclusión de diferentes suplementos antibacterianos podrían mejorar su eficiencia. El PCR de los ADN extraídos de las cuerdas arrojaron una sensibilidad de 91.2%, casi cercano al ADN extraído de la biopsia (97.4%). El PCR es una técnica rápida, altamente específica, y no se ve afectada por la presencia de contaminantes bacterianos, pero no es apropiado para análisis de fenotipo o análisis genéticos mas exhaustivos.

Comparaciones previas de aislados de biopsias procedentes de antro y de cuerpo revelaron infecciones mixtas en el 15% de participantes peruanos, aunque fue frecuente que un aislado tienda a predominar²⁷. Además, experimentos de infección de ratones han mostrado que ciertos aislados pueden diferir en el tropismo gástrico- esto es, que no todos los aislados de *H. pylori* son antro- específicas²⁸. Aun cuando las infecciones pueden ser mixtas, en todos los casos ensayados en este estudio, los aislados recuperadas de la cuerda fueron muy comparables a aquellas recuperadas de la biopsia de antro usando el “DNA fingerprinting”. Por consiguiente, los *H. pylori*

cultivados a partir de cuerda son muy probables de ser representativos de aquellos predominantes en la mucosa gástrica. En efecto, dado que la infección puede ser irregular y mixta, la cepa que predomina a lo largo de estómago podría ser muestreada mas eficientemente de la cuerda (que colecta a través de todo el estomago) que de una sola biopsia.

Se han observado diferencias pequeñas pero reales en los patrones de ADN mediante el método del RAPD, sin embargo, la mayoría de éstas diferencias pondrían haber sido generadas por recombinación después de una infección transitoria mixta con una cepa no relacionada, el cual es bastante probable en esta población⁶, o además por una posible selección de recombinantes en al menos en ciertas regiones gástricas. Análisis genéticos de poblaciones han revelado una historia rica de intercambio de genes entre linajes de *H. pylori*²⁹, y en un caso se documento en extensivo la recombinación durante la infección mixta³⁰.

Este estudio sugiere que la prueba de la cuerda será de gran importancia en el contexto de salud pública. Las pruebas usadas de serología no pueden distinguir una infección activa de una pasada. Las pruebas de detección de antígeno en heces y la prueba del aliento pueden detectar infecciones activas pero no son muy acertadas después del tratamiento antimicrobiano⁶, y no ofrecen información genética, o de susceptibilidad antimicrobiana o fenotípica. La endoscopia es un método invasivo e incomodo, la cual la hace inapropiado para niños excepto si la anestesia es usada. En contraste, la prueba de la cuerda es mínimamente invasivo, y puede ser altamente sensible y específico. Finalmente, la prueba de la cuerda debería ser de valor

particular para niños menores a tres años de edad, el grupo principal más crítico, para estudios de cómo empieza la infección y el tipo inicial de interacción bacteria-con el hospedero que podría dar forma a la infección resultante muchos años mas tarde. Cápsulas pediátricas pueden ser usadas en niños debajo de un año de edad (Comunicación personal Dr. Robert H. Gilman), la cual asegura que la cuerda puede ser útil para estudios pediátricos o basados en la comunidad con respecto al tiempo, especificidad y duración de la infección activa por el *H. pylori*.

VII. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio nos permitió conocer la sensibilidad (80%) y la especificidad (100%) del método de la cuerda encapsulada al detectar exitosamente la bacteria *H. pylori* comparándolo frente a las pruebas “patrón de oro” como son la histopatología y el cultivo bacteriológico.
- No se ha observado diferencias marcadas al comparar los genotipos de las bacterias aisladas a partir del contenido gástrico de la cuerda y a partir de la biopsia.

VII. RECOMENDACIONES

- La cuerda encapsulada es una herramienta útil para realizar la identificación de bacterias de *H. pylori* mediante el cultivo. En este sentido, el uso de otros suplementos antibacterianos, además de, un enjuague de boca del participante con soluciones antibacterianas bucales previa a la toma muestra de cuerda podrían inhibir el crecimiento de contaminantes en el cultivo y de esta manera la sensibilidad se vería incrementada.
- En aquellos participantes en los que se han encontrado diferencias en una banda en los patrones de RAPD se podría realizar experimentos de clonación de estos fragmentos y otras pruebas de PCR que podrán distinguir a que gen podría corresponder.
- Finalmente, se requieren estudios adicionales que involucren grandes números de participantes voluntarios antes y después de un tratamiento con antibióticos (disminuyendo así el costo de una endoscopia control y también para estudios de susceptibilidad antimicrobiana) para apoyar los resultados obtenidos en este estudio y así poder obtener conclusiones del significado clínico post-tratamiento.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BLASER MJ and ATHERTON JC. 2004. *Helicobacter pylori*: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 113:321-333.
2. KLEIN PD, Gastrointestinal Physiology Working Group, GRAHAM DY, GAILLOUR A, OPEKUN A, and SMITH EO. 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet.* 337:1503-1505.
3. RAMIREZ-RAMOS A, GILMAN RH, WATANABE J, RECAVARREN AS, SPIRA W, MIYAGUI J, RODRIGUEZ UC, and RAMIREZ-ICAZA C. 1994. *Helicobacter pylori* infection in long-term Japanese visitors to Peru. *Lancet.* 244:1017-18.
4. SACK R. B, and GYR K. *Helicobacter* infections in developing world. 1994. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* 12:144-45.
5. RAMIREZ-RAMOS A, GILMAN RH, WATANABE J, TAKANO J, ARIAS-STELLA J, YOSHIWARA E, RODRIGUEZ C, MIYAGUI J, VELAPATIÑO B, et al. 2005. Comparación de la prevalencia de la infección del estómago por el *Helicobacter pylori* en el Perú en población Japonesa y Peruana. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana.*35:219-224.

6. SOTO G, BAUTISTA C, GILMAN RH, ROTH DE, VELAPATIÑO B, OGURA M, *et al.* 2003. *Helicobacter pylori* Reinfection is common in Peruvian adults following successful antibiotic eradication. *J. Infect. Dis.* 188:1263-1275.
7. EVANS C, GILMAN RH, RABBANI GH, SALAZAR G, and AKABAR A. 1997. Gastric acid secretion and enteric infection in Bangladesh. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.* 91:681-685.
8. GIANNELLA RA, BROITMAN SA and ZAMCHECK N. 1973. Influence of gastritis acidity on bacterial and parasitic enteric infection: A perspective. *Ann. Intern. Med.* 78:271.
9. VAIRA D, MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, *et al.* 1999. Diagnosis of *Helicobacter pylori* with a new non-invasive antigen-based assay. *H. pylori* SA European study group. *Lancet.* 354:30-3.
10. WESTBLOM TU and BHATT BD. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. 1999. *Current Topics in Microbiology & Immunology.* 241:215-35.
11. BEAL C, VIENS P, GRANT R, and HUGHES J. 1970. A new technique for sampling duodenal contents. *Am. J. Trop. Med.* 19:349-52.

12. JONES JE. 1986. String test for diagnosing giardiasis. *Am. Fam. Physician.* 34:123-26.
13. KORMAN SH, HAIS E, and SPIRA DT. 1999. Routine in vitro cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J. Clin. Micro.* 28:368-9.
14. GILMAN RH, ISLAM S, RABBANI H, and GHOSH H. 1979. Identification of gallbladder typhoid carriers by string device. *Lancet.* 14: 795-6.
15. GILMAN RH and HORNICK RB. 1976. Duodenal isolation of *Salmonella typhi* by string capsule in acute typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 3:456-7.
16. VARGAS D, GARCIA L, GILMAN RH, *et al.* 2005. Diagnosis of sputum-scarce HIV-associated pulmonary tuberculosis in Lima, Peru. *Lancet.* 365:150-2.
17. KOPANSKI Z, SCHEILGEL-ZAWADSKA M, WITOWSKA B, CIECIALA A, and SZCZERBA J. 1996. Role of the enterotest in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Med. Res.* 1:520-2.
18. PEREZ-TALLERO E, MONTES M, ALCORTA M, ZUBILLAGA P, and TELLERIA E. 1995. Non endoscopic method to obtain *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 345:1580-1.

19. SAMUELS A, WINDSOR H, HO G, GOODWIN L, and MARSHALL B. 2000. Culture of *Helicobacter pylori* from a gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. *J. Clin. Microbiol.* 38:2438-2439.
20. TORRES J, CAMORLINGA M, PEREZ-PERE G, GONZALES G, and MUÑOZ O. 2001. Validation test for the recovery of *Helicobacter pylori* from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. *J. Clin. Microbiol.* 39:1650-1651
21. LEODOLTER A, WOLLE K, VON ARNIM U, *et al.* 2005. Breath and string test: A diagnostic package for the identification of treatment failure and antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* without the necessity of upper gastrointestinal endoscopy. *World. J. Gastroenterol.* 11:584-586.
22. LEONG R, LEE CH, LING T, LEUNG W, and SUNG J. 2003. Evaluation of the string test for the detection of *Helicobacter pylori*. *World. J. Gastroenterol.* 15:9:309-311.
23. ROTH DE, VELAPATIÑO B, GILMAN RH, SU WW, BERG DE, CABRERA L, and GARCIA EA. 2001. Comparison of a string test-PCR assay and a stool antigen immunoassay (H. pyloriSA) for *Helicobacter pylori* screening in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:398-9.

24. JEONG JY, MUKHOPADHYAY AK, DAILIDIENE D, WANG Y, VELAPATIÑO B, *et al.* 2000. Sequential inactivation of rdxA (H. PYLORI0954) and frxA (H. PYLORI0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182:5082-5090.
25. AKOPYANZ N, BUKANOV NO, WESTBLOM TU, KRESOVICH S, and BERG DE. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nuc. Acids. Res.*20:5137-5142.
26. RECAVARREN-ARCE S, GILMAN RH, LEON-BARUA, *et al.* 1997. Chronic Atrophic Gastritis: Early diagnosis in a population where *Helicobacter pylori* is frequent. *Clin. Infect. Dis.* 25:1006-12.
27. BERG DE, GILMAN RH, LELWALA-GURUGE J, *et al.* 1997. *Helicobacter pylori* Populations in Individual Peruvian Patients. *Clin. Inf. Dis.* 25:996-1002.
28. AKADA JK, OGURA K, DAILIDE G, DAILIDE D, CHEVERUD JM, and BERG DE. 2003. *Helicobacter pylori* tissue tropism: mouse-colonizing strains can target different niches. *Microbiology.* 149 :1901-9.
29. SUERBAUM S, and ACHTMAN M. 2004. *Helicobacter pylori*:

recombination, population structure and human migrations. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:133-9.

30. KERSULYTE D, CHALKAUSKAS H, and BERG DE. 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol. Microbiol.* 31:31-43

IX. ANEXOS

ANEXO 1. CONSTANCIA DE APROBACION DE PROYECTO DE INVESTIGACION Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de Investigación e
Información Científico-Técnica

CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Etica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica, que el **Proyecto de Investigación y Consentimiento Informado** titulado: **Validación de la prueba de la cuerda encapsulada para el diagnóstico de la infección por Helicobacter pylori**, código de inscripción 03171 presentado por la investigadora: Blga. **Rossi Velapatiño Cochachi**, han sido revisados en sesión del CIE de fecha 11 de Noviembre del 2003.

Habiéndose solucionado las modificaciones de forma sugeridas por el Comité Institucional de Etica en dicha reunión se **APROBO** el **Proyecto de Investigación y Consentimiento Informado**.

Diciembre 11, 2003


Dr. Humberto Guerra
Presidente
Comité Institucional de Etica



/Esperanza

CODIGO DE PACIENTE: _____

FICHA DE CONSENTIMIENTO

TITULO DEL ESTUDIO: Validación de la prueba de la cuerda encapsulada para el Diagnostico de *Helicobacter pylori*

LUGAR DE ESTUDIO: Hospital Nacional "Cayetano Heredia" Lima-Perú.

MEDICO RESPONSABLE: Dr. Alejandro Bussalleu Rivera. Servicio de Gastroenterología.

El estomago es un órgano que puede sufrir de muchas enfermedades leves o severas, y que se manifiesta con molestias estomacales sutiles como leve dolor abdominal o vinagreras hasta molestias muy importantes como la intolerancia para ingerir alimentos, nauseas, vómitos y llenura rápida con pocos alimentos. Muchas de las enfermedades estomacales como una simple gastritis o un cáncer se encuentra relacionados con una bacteria que infecta el estomago y que se llama *Helicobacter pylori*. Para diagnosticar la infección por esta bacteria es importante la evaluación medica y la ayuda de algunos análisis de laboratorio como son el análisis de biopsias de estomago (pequeñas muestras de tejido) que son tomadas a través de una gastroendoscopia, análisis de heces y la prueba de la cuerda.

Su medico tratante ha creído conveniente realizarle los análisis para descartar la infección por *Helicobacter pylori* por lo que se requiere de muestras de heces y biopsias gástricas por lo que se le programara una gastroendoscopia, el día de la endoscopia usted traerá la muestra de heces en un frasco que se proporcionara. La endoscopia consiste en introducir un tubo flexible de media pulgada de ancho a través de la boca y que debe llegar hasta el estomago; el propósito de este procedimiento es examinar con detalle la parte interior de su estomago a fin de detectar cualquier anomalía. Para este procedimiento se le aplicara anestesia local en la garganta para disminuir las molestias al pasar el tubo y evitar las nauseas, además se le aplicara una inyección endovenosa para relajarle y quitarle la ansiedad. Durante el procedimiento se le tomara 3 biopsias. Los resultados de estos análisis serán reportados a su doctor, el cual utilizara esta información como ayuda para la decisión de su tratamiento.

La endoscopia ha demostrado ser un procedimiento seguro y con muy pocos riesgos. La mayoría de los pacientes que se someten a este procedimiento no tiene complicaciones de ninguna clase. Sin embargo, en la literatura se han reportado complicaciones raras como perforación intestinal, la cual nunca ha ocurrido en nuestra experiencia.



APROBADO

F. APROBACIÓN: 11/12/03

F. VENCIMIENTO: 11/12/04

CODIGO DE PACIENTE: _____

CONSENTIMIENTO

Acepto participar en el presente estudio de investigación sobre "Validación de la prueba de cuerda encapsulada para el Diagnóstico de *Helicobacter pylori*". Mi medico tratante me ha explicado extensivamente los procedimientos, asi como los beneficios y posibles complicaciones de mi participación. Entiendo que el resultado de las pruebas diagnósticas positivas o negativas para a infección por *Helicobacter pylori* ayudara a mi médico para la decisión sobre el tratamiento que recibire.

Entiendo que las pruebas diagnosticas incluyen:

- Muestra de heces
- Endoscopía donde se tomara pequeñas muestras de tejido.
- El procedimiento de la prueba de la cuerda, en el cual me comprometo a colaborar.

Todos estos procedimientos me han sido explicados por mi medico de una manera extensiva y satisfactoria.

Firmo el presente bajo mi propia y libre voluntad y luego de que mis preguntas han sido satisfactoriamente respondidas.

NOMBRE COMPLETO: _____

DIRECCION PERMANENTE DEL VOLUNTARIO: _____

FIRMA DEL VOLUNTARIO: _____

FECHA: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDAD: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO*: _____

(*SOLO SI EL PARTICIPANTE ES ANALFABETO).



APROBADO

F. APROBACIÓN: 11/12/03

F. VENCIMIENTO: 11/12/04

**ANEXO 2. PREPARACION DE LA CUERDA
ENCAPSULADA DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION
EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS UPCH.**

Materiales y Equipos

1. Capsulas de Gelatina tamaño 1 (Capsuline)
2. Hilo de algodón (Tren Nro. 8, 100% algodón pima)
3. Billas de acero – diámetro 0.156mm
4. Palillos pequeños de Madera (5cm de largo) para facilitar con el enrollamiento de la cuerda dentro de la cápsula
5. Pinzas de metal
6. Mechero “Bunsen”
7. Esterilizador

Métodos

Esterilización de materiales

1. La cuerda o hilo es cortado en 110cm de largo y esterilizado
2. Las billas de acero son esterilizadas.
3. Palillos pequeños de Madera son esterilizados.

Todos los procedimientos son realizados bajo condiciones estériles. Las cápsulas están limpias y son manipuladas con guantes estériles.

Fabricación de la Cuerda encapsulada

1. Abrir/separar la cápsula de gelatina.
2. Hacer un pequeño agujero en uno de las partes de la cápsula usando una pinza de punta fina precalentada en el mechero.

3. Colocar la billa de acero en el fondo de la otra parte de la cápsula
4. Colocar la cuerda de algodón encima de la billa de una manera circular; es to es, dando vueltas alrededor de la cápsula. Esto se facilita con la ayuda de un palillo de madera estéril.
5. Cuando queden 20cm de la cuerda, hacer pasar por agujero de la otra parte opuesta de la cápsula.

Uso de la cápsula

1. Retener el extremo libre de la cuerda, la cápsula es tragada junto con 100 mL de agua.
2. El extreme libre es sujetado en la mejilla
3. La cápsula se disuelve en el estomago, la billa pasa a través del tracto gastrointestinal y las secreciones gástricas se adhieren a la cuerda.
4. La cuerda es retirada en 1 hora y es guardada en el medio de transporte apropiado.

ANEXO 3. MEDIO DE CULTIVO ESTANDAR PARA *H.*

PYLORI.

1. Disolver el Agar BHI (Brain Hearth Infussion Agar) o Agar Columbia CNA en agua destilada y dejar hasta ebullición por 1 minuto.
2. Esterilizar a 121 °C y 15 libras de presión por 15 minutos.
3. Cuando la temperatura se encuentre a 55 °C agregar Isovitalex enrichment al 1% (BBL), Anfoterin B (Sigma) 6 µg/mL, antibiótico Skirrow (Oxoid).
4. Agregar sangre desfibrinada de carnero o caballo al 5-7%.
5. Homogenizar y repartir 25 mL en placas petri estériles.
6. Estriar una biopsia gástrica o el líquido contenido en la cuerda en una placa y dejar en incubación a 37 ° C, en condiciones microaerofilia por 4 a 7 días.
7. Colectar las colonias y realizar las pruebas bioquímicas para su confirmación de *H. pylori*.

ANEXO 4. EXTRACCION DE ADN DE CEPAS DE *H. PYLORI* USANDO EL KIT QIAamp Tissue Kit (QUIAGEN)

1. Colocar la muestra de biopsia o el líquido de la cuerda en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
2. Pipetear 20 µL de Proteinasa K en el tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
3. Pipetear 180 µL del Buffer de Lisis ATL en el tubo de 1.5 mL de microcentrifuga conteniendo la Proteinasa K.
4. Incubar a 56 °C por 60 min.
5. Agregar 200 µL de Buffer AL al tubo de microcentrifuga.
6. Incubar a 70 °C por 10 minutos.
7. Agregar 200 µL de etanol (96%-100%) y vortexear.
8. Cuidadosamente vaciar el lisado del paso 6 en una columna QIAamp spin en un tubo de colección de 2 mL. Centrifugar a alta velocidad por 1 min. Colocar el QIAamp spin columna en un nuevo tubo de colección de 2 mL.
9. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp spin agregar 500 µL de Buffer AW1. Centrifugar a alta velocidad por 1 min.
10. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp spin y agregar 500 µL de Buffer AW2. Centrifugar a alta velocidad por 3 min.
11. Transferir la columna QIAamp spin en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y pipetear 200 µL de Buffer TE o agua. Incubar por 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar a alta velocidad por 1 min para eluir el ADN.

**ANEXO 5. AMPLIFICACION AL AZAR DE
POLIMORFISMOS DE ADN (RAPD; “RAMDON AMLIFIED
POLIMORPHIC DNA”)**

1. Colectar un asado de cepa de un cultivo de dos a tres días de crecimiento y colocar en un tubo de 1.5 mL disolviendo en las paredes del tubo.
2. Agregar 20 μ L de Proteinasa K y vortexear y continuar de acuerdo con el protocolo de QIAamp Tissue Kit (QUIAGEN, Chatsworth, CA) (Anexo 4).
3. Medir la concentración de ADN total aislado: Colocar 1 μ L de muestra con 4 μ L de Buffer de Corrida (cuando se tiene elevada cantidad de ADN, se recomienda hacer una dilución 1:5 para una mejor aproximación) en un pozo de un gel de agarosa al 1%. Comparar la intensidad de la banda con 2.5 μ l =25 ng, 5 μ L =50 ng, 7.5 μ L=75 ng del fago Lamda (10 ng/ μ L).
4. Llevar a cabo la reacción de PCR en un volumen de 25 μ L conteniendo 1-20 ng de ADN de *H. pylori*, 4 mM de MgCl₂, 20 pmoles de cada primer o cebador, 1.0 a 1.2 U de AmpliTaq DNA polimerase, 250 μ M de cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP en buffer estandar. Los primers a usarse: 1254 (5'-CCGCAGCCAA), 1281 (5'-AACGCGCAAC), 1283 (5'-GCGATCCCCA), y 1290 (5'-GTGGATGCGA)
5. Usar el programa de ciclamiento: 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto y 72 ° C por 2 minutos. Después del PCR, tomar 8 μ l del producto mezclar con 2 μ L de buffer de corrida (0.1% Azul de Bromofenol, 50% glicerol), y colocar la muestra en un gel de agarosa (Invitrogen) al 2% conteniendo 0.5 mg/ml de bromuro de etidio en buffer TAE 1X. Usar el 1 kb

DNA ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Fotografiar el gel bajo luz UV después de la electroforesis.

**ANEXO 6. COLORACION DE PLATA (WARTIN STARRY) Y
COLORACION HEMATOXILINA-EOSINA**

Las biopsias gástricas fueron transportadas en formalina (Formol + 10% de Buffer Fosfato) y embebidas en parafina para ser seccionadas en 4 µm de grosor y colocadas en una lámina para su coloración respectiva.

a. COLORACION DE PLATA (WARTIN STARRY)

1. Desparafinar los cortes en xilol, alcohol y agua tridestilada.
(Para los pasos 2 y 3 usar pinzas cubiertas con parafina).
2. Colocar en una solución de nitrato de plata al 1% (solución de impregnación) calentado previamente a 43 ° C por 30 min.
3. Colocar en una solución de nitrato de plata al 2% (solución desarrollador), cual debe ser usado tan pronto como se ha preparado. Dejar hasta que el color marrón o amarillo aparezcan.
4. Lavar rápidamente con agua caliente a 56 ° C aproximadamente.
5. Lavar con agua destilada.
6. Deshidratar con dos cambios de alcohol absoluto y 2 cambios en xilol y montar la lamina.
7. RESULTADOS: Espiroquetas: negro. Contraste: amarillo pálido a marrón claro.

REFERENCIA: Kerr, D. A. Am J Clin Path. Tech Suppl., 8:63,1938

b. COLORACION DE HEMATOXILINA-EOSINA

1. Desparafinar los cortes en xilol y alcohol absoluto.
2. Lavar con agua corriente durante 5 min. y colorear con la Hematoxilina de Harris durante 5 min.
3. Lavar con agua corriente durante 5 min. y sumergir los cortes 3 veces en el alcohol ácido al 1%.
4. Lavar inmediatamente con agua corriente y verificar si los núcleos están bien teñidos observando al microscopio.
5. Colorear con la solución de eosina durante 4 seg. y lavar con agua corriente durante 2 minutos.
6. Tratar los cortes alcohol absoluto y xilol.
7. Montar en bálsamo de Canadá.
8. RESULTADO: Estructuras basófilas de color azul y estructuras eosinófilas de color rosado.

REFERENCIA: Mallory, F. B.: Pathological Technique, Philadelphia W.B. Saunders Company, 1942, p 86.