

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DETECCIÓN DE LOS GENES *vacA* Y *cagA* EN CEPAS DE
Helicobacter pylori OBTENIDAS DE UN HOSPITAL DE LA CIUDAD
DE QUITO Y SU ASOCIACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN
GÁSTRICA**

Daniela Katherine Núñez Acurio

DIRECTOR: Dr. Santiago Escalante Vanoni

QUITO, 2017

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Katherine Núñez Acurio, C.I 1803558079.; autora del trabajo de graduación titulado: Detección de los genes *vacA* y *cagA* en cepas de *Helicobacter pylori* obtenidas de un Hospital de la ciudad de Quito y su asociación con el grado de lesión gástrica, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Daniela Núñez Acurio

CI: 1803558079

DEDICATORIA

A todas las personas que mueven mi mundo

A mis padres y hermano

A mis maestros

A mis amigos

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers

AGRADECIMIENTO

A la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la carrera de BIOQUÍMICA CLÍNICA.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA- INSPI, particularmente al equipo de trabajo de las áreas de Microbiología y Biología Molecular, por transmitirme sus conocimientos, alegría y amor por el trabajo en el laboratorio.

Al Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1, en especial al personal del Servicio de Gastroenterología por su ayuda.

A todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Santiago Escalante director de esta investigación, por su paciencia y apoyo.

Al Mtr. Andrés Zabala por la guía que me ha brindado en la realización de esta investigación; por la enseñanza y la confianza que depositó en mí.

A mi familia, por ser mi constante motivación para superarme en todos los aspectos durante el transcurso de mi vida. A mis amigos por compartir los días de fracasos y de logros durante la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ANEXOS	X
LISTA DE SIGLAS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.2.1 Objetivo General.....	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	5
2.1. Antecedentes.....	5
2.2. Características Generales de <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.2.1. Características morfológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.2.2. Patogénesis de <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.2.3. Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	9
a. Ureasa	9
b. Factores de adherencia.....	10
c. Citotoxina vacuolizante (vacA)	10
d. Proteína codificada por el gen A asociado a la citotoxina (cagA).....	12
2.2.4. Distribución Geográfica de <i>Helicobacter pylori</i>	12
2.2.5. Transmisión de <i>Helicobacter pylori</i>	13
2.3. Enfermedades asociadas a <i>Helicobacter pylori</i>	13
2.3.1. Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10	13
2.3.2. Gastritis (K29).....	14
a. Clasificación de la gastritis	14
2.3.3. Úlcera péptica (K27)	15
2.3.4. Adenocarcinoma gástrico.....	15
a. Grados de lesión gástrica	16
2.4. Métodos diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i>	17
2.4.1. Métodos directos	17
a. Prueba rápida de ureasa	17
b. Cultivo	17
c. Histología.....	18
d. Pruebas Moleculares	18
2.4.2. Métodos indirectos	19
a. Prueba de aliento.....	19
b. Detección de Anticuerpos	19
2.5. Tratamiento para la Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	20
2.5.1. Resistencia antibiótica en <i>Helicobacter pylori</i>	21
2.6. MARCO CONCEPTUAL	21

CAPÍTULO III	24
MARCO METODOLÓGICO	24
3.1. Diseño del Estudio	24
3.1.1. Tipo de Estudio	24
3.1.2. Tipo de Muestreo	24
3.1.3. Tamaño de Muestra	24
3.1.4. Criterios de Inclusión	25
3.1.5. Criterios de Exclusión	25
3.1.6. Análisis Estadístico	25
3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	25
3.2.1 Variable dependiente:	25
3.2.2 Variable independiente:	25
3.3. MATERIALES Y PROCESO	28
3.3.1. Materiales y Equipos	28
3.3.2. Procedimiento	29
a. Fase uno	29
b. Fase dos	30
c. Fase tres	30
d. Fase cuatro	33
 CAPÍTULO IV	 35
RESULTADOS	35
4.1 Descripción general de la población incluida en el estudio	35
4.2. Resultado del diagnóstico clínico	36
4.3. Resultados microbiológicos	39
4.4. Resultados de pruebas moleculares	39
4.4.1. Resultados de extracción de ADN de las biopsias gástricas	39
4.4.2. Sensibilidad y Especificidad	40
4.4.3. Identificación genotípica de <i>Helicobacter pylori</i>	41
4.4.4. Genes de patogenicidad de <i>Helicobacter pylori</i>	42
a. Gen <i>cagA</i>	42
b. Gen <i>vacA</i>	43
4.4.5. Variaciones génicas de los genes <i>cagA</i> y <i>vacA</i>	44
a. Gen <i>cagA</i>	44
b. Gen <i>vacA</i>	46
4.4.6. Relación de la lesión gástrica con la expresión de los genes <i>cagA</i> y <i>vacA</i>	52
4.5. Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i>	52
 CAPÍTULO V	 55
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

- Tabla N° 1. Caracterización de las especies de *Helicobacter*; **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 2. Clasificación de las gastritis de acuerdo al CIE-10 13
- Tabla N° 3. Clasificación actualizada de Sydney basada en hallazgos endoscópicos, histológicos, etiológicos, topográficos y grado de daño..... **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 4. Modelo secuencial de lesión gástrica que precede al cáncer;**Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 5. Estrategias terapéuticas ante la infección con *Helicobacter pylori*.**Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 6. Operacionalización de variables **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 7. Primers para la amplificación de genes conservados de *Helicobacter pylori*. **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 8. Preparación de Master Mix para los genes *ureA* y *flaA2*;**Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 9. Programa de termociclado para la amplificación de los genes *ureA*, *flaA2*, *vacA*, *cagA* **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 10. Primer utilizados para la amplificación de genes de patogenicidad *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori*. **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 11. Preparación de las Master Mix para los genes *vacA* y *cagA*.....**Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 12. Comparación de la calidad del ADN **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 13. Sensibilidad y especificidad del cultivo en relación a la PCR para la detección de *Helicobacter pylori* **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 14. Proporción de muestras positivas para los genes en estudio;**Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 15. Alelos de las regiones s y m del gen *vacA*..... **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 16. Comparación del gen *cagA* con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori* **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 17. Comparación del gen *vacA* de la región “s” con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori*..... **Error! Marcador no definido.**
- Tabla N° 18. Comparación del gen *vacA* de la región “m” con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori*..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla N° 19. Relación del grado de lesión con la expresión del gen *cagA***¡Error! Marcador no definido.**

Tabla N° 20. Relación del grado de lesión con la expresión de los alelos del gen *vacA***¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Morfología de <i>Helicobacter pylori</i> por microscopía electrónica	7
<i>Figura 2.</i> Representación esquemática de la mucosa estomacal colonizada por <i>Helicobacter pylori</i>	9
<i>Figura 3.</i> Representación esquemática de las regiones del gen <i>vacA</i> y sus polimorfismos.	11
<i>Figura 4.</i> Tinción de Wathin-Starry en la que se observan estructuras bacilares incurvadas en el epitelio de superficie.	18
<i>Figura 5.</i> Representación del porcentaje de pacientes de acuerdo al género en relación con los rangos de edad establecido.	35
<i>Figura 6.</i> Porcentaje de pacientes diagnosticados con enfermedades gastrointestinales de acuerdo al CIE-10.	36
<i>Figura 7.</i> Porcentaje de pacientes diagnosticados con una subclasificación de gastritis y duodenitis de acuerdo al CIE-10.	37
<i>Figura 8.</i> Porcentaje de pacientes con gastritis de acuerdo al diagnóstico endoscópico. ..	37
<i>Figura 9.</i> Representación gráfica del porcentaje de pacientes de acuerdo al diagnóstico histológico en relación con el grado de lesión.....	38
<i>Figura 10.</i> Colonias macroscópicas de <i>Helicobacter pylori</i> en Agar Columbia.....	39
<i>Figura 11.</i> Electroforesis en geles de agarosa al 2% de muestras de ADN extraídas de biopsias gástricas.	40
<i>Figura 12.</i> Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación de los genes <i>ureA</i> y <i>flaA2</i>	42
<i>Figura 13.</i> Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación del gen <i>cagA</i>	42
<i>Figura 14.</i> Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación de los alelos <i>s1</i> , <i>s2</i> , <i>m1</i> , <i>m2</i> del gen <i>vacA</i>	43
<i>Figura 15.</i> Alineamiento de las secuencias del gen <i>cagA</i> , comparados con secuencias patrón de <i>Helicobacter pylori</i>	46
<i>Figura 16.</i> Alineamiento de las secuencias del gen <i>vacA</i> región s, comparados con secuencias patrón de <i>Helicobacter pylori</i>	48
<i>Figura 17.</i> Alineamiento de las secuencias del gen <i>vacA</i> región m, comparados con secuencias patrón de <i>Helicobacter pylori</i>	50
<i>Figura 18.</i> Alineamiento de las secuencias del gen <i>vacA</i> región “m” de las muestras 0017 y 0149, comparados con secuencia patrón de <i>Helicobacter pylori</i>	51

<i>Figura 19.</i> Prevalencia de muestras positivas para <i>Helicobacter pylori</i> de acuerdo a los rangos de edad determinados.....	53
<i>Figura 20.</i> Prevalencia de enfermedades gastrointestinales según el CIE-10 en muestras <i>Helicobacter pylori</i> positivo.....	53
<i>Figura 21.</i> Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> en relación con el grado de lesión.	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Autorización del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 para realizar el trabajo de investigación	72
Anexo 2. Consentimiento Informado	73
Anexo 3. Base de datos de información clínica	74
Anexo 4. Control de Calidad del agar Columbia.....	86

LISTA DE SIGLAS

SIGLAS	DESCRIPCIÓN
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
ATP	Adenosin trifosfato
CagA	Gen A asociado a la citotoxina
CagPAI	Islote de patogenicidad del gen <i>cagA</i>
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades Versión 10
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EPIYA	Secuencia de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
MALT	Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas
MAP	Proteínas cinasas de actividad mitogénica
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pro	Prolina
Ser	Serina
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Vac	Citotoxina vacuolizante
Val	Valina

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* es una bacteria involucrada en enfermedades gastrointestinales, principalmente en el desarrollo de gastritis y en el proceso secuencial del cáncer gástrico. El grado de afección que puede causar este microorganismo depende de los factores de virulencia que expresa y las variaciones génicas de los mismos. Entre los genes de virulencia que se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad gástrica se encuentran las citotoxinas CagA y VacA. Bajo este contexto, el presente estudio buscó determinar la presencia de estos genes que codifican estas citotoxinas y establecer su relación con la expresión de patologías gástricas. **Materiales y Métodos:** La muestra estuvo conformada por 231 pacientes que se realizaron endoscopia digestiva alta, en estos se identificó la presencia de *Helicobacter pylori* a través del cultivo y la amplificación de genes específicos (*ureA*, *flaA2*, *cagA*, *vacA*); mediante secuenciación se determinó los genotipos *cagA* y *vacA* para su posterior relación de la expresión de estos genes con el grado de lesión de las enfermedades.

Resultados: La prevalencia de *Helicobacter pylori* fue del 53.24% determinado por la técnica de PCR. Por otro lado, se estableció una proporción del 50.4% del gen *cagA*, y del 57.7 % del gen *vacA*; con una mayor frecuencia de los alelos *s1/m1* que se presentan en el 81.7% de los casos positivos para el gen *vacA*. En el resultado de secuenciación no se determinó mutaciones significativas de los genes *cagA* y *vacA*. Realizando la prueba estadística de Chi cuadrado se estableció que no existe relación significativa entre la expresión de los genes y el grado de lesión gástrica.

Conclusiones: La infección por *Helicobacter pylori* se detectó en un 53.24% de los casos a través de la técnica molecular de PCR; siendo mayor en el género masculino y en el rango de edad de 53-69 años. Las cepas presentaron los genes *cagA* y *vacA*, sin presentar mutaciones reportadas anteriormente; además no se demostró relación entre las patologías encontradas, el grado de lesión y la presencia de los genes.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, enfermedades gástricas, grado de lesión gástrica, factores de virulencia CagA y VacA, variantes génicas.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is a bacteria involved in some gastrointestinal diseases, mainly in the development of gastritis and the sequential process of gastric cancer. The degree of affection that this microorganism can cause depends on the factors of virulence that it expresses and the genetic variations of the same. The virulence genes that have been associated with an increased risk of gastric disease are *cagA* and *vacA* cytotoxins. For this reason, the aim of this study was to determine the presence of these genes and their relationship with the expression of gastric pathologies.

Materials and Methods: The sample consisted of 231 patients who underwent endoscopy, in which the presence of *Helicobacter pylori* was identified through culture and amplification of specific genes (*ureA*, *flaA2*, *cagA*, *vacA*); by means of sequencing, the *cagA* and *vacA* genotypes were determined, after that the expression of these genes was related to the degree of disease injury.

Results: The prevalence of *Helicobacter pylori* was 53.24% determined by the PCR technique. Otherwise, a proportion of 50.4% of the *cagA* gene and 57.7% of the *vacA* gene were established; with a higher frequency of *s1/m1* alleles occurring in 81.7% of cases positive for the *vacA* gene. The statistical analysis of chi square established that there is not significant relationship between gene expression and degree of gastric lesion.

Conclusions and Recommendations: *Helicobacter pylori* infection was determined in 53.24% of the cases through the molecular PCR technique, being more in males and in the age range of 53-69 years. The strains presented the genes *cagA* and *vacA*, without presenting mutations previously reported. In addition, no relationship was found between the pathologies found, their lesion degree and the genes.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric diseases, degree of gastric lesion, virulence factors *cagA* and *vacA*, gene variants.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria que causa infecciones gastrointestinales principalmente en los seres humanos. La infección por este microorganismo inicia un proceso de inflamación de la mucosa gástrica dando lugar a enfermedades que se caracterizan por presentar diferente grado de lesión en el epitelio, siendo la enfermedad más común la gastritis. Se ha reconocido que es la principal causa para el desarrollo de úlcera duodenal, úlcera gástrica, linfoma gástrico y cáncer gástrico en humanos (Gisbert, 2015).

El desarrollo de la infección por *Helicobacter pylori* está sujeta a factores tanto sociales, genéticos del individuo y factores de virulencia que presenta el microorganismo; los cuales favorecen su supervivencia y colonización. En los países en desarrollo, la infección por este microorganismo constituye un problema de salud pública debido a que está relacionado con los modos de vida de la población como el estrato social, el hacinamiento en las viviendas y condiciones de salud deficientes (Domínguez & Huanca, 2013).

La edad en la que se adquiere este microorganismo tiene un rol importante en el desarrollo de enfermedades. Así, si la adquisición se da en la etapa de la niñez se tiene mayor propensión al desarrollo de inflamación severa y la evolución a úlceras gástrica o cáncer. Por otro lado si la adquisición se da en una edad adulta se puede producir diferentes cambios y favorecer al desarrollo de úlcera duodenal (Kusters, et al. 2006).

Helicobacter pylori presenta mecanismos de invasión que le permiten colonizar a su huésped causando daño del epitelio gástrico (Rivas-Traverso & Hernandez, 2000). Entre los mecanismos que presenta este microorganismo para favorecer el desarrollo de la enfermedad, se encuentran la inducción a la inflamación gástrica, la disrupción de la mucosa gástrica, la alteración de la homeostasis gástrica y la evasión inmunológica a través de factores de virulencia presente en el microorganismo (Dunn & Cohen, 2000). Los factores de virulencia considerados como más importantes son las citotoxinas CagA y VacA que se han relacionado con el daño morfológico del epitelio gástrico y la activación de mecanismos de apoptosis. Se ha reportado que las variantes génicas de estas citotoxinas están relacionadas con grados de lesión más severos de la atrofia gástrica, con el desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma; por ello se ha planteado el estudio de estos genes de

virulencia y sus variantes en pacientes infectados con *Helicobacter pylori* y la relación que presenta con la lesión gástrica reportada en los pacientes (Porrás et al, 2013).

Debido a que no existen reportes de la presencia de los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* expresado por los genes *cagA* y *vacA* y la severidad de las formas clínicas se plantea la siguiente pregunta: Cuál es la prevalencia de los genes *cagA* y *vacA* y cuál es su relación con el grado de lesión gástrica en cepas de *Helicobacter pylori* de muestras de biopsia gástrica de pacientes atendidos en un Hospital de la ciudad de Quitodurante los meses de Septiembre 2016 a Febrero 2017.

1.1. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que se encuentra en la mucosa estomacal, asociada a enfermedades como gastritis crónica, ulcera duodenal, adenocarcinoma gástrico y linfoma de Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (MALT) (Kusters et al., 2006). La infección por *Helicobacter pylori* es adquirida más comúnmente en la etapa de la niñez y su transmisión se da persona-persona, vía oral-fecal, vía gastro-oral y está asociada a factores predisponentes como estatus socioeconómico bajo, hacinamiento y mala nutrición (Paez et al. 2006).

La infección por *Helicobacter pylori* se considera ubicua, sin embargo la prevalencia es mayor en países en vías de desarrollo (Masahide & Kenji, 2013). Un estudio realizado en el 2012 en Colombia, Chile, Costa Rica, Honduras, México y Nicaragua presenta que la prevalencia es de 79.4% (Porrás et al., 2013). En otros estudios se reportan cifras similares, así, en Chile se presenta un prevalencia del 72%, en Bolivia de 54% y en Brasil del 82% (Hunt, 2010). Un estudio realizado por Vásquez (2013) en el Hospital Metropolitano en Quito-Ecuador, determina la prevalencia de infección de *Helicobacter* asociada con patologías gástricas la cual fue del 40.2%.

El tratamiento ante *Helicobacter pylori* consiste en una triple terapia en la cual se usa un medicamento inhibidor de bomba de protones (IBP) combinado con amoxicilina y claritromicina o metronidazol. Sin embargo, la resistencia antibiótica que ha desarrollado *Helicobacter pylori* dificulta el tratamiento ante las enfermedades que ocasiona. Escalante, S. en su estudio del 2016 realizado en dos hospitales de la ciudad de Quito evidencia que

más de 50% de cepas de *Helicobacter pylori* son resistentes a fármacos de primera línea como la claritromicina y amoxicilina (Datos en proceso de publicación).

Helicobacter pylori presenta factores de virulencia que facilitan su paso a través de la mucosa gástrica, su colonización y su permanencia en el estómago (Menezes et al., 2015). Entre ellos la ureasa bacteriana, adhesinas, hemaglutininas y la producción de toxinas (Rivas-Traverso & Hernandez,2000). La citotoxina vacuolizante (VacA) cuyos efectos en las células epiteliales incluye la vacuolización, la inducción a la apoptosis y la supresión de la respuesta de células T, puede determinar una prolongación de la infección (Jang et al., 2010). El gen asociado a la producción de citotoxina (*cagA*) también es considerado como un factor de virulencia y está asociado a cambios morfológicos en las células e induce a respuestas pro-inflamatorias y mitogénicas relacionadas con cáncer (Yamaoka 2011). Los factores de virulencia *CagA* y *VacA* han sido reportado como los principales factores que aumentan la inflamación de la mucosa gástrica y están relacionados directamente con la severidad de la infección (Basso et al. 2008).

Por lo antes expuesto el propósito del presente estudio es determinar la presencia de los genes *cagA* y *vacA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su relación con el grado de lesión gástrica en cepas de *Helicobacter pylori* de muestras de biopsia gástrica, proporcionando información sobre las cepas que circulan en la población de estudio y la asociación entre la patogenicidad y los factores de virulencia. Además, con la información generada se podrá tomar medidas que ayuden en el tratamiento de las enfermedades, ya que se asocia a un cuadro clínico más agresivo de las mismas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia de los genes *cagA* y *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* de muestras de biopsia gástrica de pacientes atendidos en un Hospital de la ciudad de Quito y la relación que presenta con el grado de lesión gástrica.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar los genes *cagA* y *vacA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Determinar la variación génica de los genes *cagA* y *vacA* mediante secuenciación
- Relacionar el tipo de enfermedad gástrica y su forma clínica con la presencia de los genes *vacA* y *cagA* y sus variantes génicas.

1.3 Limitación del estudio

Este estudio está limitado a la amplificación de los genes de virulencia *cagA* y *vacA* y su asociación con el grado de lesión gástrico. En este estudio no se compara el resultado obtenido con la prueba histopatológica con los métodos microbiológicos ni moleculares.

Conflicto de interés: Se declara no tener conflicto de interés en la realización de este estudio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes

En 1982 *Warren y Marshall* identificaron una bacteria en forma de espiral, Gram negativa, localizada en la mucosa gástrica asociada a gastritis crónica y úlcera péptica, a la cual nombraron *Campylobacter pylori*; años más tarde se la renombró como *Helicobacter pylori* (Kusters et al., 2006). La prevalencia de infecciones causada por este microorganismo ha ido en aumento, con cifras más altas en países en desarrollo en comparación con los países desarrollados, debido a factores que influyen como el nivel socioeconómico y condiciones de vida (Yamaoka, 2011).

Según la Organización Mundial de Gastroenterología en el 2010, la infección por *Helicobacter pylori* es mayor al 50% y está asociada a enfermedades como úlcera gástrica, linfoma gástrico MALT, gastritis atrófica, dispepsia, y cáncer gástrico (Hunt, 2010). Correa et al (2016) menciona que la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* fue de 36,4% en su estudio realizado con biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en Colombia. En un estudio realizado en Chile en una población infantil la prevalencia reportada fue del 18,1% determinada mediante antígeno en muestras de heces (Villagran et al., 2013). En Ecuador la prevalencia asociada con patologías gástricas en pacientes adultos fue de 40,2% en el 2013 (Vásquez, 2013).

La erradicación del microorganismo es posible mediante terapia antibiótica. Sin embargo la efectividad del tratamiento ha disminuido significativamente en los últimos años debido al desarrollo de resistencia por parte del microorganismo frente a los antibióticos que constituyen la triple terapia estándar como la claritromicina y amoxicilina (Vellejos et al, 2003). Se han alcanzado cifras de curación menores del 80%, la cual es la cifra mínima descrita en el consenso de Maastricht como aceptable para recomendar el uso de un esquema de primera línea (Rodríguez, 2011). Los mecanismos de resistencia reportados han sido mutaciones en el gen *rdxA* generando resistencia al metronidazol (Henaó & Otero, 2009).

Además de los mecanismos de resistencia, se han estudiado los factores de virulencia que presenta *Helicobacter pylori* que influyen en las patologías. Así tenemos, el gen *vacA* que

codifica la proteína de su mismo nombre la cual ejerce varios efectos en la mucosa gástrica, como la inducción de la apoptosis, inmunomodulación y vacuolización en células epiteliales (Yamaoka et al., 2012; Sgouras et al., 2015). El gen *vacA* se encuentra de forma constitutiva en *Helicobacter pylori*, sin embargo existen variaciones en las secuencias génicas tanto en sus regiones medias (*m1-m2*) como en las de señalización (*s1-s2*) entre cepas, que han sido relacionadas con la intensidad de la vacuolización y por lo tanto con las patologías causadas (Atherto et al., 1995; Yamazaki et al., 2005).

Otro factor evidenciado en *Helicobacter pylori*, es la presencia de la isla de patogenicidad *Cag*, ya que en cepas *Cag* positivas se han asociado a cáncer gástrico comparado con cepas *Cag* negativas (Parsonnet, Friedman, Orentreich, & Vogelmann, 1997). Los genes que se encuentran dentro de esta isla de patogenicidad codifican proteínas que conforman el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) que forman un pili para la inyección y liberación del factor *cagA*, proteína codificada dentro de la misma isla de patogenicidad (Censini et al., 1996). Dentro de la célula, la proteína *CagA* sufre una tirosín-fosforilación a nivel de los motivos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA); estos cambios le permiten inducir la proliferación de células epiteliales y posiblemente desarrollo de carcinoma, similar a una oncoproteína (Backert et al., 2000; Ohnishi et al., 2008; Zambon et al., 2016).

2.2. Características Generales de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa de forma espiral, que se relaciona con enfermedades gastroduodenales afectando principalmente la mucosa de los seres humanos (Gisbert, 2015). Se ha descrito que *Helicobacter heilmannii* también puede causar enfermedades gástricas en personas, sin embargo la prevalencia de esta especie es menor (Stolte et al., 2016). Existen otras especies de *Helicobacter* como se menciona en la **Tabla 1**, que se han relacionado de igual manera con enfermedades gástricas en animales, así por ejemplo *Helicobacter felis* que puede causar gastritis y úlcera péptica (Kusters et al., 2006).

Tabla 1. Caracterización de las especies de *Helicobacter*

Espece	Huésped mamífero primario	Patología
<i>H. pylori</i>	Humano, primate	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma, linfoma MALT
<i>H. felis</i>	Perro, gato, ratón	Gastritis

<i>H. mustelae</i>	Hurón	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma, linfoma MALT
<i>H. acinonychis</i>	Leopardo, tigre, otros gatos.	Gastritis y úlcera péptica
<i>H. heilmannii</i>	Humano, perro, mono	Gastritis, síntomas dispépticos, linfoma MALT
<i>H. hepaticus</i>	Ratón	Hepatitis, carcinoma hepatocelular

Nota: Tomado de (Kusters et al., 2006), modificado por Daniela Núñez

2.2.1. Características morfológicas de *Helicobacter pylori*

Es un bacilo Gram negativo de forma helicoidal que mide de 0.5 a 1.0µm de ancho y de 3µm de largo. Posee flagelos polares en un número de 4 a 8, como se observa en la **Figura 1**; los mismos que son esenciales para su movilidad; estos están protegidos por una membrana externa que tiene la misión de evitar su degradación en el medio ácido (Agudo, 2010).

El crecimiento in vitro requiere de un ambiente microaerófilo, en la que se observa colonias pequeñas, con elevación convexa, bordes regulares y transparente en el agar Columbia. En la microscopía se observan estructuras bacilares de forma curvada, sin embargo al encontrarse en situaciones de estrés físico o químico pueden adquirir la forma cocoide que indica inactividad, aumentando su resistencia y supervivencia (Gisbert & Graham, 2010).

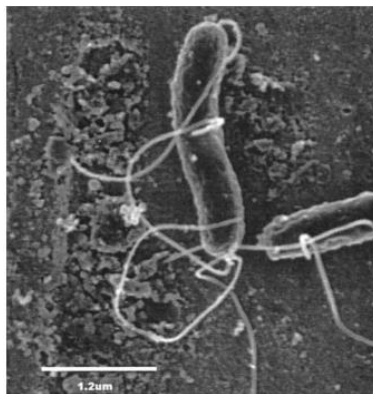


Figura 1. Morfología de *Helicobacter pylori* por microscopía electrónica

Fuente: (Windsor, 2000)

2.2.2. Patogénesis de *Helicobacter pylori*

La colonización de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica está dada por los factores de patogenicidad y la capacidad de adaptarse al medio (Dunn & Cohen, 2000). La lesión inicia con la movilidad del microorganismo por medio de flagelos y su adhesión a receptores celulares de la mucosa a través de adhesinas; esta adherencia induce cambios en las señales de transducción que permite la infiltración de células inflamatorias (García, 2006).

Por otro lado, enzimas como las fosfolipasas actúan degradando componentes lipídicos de la mucosa; así mismo, las enzimas catalasa y superoxidasa dismutasa protegen al microorganismo de los productos oxidativos provenientes de células como macrófagos y neutrófilos (Piñol, 2011). El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno muy similar al antígeno de Lewis presente en las células del hospedador, por lo tanto actúa mediante mimetismo molecular, evadiendo de esta manera la respuesta inmune durante la colonización (Espino, 2010).

Al alcanzar la luz de la mucosa gástrica, el microorganismo comienza a secretar la enzima ureasa que junto con el níquel, que actúa como cofactor hidroliza la urea gástrica produciendo amonio, lo que promueve el cambio de medio ácido a medio alcalino, que favorece el desarrollo y la supervivencia del microorganismo (Torres, 2008).

Una vez que el ambiente adecuado para su crecimiento ha sido creado, *Helicobacter pylori* inicia la secreción de citotoxinas, descritas como principal mecanismo de lesión (Martinez, et al, 2014). La citotoxina cagA interacciona con las células epiteliales de la mucosa, promoviendo el reordenamiento de su citoesqueleto, que se manifiesta en cambios morfológicos denominados *humming-bird*, cuya característica fenotípica es similar a una estrella de cinco puntas (Sgouras, Thi, Trang, & Yamaoka, 2015).

De igual manera, la citotoxina VacA también se une a las células del epitelio gástrico, creando canales de membrana que al ser endocitados forman vesículas en el interior de la célula. La formación de estos canales permite el paso de iones cloro, bicarbonato y de urea, mismos que se acumulan en las vesículas potenciando la acción de las bombas de hidrógeno como la ATPasa V, que promueven un influjo indiscriminado de agua, lo cual finalmente causa la formación de la vacuola. Las vacuolas afectan la integridad de las células del epitelio gástrico e impiden la degradación de ligandos exógenos. Además, la citotoxina VacA se une a la membrana interna de las mitocondrias, afectando la polarización de la membrana y promoviendo la liberación del citocromo c que a su vez, desencadena la cascada pro-apoptótica de la caspasa III, causando daño irreversible en el tejido como se muestra en la **Figura 2** (Torres, 2008).

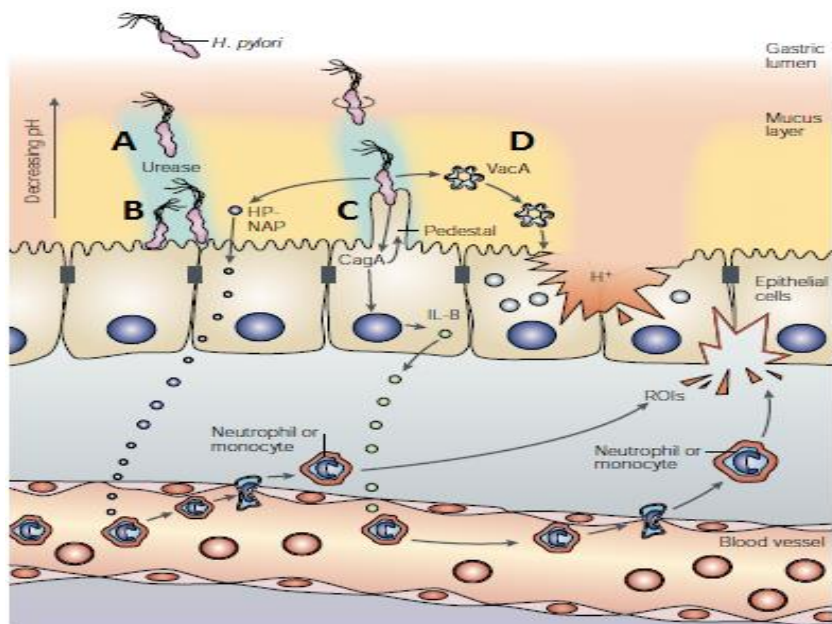


Figura 2. Representación esquemática de la mucosa estomacal colonizada por *Helicobacter pylori*.

A) Durante la infección, la bacteria ingresa a la luz gástrica donde la ureasa permite la supervivencia en el ambiente ácido produciendo moléculas de amoníaco que tamponan el pH citosólico. B) Los flagelos propulsan a la bacteria hacia la capa de moco y le permiten alcanzar el dominio apical de las células epiteliales gástricas, al cual se adhieren usando adhesinas especializadas. C) Luego inyecta la proteína cagA en las células huésped mediante un sistema de secreción de tipo IV y libera otros factores tóxicos. D) La secreción de la proteína vacA induce alteraciones de las uniones estrechas y la formación de grandes vacuolas. **Fuente:** (Torres, 2008).

2.2.3. Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

a. Ureasa

La enzima ureasa que posee *Helicobacter pylori*, cataliza la hidrólisis de la urea del jugo gástrico, formando bicarbonato y amonio. El bicarbonato aumenta el pH alrededor de la bacteria, protegiéndola del medio ácido. El amonio produce daño celular generando el ión hidroxilo por el equilibrio del mismo con el agua desdoblando el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual el microorganismo puede desplazarse fácilmente entre los espacios intercelulares (Trujillo, Martínez, & Bravo, 2014). Al licuar el moco gástrico se pierde la protección de gradiente de bicarbonato y las células G de la mucosa detectan un pH neutro lo que provoca que se secrete más gastrina para estimular la producción de ácido (Moreno, 2009).

La enzima ureasa posee un peso molecular de 550kDa y se localiza en el citosol de este microorganismo. Su síntesis está regulada por siete genes contiguos; los dos primero, *ureA* y *ureB* codifican subunidades de 26,5 kDa y 60,3 kDa respectivamente. Los genes *ureC*,

ureD, *ureE*, *ureF* y *ureG* son considerados genes accesorios (Rivas-Traverso, & Hernandez, 2000).

b. Factores de adherencia

La colonización de la bacteria está dada por su capacidad de adherirse al epitelio mediante la interacción con receptores del hospedero (proteínas de la matriz extracelular). La adherencia de la bacteria a los receptores de las células del huésped induce cambios celulares que se caracterizan por la pérdida de microvellosidades del epitelio (Montecucco & Rappuoli, 2001). Además se da una señal de transducción que permite la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y monocitos (García 2012).

La unión es mediada por varias proteínas y glicolípidos, entre ellos se encuentran adhesinas como BabA, SabA, AlpA, AlpB, Hopo, HpA. La adhesina BabA es una proteína de membrana externa (OMP) con un peso aproximadamente de 78kDa, codificada por los genes *babA1* y *babA2* de los cuales solo el gen *babA2* es funcional ya que posee el codón de iniciación ausente en el gen *babA1* (Torres, 2008). BabA interactúa con los antígenos de Lewis B presentes en el epitelio gástrico facilitando la adhesión a las células; sin embargo esta adhesión es dependiente del grupo sanguíneo del hospedero debido a que la afinidad es únicamente con el antígeno de Lewis B (García 2006). Entre otros factores de adherencia que presenta *Helicobacter pylori* está la fosfatidil etanol amina y la N-acetil neuraminil lactosa (González, 2002).

c. Citotoxina vacuolizante (vacA)

La citotoxina vacA es un factor de virulencia de secreción con un peso aproximado de 140kDa, sintetizada como una protoxina. Está conformada por un péptido señal, el cual permite el paso de la proteína a través de la membrana interna, la toxina madura que presenta un peso de 87kDa y un fragmento que es escindido proteolíticamente (López et al., 2009).

Esta citotoxina forma vacuolas al interactuar con las células epiteliales gástricas. La formación de ésta vacuolas altera las funciones normales de la vía endocítica ya que al crear poros en las membranas permite la salida de aniones y urea. Además VacA promueve la apoptosis a través de la activación de la cascada pro-apóptica de la caspasa III (Gonzalez et al., 2011).

Por otro lado, al atravesar la barrera epitelial interactúa con otros linajes celulares, con lo cual afecta a diversos procesos de activación del sistema inmune, específicamente a la inhibición de la maduración de los fagosomas en los macrófagos, la inhibición selectiva de la presentación de los antígenos a las células T y el boqueo de la proliferación de dichas células (Medina et al., 2008).

– **Variantes génicas de *vacA***

El gen polimórfico *vacA* que codifica para esta citotoxina está presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, sin embargo, algunas de estas difieren considerablemente en la producción de la citotoxina vacuolizante (López et al., 2009). Esta variación es atribuida a la mutación de la estructura del gen *vacA*. La variabilidad se encuentra en las tres regiones del gen, la primera en el extremo 5`del gen que codifica para el péptido señal (variantes *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2*), la segunda en la región media del mismo (alelos *m1a*, *m1b* y *m2*) y una tercera localizada entre las dos anteriores conocida como la región intermedia (*i1*, *i2*, *i3*) como se puede observar en la **Figura 3** (Jones, Whitmire, & Merrell, 2010).

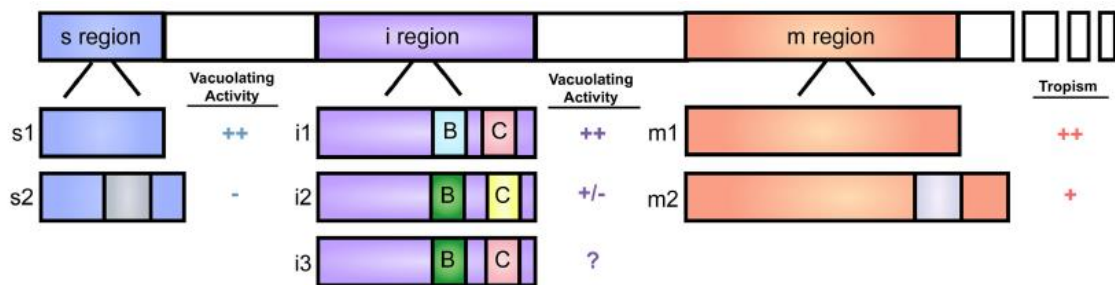


Figura 3. Representación esquemática de las regiones del gen *vacA* y sus polimorfismos.

Fuente:(Jones et al., 2010)

El alelo *s1* es completamente activo, mientras que el *s2* tiene un extremo amino corto que bloquea la formación de vacuolas y disminuye la formación de poros en las membranas eucariotas. De igual manera el alelo tipo *m2* se distingue del *m1* por la inserción de un fragmento de ADN, lo que indica que surgió a causa de una transposición, y esta variante resulta no tóxica para las células (Yamaoka & Graham, 2014).

Por ello se ha revelado que el genotipo *s1/m1* causa mayor daño celular que el genotipo *s1/m2*, mientras que los genotipos *s2/m2* y el *s2/m1* no resultan tóxicos. El genotipo *s1/m1* se ha reportado como el de mayor citotoxicidad y por ende se asocia con la prevalencia de

úlceras pépticas y cáncer gástrico (Saeidi & Sheikhshahrokh, 2016). La prevalencia de los alelos *m1* y *m2* varía según la región geográfica, siendo el genotipo *m1* más frecuente en América del Sur, Portugal y Japón (Torres, 2008). Además se ha reportado el hallazgo de cepas con alelos híbridos de *m1* y *m2* en infecciones múltiples con *Helicobacter pylori* (Bravata et al., 2012). No se ha encontrado asociación entre la región *i* y una mayor citotoxicidad por ello no se reportan la correlación con úlcera o cáncer gástrico (Ogiwara et al., 2008).

d. Proteína codificada por el gen A asociado a la citotoxina (cagA)

La proteína CagA posee un peso de 120 a 145 kDa y está localizada en el extremo 3' del islote de patogenicidad (cagPAI). CagPAI contiene alrededor de 32 genes que codifican para un conjunto de proteínas que conforman un sistema de secreción tipo IV (T4SS), que introduce la proteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales (Anselmi et al., 2008). Una vez dentro de las células epiteliales la proteína CagA se mantiene próxima a la membrana citoplasmática y puede ser fosforilada por quinasas, induciendo una reorganización dinámica del citoesqueleto y la activación de varias vías de señalización que pueden afectar la transducción y transcripción de genes a nivel celular. Una de las vías de señalización genera la activación de proteínas-quinasas de actividad mitógena (MAP) que modulan la expresión de citocinas pro-inflamatorias, la infiltración de células inmunes, el daño en las uniones célula-célula, el cambio en la polaridad y la permeabilidad de la célula epitelial (Hatakeyama & Higashi, 2005)

2.2.4. Distribución Geográfica de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria distribuida mundialmente y considerada una de las causas más frecuentes de infección crónica en la mucosa gástrica, siendo así un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Mentis, Lehours, & Francis, 2015).

Alrededor del 50% de la población a nivel mundial está infectada con *Helicobacter pylori*, la adquisición de la infección es más común en países en vías de desarrollo que en países desarrollados (Porrás et al., 2013). Se ha relacionado la infección por este microorganismo a factores socioeconómicos, así como también a condiciones de salud y vivienda (Latorre,

2008). También se ha descrito que fumar, ingerir alcohol y consumir medicamentos antiinflamatorios no esteroideos son factores de riesgo para el desarrollo de la infección por este microorganismo

2.2.5. Transmisión de *Helicobacter pylori*

Se ha descrito que la transmisión de *Helicobacter pylori* se puede dar por tres rutas:

- Transmisión oral-oral que se refiere al contagio debido a que la persona que presenta la infección genera reflujo gástrico, por el cual el microorganismo migra hacia la boca y la transmisión se da por la saliva hacia otra persona (Leja, Axon, & Brenner, 2016).
- Transmisión fecal-oral se produce por la ingesta del microorganismo en alimentos o bebidas contaminadas con heces que contienen el microorganismo (Osaki et al., 2017).
- Transmisión Iatrogénica: A través de materiales que han estado en contacto con la mucosa gástrica de personas con *Helicobacter pylori*, que después se han puesto en contacto con otra persona (Cava, 2003).

2.3. Enfermedades asociadas a *Helicobacter pylori*

2.3.1. Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10

En la Clasificación Internacional de Enfermedades CIE-10 se establece la codificación de los diagnósticos y procedimientos clínicos. Las enfermedades del aparato digestivo se clasifican en el capítulo 11, entre las categorías K00- K95; siendo así que K29 corresponde a la subclasificación de Gastritis y Duodenitis como se indica en la **Tabla 2**. Además en esta clasificación se incluyen enfermedades gastrointestinales como úlcera gástrica (K25), úlcera duodenal (K26), úlcera péptica (K27).

Tabla 2. Clasificación de las gastritis de acuerdo al CIE-10

K29. Gastritis y Duodenitis	
K29.0	Gastritis aguda hemorrágica
K29.1	Otras gastritis agudas
K29.2	Gastritis Alcohólica
K29.3	Gastritis crónica superficial
K29.4	Gastritis crónica atrófica

K29.5	Gastritis crónica, no especificada
K29.6	Otras gastritis
K29.7	Gastritis, no especificada
K29.8	Duodenitis
K29.9	Gastroduodenitis, no especificada

Nota: Tomado de (Sugano et al., 2015), modificado por Daniela Núñez

La clasificación se ha realizado en base a la etiología y el fenotipo de la enfermedad, por ello no se ha incluido a la gastritis causada por *Helicobacter pylori* dentro de esta sección, a pesar del ser el principal agente causante de esta enfermedad y el más relevante clínicamente debido a su papel predisponente de complicaciones gastroduodenales graves (Sugano et al., 2015).

2.3.2. Gastritis (K29)

Es una enfermedad inflamatoria de la mucosa gástrica producida por factores exógenos y endógenos que produce síntomas dispépticos, capaz de desarrollar desde atrofia leve en el tejido hasta adenocarcinoma (Kayaçetin & Güreşçi, 2014). Está muy relacionada con la infección por *Helicobacter pylori* que se adquiere en la infancia dando lugar a una gastritis aguda que cursa con hipoclorhidria y un periodo transitorio de síntomas dispépticos. Después de un intervalo de semanas se desarrolla una gastritis crónica caracterizada por presentar un infiltrado con linfocitos, células plasmáticas o ambas (Gisbert, 2015).

a. Clasificación de la gastritis

Según Valdivia (2011) existen diversas clasificaciones de la gastritis, basada en criterios clínicos, factores etiológicos, endoscópicos o patológicos. Entre las clasificaciones actuales se encuentran:

- Clasificación anatomopatológica basada en su presentación, prevalencia y etiología.
- Clasificación actualizada de Sydney basada en hallazgos endoscópicos, histológicos, etiológicos, topográficos y grado de daño (Valdivia, 2011; Boluda, 2015).
- Clasificación basada en criterios etiológicos, endoscópicos y patológicos.

Para fines de este estudio se ha tomado la “Clasificación actualizada de Sydney”, la cual se menciona en la **Tabla 3**. Donde se correlaciona el aspecto endoscópico topográfico del

estómago, con una división histológica de tipo topológico, sumando a esta la etiología y el grado de daño morfológico (Boluda, 2015).

Tabla 3. Clasificación actualizada de Sydney basada en hallazgos endoscópicos, histológicos, etiológicos, topográficos y grado de daño

Tipo de Gastritis	Etiología	Otras denominaciones
Gastritis no atrófica	<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis crónica superficial Gastritis antral difusa Gastritis antral crónica Gastritis intersticial-folicular Gastritis hipersecretora Gastritis tipo B
<hr/>		
Gastritis atrófica		
Autoinmune	Autoinmunidad	Gastritis tipo A Gastritis corporal difusa Asociada a anemia perniciosa
Atrófica multifocal	<i>Helicobacter pylori</i> Factores ambientales	Gastritis tipo B, tipo AB Gastritis ambiental Gastritis metaplásica

Nota: Tomado de (Boluda, 2015), modificado por Daniela Núñez

2.3.3. Úlcera péptica (K27)

Se considera una lesión de la mucosa del tubo digestivo localizada en el estómago (úlceras gástricas) o la primera porción del duodeno (úlceras duodenales), donde se pierda la integridad del epitelio (Watari et al., 2014). El síntoma más común de la úlcera péptica es el ardor o sensación de quemazón en el epigastrio, que ocurre cuando el estómago está vacío, entre comidas (Sgouras et al., 2015). Estudios epidemiológicos han revelado una asociación muy fuerte entre la infección por *Helicobacter pylori* y la presencia de úlceras duodenales y gástricas, debido a que la erradicación del microorganismo resultó en la cura permanente de las úlceras. Sin embargo se describe que la causa principal de las úlceras es el consumo de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (Malfertheiner, Chan, & Mccoll, 2017).

2.3.4. Adenocarcinoma gástrico

El adenocarcinoma representa entre el 90 y 95% de cánceres gástricos. Es originado en las células que forman la capa más interna del estómago. Los cánceres de estómago tienden a desarrollarse lentamente en un período de muchos años. Antes de que se forme un verdadero cáncer, a menudo ocurren distintos grados de lesión gástrica en el revestimiento interno del estómago. El principal agente etiológico es *Helicobacter pylori* que está designado como

un microorganismo cancerígeno tipo I y está asociado también con el desarrollo de linfoma de estómago (Bae & Kim, 2016).

a. Grados de lesión gástrica

El cáncer gástrico esta precedido de una serie de etapas en las cuales se van dando cambios morfológicos y funcionales del tejido como se explica en la **Tabla 4** (Sipponen & Maaros, 2017).

Tabla 4. *Modelo secuencial de lesión gástrica que precede al cáncer*

ESTADÍO	CARACTERISTICAS
Mucosa gástrica normal	Mucosa gástrica que no presenta ninguna señal de inflamación.
Gastritis no atrófica	Caracterizado por la infiltración de polimorfos nucleares y células mononucleares, predominantemente linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia.
Atrofia gástrica multifocal	Se caracteriza por la retracción o desaparición completa de las unidades glandulares, reemplazada por expansión fibrótica de la lámina propia.
Metaplasia Intestinal Completa	Se caracteriza por la presencia de células caliciformes maduras, alternando con enterocitos que presentan un borde de cepillo bien desarrollado (microvellosidades). Se pueden observar células de Paneth, usualmente en el fondo de las glándulas.
Metaplasia Intestinal Incompleta	Se caracteriza por la presencia de células mucosas columnares y caliciformes en diversas etapas de diferenciación que muestran vacuolas mucosas de diferentes tamaños, y por ausencia de células absorbentes.

Displasia	Grado leve: Caracterizada por estructuras glandulares tubulares aglomeradas alineadas por células columnares con núcleos pseudoestratificados hipercromáticos que mantienen la polaridad basal. Se ven unas cuantas células caliciformes. Grado Severo: Caracterizada por la irregularidad glandular Estructuras con plegamiento intraluminal formando papilas. El epitelio displásico muestra grandes núcleos irregulares con pérdida de polaridad.
Adenocarcinoma	Caracterizada por células epiteliales malignas dispuestas en estructuras tubulares irregulares que se infiltran en el estroma.

Nota: Tomado de (Sipponen & Maaros, 2017; Rugge, et al., 2017; Correa & Piazuelo, 2013), modificado por Daniela Núñez

2.4. Métodos diagnóstico de *Helicobacter pylori*

2.4.1. Métodos directos

a. Prueba rápida de ureasa

La prueba rápida de la ureasa es una técnica cualitativa que determina la actividad de la enzima ureasa en una muestra de mucosa gástrica (Keeken, Hattum, & Boer, 2006). La técnica se realiza colocando la pieza de biopsia en un tubo con urea que además contiene un indicador de cambio de pH; si la muestra presenta actividad ureásica, se hidroliza la urea y se forman iones de amonio, los cuales aumentan el pH de la solución, produciendo el cambio de color. Es considerada una prueba de alta sensibilidad (90- 95% en biopsia) (Monteiro et al., 2001).

b. Cultivo

El cultivo se realiza directamente de la biopsia gástrica en un lapso no mayor a 5 horas después de la toma de la muestra y el transporte se debe realizar en condiciones de 4-8 °C. La siembra se procede en agar Columbia suplementado con sangre de cordero o caballo al 7% además de antimicrobianos como vancomicina, anfotericina B, trimetoprima y cefsulodina que impiden el desarrollo de carga microbiana acompañante (Pardo-Sandoval, 2010), bajo condiciones microaerófilas: O₂, 5%; CO₂, 10%; y N₂, 85%; durante 7-14 días de incubación a 37°C (Me & Lehours, 2007). Adicionalmente se puede realizar pruebas de oxidasa, catalasa y urea que deben ser positivas características de *Helicobacter pylori*. (Bayona-Rojas et al., 2013). La ventaja de este método diagnóstico es que además de permitir tipificar el microorganismo permite determinar la sensibilidad frente a los agentes antibacterianos mediante un antibiograma (Suárez et al., 2005).

c. Histología

La histología determina la presencia del microorganismo mediante la utilización de coloraciones como hematoxilina-eosina, Warthin-Starry con nitrato de plata como se observa en la **Figura 4** o Giemsa, en las cuales se observa la forma espiral de *Helicobacter pylori*. Además ésta prueba informa sobre el nivel de daño hístico con la visualización de cambios morfológicos de la mucosa gástrica y la presencia de polimorfonucleares. La técnica presenta desventajas debido a que el resultado está sujeto al criterio y la experiencia del patólogo y al tipo de tinción que se utilice (Derakhshan et al., 2006).

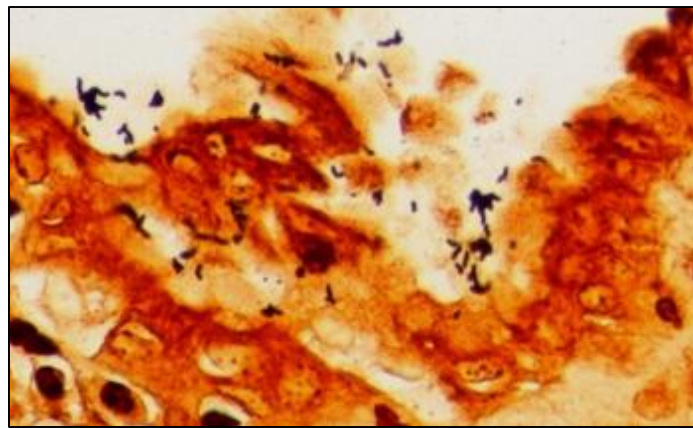


Figura 4. Tinción de Wathin-Starry en la que se observan estructuras bacilares incurvadas en el epitelio de superficie.

Fuente:(Carabaño et al., 2012)

d. Pruebas Moleculares

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es posible detectar ADN de *Helicobacter pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas o de cultivos puros y amplificar genes como: el gen *ureA* que codifica para la subunidad A de la enzima ureasa, el gen *glmM* que codifica para una fosfoglucosamina mutasa, el gen *flaA2* que codifica para la flagelina, los mismos que han sido considerados para la detección por estar presentes en todas las cepas y secuencias altamente conservadas del gen que codifica para el ácido ribonucleico de la subunidad 16S del ribosoma (ARNr 16S) (González, Millán, Tiziana, 2004). También se puede detectar genes de factores de patogenia específicos de *Helicobacter pylori* como *cagA* y *vacA* (Carmen & Aguilar, 2014).

La técnica suele presentar inconvenientes cuando se realiza de la biopsia, por la presencia en la muestra de restos de tejido gástrico, lípidos u otros componentes que inhiben la reacción de la PCR (Díaz & Rentería, 2010).

También se puede realizar la técnica de secuenciación por el método de Sanger, la cual permite determinar mutaciones en la secuencia de ADN de *Helicobacter pylori* para el análisis de polimorfismos de los genes que presenta la bacteria como en el gen *vacA* con su región de señal “s” y su región media “m”. Estas técnicas se utilizan principalmente para investigación, más no para diagnóstico debido a su alto costo.

2.4.2. Métodos indirectos

a. Prueba de aliento

La prueba del aliento se basa en la actividad de la ureasa de *Helicobacter pylori*, utilizando una urea marcada. La prueba consiste en hacerle ingerir al paciente una suspensión de urea marcada con C^{13} o C^{14} ; durante la digestión ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento. La cantidad de CO_2 marcado que se exhala es directamente proporcional a la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *Helicobacter pylori* (Barriga et al. 2004). Esta prueba tiene una muy alta sensibilidad y especificidad pues indica una infección aguda con el microorganismo (Bermúdez, Domínguez, Torres, 2008).

b. Detección de Anticuerpos

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos de tipo IgG o IgA contra antígenos específicos del microorganismo. Las técnicas más empleadas para la detección de anticuerpos son el ensayo inmunoenzimático de enzima ligada (ELISA), aglutinación en látex e inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting) (Maya, 2007).

Los inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa como el Western Blot, son muy útiles para evaluar la respuesta inmune contra antígenos específicos, como *VacA* y *CagA*, lo que permite establecer relaciones entre el desarrollo de patologías más severas y la presencia de determinados antígenos de *Helicobacter pylori* (Suriani et al., 2008). La limitación principal

de estas pruebas es la incapacidad de diferenciar entre la infección activa y una infección previa, debido a la persistencia de anticuerpos (She, Wilson, & Litwin, 2009).

2.5. Tratamiento para la Infección por *Helicobacter pylori*

Varias estrategias terapéuticas se han planteado para el tratamiento de las infecciones causadas por *Helicobacter pylori*. La terapia tradicional triple es el tratamiento de primera línea e incluye la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) junto con dos antibióticos como la claritromicina más amoxicilina o metronidazol (Rodríguez, 2011). En el tratamiento de segunda línea se presenta la terapia cuádruple y la terapia triple con levofloxacino. Sin embargo se están buscando otras opciones terapéuticas debido a que el porcentaje de erradicación ha disminuido por debajo del 80%, debido a la alta resistencia que está presentando este microorganismo (Gisbert, 2016). En la **Tabla 5** se presentan las nuevas combinaciones para potenciar el efecto ante la infección por *Helicobacter pylori*.

Tabla 5. Estrategias terapéuticas ante la infección con *Helicobacter pylori*.

Tratamiento	Descripción
Terapia Triple Estándar	IBP/12h + claritromicina (500mg)/ 12h + amoxicilina (1000mg)/12h o metronidazol (500mg)/12h durante 10 a 14 días.
Tratamiento cuádruple	IBP/ 12h + metronidazol (500mg)/8h + tetraciclina 500mg/6h + subcitrate de bismuto (120mg)/6h durante 10 a 14 días.
Tratamiento secuencial	IBP/12h + amoxicilina (100mg)/12h durante 5 días seguido de IBP/12h + claritromicina (500mg)/12h + metronidazol (500mg)/12h durante 5 días.
Tratamiento concomitante	IBP/12h + amoxicilina (1000mg)/ 12h, claritromicina (500mg)/12h + metronidazol (500mg)/12h durante 10 días.

Nota: Tomada de (Sánchez-Delgado, 2013), modificado por Daniela Núñez

2.5.1. Resistencia antibiótica en *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ha desarrollado varios mecanismos de resistencia frente a los antibióticos utilizados en el tratamiento. Entre los mecanismos que se describen está la presencia de mutaciones puntuales en el gen del ARNr 23S que causa una disminución de la capacidad de unión de la claritromicina al ribosoma, de modo que no se afecta la síntesis proteica. Otro mecanismo es la adquisición del gen de la β -lactamasa, el cual le da resistencia a la amoxicilina (Vellejos et al., 2003).

El aumento de resistencia al tratamiento determina una mayor supervivencia del microorganismo en el huésped y por ende expresión persistente de los factores de patogenicidad los cuales determinan la severidad de la lesión (Ranjbar, Khamesipour, Jonaidi-Jafari, & Rahimi, 2016).

2.6. MARCO CONCEPTUAL

Antibióticos de Primera Línea.- Son los antibióticos usados como primera opción terapéutica cuando se trata ciertas enfermedades ya que se conoce que el microorganismo a ser eliminado es susceptible (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Consenso de Maastricht.- Documento realizado por varias organizaciones de salud en la cual se sintetiza toda la información recogida hasta el momento a favor de la erradicación de *Helicobacter pylori* (Malfertheiner et al., 2012).

Dispepsia.- Es la presencia de molestia o dolor en el epigastrio que se manifiesta con las comidas, acompañado de hinchazón, pesadez o náuseas (Hernando, Franke, Singer, & Harder, 2007).

Displasia.- Es la anormalidad en la maduración de las células dentro de un tejido, y consiste, generalmente en un crecimiento de células inmaduras, con una disminución correspondiente del número y de la localización de células maduras (Sipponen & Maaros, 2017).

Factores de virulencia.- Son moléculas o sustancias producidas por un microorganismo que le permite entrar a un organismo, invadir los tejidos y provocar enfermedad (Murray, 2013).

Gen *cagA*.- Gen que codifica la proteína CagA de *Helicobacter pylori*, relacionada con altos grados de inflamación de la mucosa gástrica, gastritis severa, y cáncer gástrico (Hatakeyama & Higashi, 2005).

Gen *vacA*.- Gen que codifica preséntela proteína VacA en *Helicobacter pylori*, responsable de la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas que induce cambios fisiológicos de las mismas (López et al., 2009).

Metaplasia.- Es el cambio reversible en el cual una célula de tipo adulto (epitelial o mesenquimatoso) es sustituida por otro tipo de célula adulta (Sipponen & Maaros, 2017).

Microaerofílico.- Es la característica de los microorganismos que requieren oxígeno para su crecimiento, pero a una concentración inferior a la que se encuentra en la atmósfera (Bayona-Rojas et al., 2013).

Mitogénico.- Son factor o sustancia que actúan como estimulante celular promoviendo la maduración, y proliferación celular (Henry, 2012).

Reacción en cadena de la polimerasa.- Técnica que consiste en la amplificación controlada de un fragmento de ADN específico de manera sintética en un laboratorio (Díaz & Rentería, 2010).

Resistencia Antibiótica.- Es la capacidad que tiene un microorganismo para resistir ante la acción de un fármaco o medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Secuenciación.- Conjunto de técnicas y métodos bioquímicos que permiten determinar el orden en que los nucleótidos deben colocarse para generar eficientemente un fragmento de ADN (Díaz & Rentería, 2010).

Variación génica.- Hace referencia a cambios en la secuencia genética que sufre una población o especie debido a múltiples factores como selección natural, mutación y recombinación (Jimenez et al., 2000).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Diseño del Estudio

3.1.1. Tipo de Estudio

Estudio de tipo observacional debido a que no hay intervención por parte del investigador, descriptivo porque no existe grupo comparable y transversal puesto que se realizó en un periodo de tiempo establecido (Septiembre 2016-Febrero 2017).

3.1.2. Tipo de Muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia debido a que participaron los pacientes que se realizaron endoscopías en el servicio de Gastroenterología y cumplieron los criterios de inclusión en el periodo de tiempo establecido.

3.1.3. Tamaño de Muestra

Para el análisis del tamaño de muestra se utilizó la fórmula de población finita:

$$n = \frac{N[Z_{(\alpha)}]^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + [Z_{(\alpha)}]^2 * p * q}$$

Dónde:

n= tamaño de la muestra

N= Población que fue atendida en el Servicio de Gastroenterología del HFFAA en el año 2015.

Error alfa (α): 0,05

Nivel de confianza (1- α): 0,95

Z (α): 1,96

p: Prevalencia de *Helicobacter pylori* según estudio de realizado en América Latina en el año 2013, el cual corresponde al 79.4% (Porrás et al., 2013)

d: la precisión del estudio correspondiente al 5% (0.05)

$$n = \frac{2473 [1,96]^2 * 0,79 * 0,21}{0,05^2 * (2473 - 1) + [1,96]^2 * 0,79 * 0,21}$$

$$n = \frac{88 (3.8416) * 0,42 * 0,58}{0,0025 * (87) + (3.8416) * 0,42 * 0,58}$$

$$n = \frac{338,0608 * 0,2436}{0,2175 + 3.8416 * 0,2436}$$

$$n = \frac{1576,0959}{6.8173}$$

$$n = 231 \text{ biopsias gástricas}$$

3.1.4. Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores a 18 años que estén de acuerdo con participar en el estudio firmando el consentimiento informado.
- Pacientes que hayan sido sometidos a endoscopia digestiva alta
- Pacientes que no tengan tratamiento antibiótico, ni inhibidor a la bomba de protones dos semanas previas a la toma de la muestra.

3.1.5. Criterios de Exclusión

- Pacientes que presenten hemorragia gástrica.
- Pacientes gastrectomizados
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado

3.1.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se ejecutó en el programa IBM SPSS Statistics vs.20 y se realizó la prueba de chi cuadrado para determinar si existe relación significativa entre la presencia de los genes *cagA* y *vacA*, y los grados de lesión gástrica. Para todos los análisis estadísticos se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0.05 (p<0.05).

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable dependiente: Grados de lesión gástrica de las enfermedades causadas por *Helicobacter pylori*

3.2.2 Variable independiente: gen *vacA*, gen *cagA*

Tabla 6. Operacionalización de variables

Variable Dependiente	Definición	Dimensión	Indicadores	Tipo de Variable	Escala	Instrumento de Medida
Lesión gástrica causada por <i>Helicobacter pylori</i>	Lesión del epitelio del estómago ocasionado por la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> (Correa.P, 2011)	Cualitativa	Grado de lesión	Ordinal	Observación	Historias clínicas de los pacientes
Variable Independiente	Definición	Dimensión	Indicadores	Tipo de Variable	Escala	Instrumento de Medida
Gen <i>vacA</i>	Gen presente en <i>Helicobacter pylori</i> responsable de la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas (Da Costa, Dos Santos Pereira, & Rabenhorst, 2015)	Cualitativa Dicotómica	Presencia /Ausencia del gen	Nominal	Técnicas moleculares	Formulario de registro de resultados
Gen <i>cagA</i>	Gen presente en <i>H pylori</i> cuya presencia se relaciona con altos grados de inflamación de la mucosa gástrica (Da Costa et al., 2015)	Cualitativa Dicotómica	Presencia/ Ausencia del gen	Nominal	Técnicas moleculares	Formulario de registro de resultados

Elaborado: Daniela Núñez

3.3. MATERIALES Y PROCESO

3.3.1. Materiales y Equipos

– **Cultivo Microbiológico**

- Anaerobar 2,5L Generation System; Marca: Oxoid
- Campygen 2,5L; Marca: Oxoid
- *Helicobacter pylori* Selective supplement (DENT)
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion); Marca: Oxoid
- Agar Columbia; Marca: Oxoid
- Agar Urea Base; Marca: Oxoid
- Cloruro de Sodio; Marca: Merck
- Cajas Monopetri; Marca: Gosselin
- Asas Desechables Azul 10uL; Marca: Copan
- Tubos cónicos de 15 mL; Marca: Santa Cruz Biotechnology
- Reactivo de Catalasa
- Discos de Oxidasa
- Hojas de Bisturí N° 21
- Incubadora; Marca: memmert

– **Pruebas Moleculares**

- Puntas desechables: 10ul, 100ul, 500ul, 1000ul
- Microtubos 2ml tapa rosca Marca Axygen
- SYBR Safe DNA gel stain Invitrogen
- Tubos para PCR 0,2ml tapa plana Marca Axygen
- Agarosa Marca Promega
- Ladder 100 pb Marca Promega
- Agua Molecular tipo I
- Taq Master Mix 1000 reacciones Marca Promega
- Primers de los genes *cagA* y *vacA*, *ureA* y *flaA2*
- Cámara electroforética
- Termociclador Labnet
- Fotodocumentador Biorad

— **Otros materiales**

- Cajas de almacenamiento para tubos de 1,5-2ml Marca Santa Cruz Biotechnology
- Mascarilla Marca Surgical
- Guantes de nitrilo talla S Marca Maxchamp
- Mechero
- Pinzas
- Portaobjetos

3.3.2. Procedimiento

a. Fase uno

– Autorización

La autorización que se indica en el **Anexo 1**, fue solicitada al Servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 para la obtención de muestras de biopsia gástrica de pacientes que se realizaron endoscopia.

– Recolección de biopsias gástricas

Las biopsias gástricas fueron tomadas de pacientes que se realizaron endoscopia alta, con y sin sedación, que aceptaron participar en el estudio firmando el consentimiento informado, el mismo que se indica en el **Anexo 2** y que cumplieron los criterios de inclusión.

La toma de la biopsia gástrica fue realizada por parte del personal médico del servicio. Las muestras se recolectaron en tubos cónicos con 2mL de solución salina estéril al 0,9%. Las muestras fueron rotuladas con la codificación establecida y transportadas inmediatamente en cadena de frío de 2 a 8 °C al laboratorio de Investigación de la PUCE para ser procesadas en un lapso de tiempo no mayor a 5 horas.

– Registro de la información clínica

Una vez recolectada la muestra, con el número de historia clínica de los pacientes se realizó el levantamiento de la información clínica. Se creó una base de datos donde se registró la edad, el género, el diagnóstico según el CIE-10, y el diagnóstico determinado por el médico del servicio en base a hallazgos endoscópicos. Además, se registró la información del

diagnóstico histológico reportado por el servicio de patología y el grado de lesión determinado como se observa en el **Anexo 3**.

b. Fase dos

– **Cultivo de cepas de *Helicobacter pylori***

Las muestras de biopsia gástrica se procesaron de la siguiente manera: la mitad de la biopsia fue almacenada a -80°C en solución salina al 0.9% para el procesamiento molecular, mientras que la otra mitad fue utilizada para el cultivo.

Las biopsias gástricas se cultivaron tras un proceso de maceramiento con la utilización de bisturís N°21. Se estrió en Agar Columbia con 10% de sangre de cordero y suplemento DENT (Vancomycin 5.0 mg Trimethoprim 2.5 mg Cefsulodin 2.5 mg Amphotericin B 2.5 mg), en un ambiente microaerofílico para lo cual se colocó en Anaerobar 2,5L Generation System (Oxoid) con Campygen 2,5L (Oxoid) a 37°C por 7 días (Bayona-Rojas et al., 2013).

Tras el tiempo de incubación se procedió a verificar el crecimiento de colonias de *Helicobacter pylori*; para la confirmación del género se realizó tinción Gram, pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa en tubo. Las cepas confirmadas como *Helicobacter pylori* se almacenaron en BHI suplementado con glicerol al 20% a -70°C.

– **Control de Calidad**

El control de calidad se llevó a cabo en la fase de recolección de la muestra, realizando pruebas de esterilidad al medio de transporte de la biopsia y controlando el pH para la correcta conservación de la muestra.

Se realizó control de calidad del medio de cultivo, agar Columbia, en el cual se evaluó las características físicas y químicas como se presenta en el **Anexo 4**.

c. Fase tres

Las pruebas moleculares se realizaron a partir de la biopsia gástrica directa, debido a que no hubo recuperación de las cepas almacenadas en BHI suplementado con glicerol al 20%.

– **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de *Helicobacter pylori* se llevó a cabo por la técnica de ebullición, la cual consistió en triturar la biopsia con un pistilo estéril. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, con el fin de precipitar los restos de tejido triturado y descartar la solución salina restante. Se añadió 500uL de TE 1X, con 10uL de proteinasa K, se incubó a 56°C por 1 hora. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se colocó en un microtubo de 1.5 mL, y se incubó a 70° C por 10 minutos. Se centrifugó nuevamente a 13500 rpm durante 10 minutos y el ADN (sobrenadante) se colocó en un nuevo microtubo. Finalmente se cuantificó el ADN, se realizó corridas electroforéticas a 75 voltios por 45 minutos en geles de agarosa al 2%, para asegurar que la concentración y la calidad del mismo sea la óptima, para su posterior conservación a -30°C.

– **Genotipificación de *Helicobacter pylori***

Mediante la técnica de PCR se determinó genes de *Helicobacter pylori*, para los cuales se utilizó primers específicos, alineados con el genoma de *Helicobacter pylori* 26695 con el programa MEGA v.5, para la amplificación de los genes *ureA* y *flaA2* como se detalla en la **Tabla 7**, genes conservados de *Helicobacter pylori*.

Tabla 7. Primers para la amplificación de genes conservados de *Helicobacter pylori*.

GEN	PRIMER	TAMAÑO pb
¹ <i>flaA2</i>	F 5'AGGGATTGGCGTGTTAGC 3'	504
	R 5'AAATTCACCGTGGTTTCTGC 3'	
² <i>ureA</i>	F 5'GCCAATGGTAAATTAGTT 3'	411
	R 5'CTCCTTAATTGTTTTTAC 3'	

Nota: Tomado de ¹(Madhi,et al., 2013; ²Smith, 2013), modificado por Daniela Núñez

La preparación de la Master Mix se detalla en la **Tabla 8**; y el programa de termociclado utilizado para la amplificación de estos genes se explica en la **Tabla 9**. Se realizó una corrida electroforética a 75 voltios por 60 minutos de los amplicones en geles de agarosa al 2% con buffer TAE 1X para su posterior visualización en el fotodocumentador.

Tabla 8. Preparación de Master Mix para los genes *ureA* y *flaA2*

REACTIVO	Genes conservados de <i>Helicobacter pylori</i>			
	<i>ureA</i>		<i>flaA2</i>	
	V(uL)	[]Final	V (uL)	[]Final

Taq	6,250	1x	6,250	1X
PF	0,500	0,4uM	0,500	0,4uM
PR	0,625	0,5uM	0,500	0,4uM
H ₂ O	4,125		4,250	
ADN	1	50ng/uL	1	50ng/uL
TOTAL	12,5 uL			

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez
*PF(Primer Forward) *PR(Primer Reverse) *V (Volumen) *[] (Concentración)

Tabla 9. Programa de termociclado para la amplificación de los genes *ureA*, *flaA2*, *vacA*, *cagA*

Fase	Gen			
	<i>Urea</i>	<i>flaA2</i>	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>
Desnaturalización (45s)	94 °C			
Hibridación (45s)	45°C	55°C	55°C	57°C
Extensión (45s)	74°C			
Ciclos	30 ciclos			
Extensión Final (10min)	74°C			

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

De igual manera para la amplificación de los genes de patogenicidad *cagA* y *vacA* se utilizó la técnica de PCR en todas las muestras de biopsia gástrica. Los primers utilizados para estos genes se describen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Primer utilizados para la amplificación de genes de patogenicidad *cagA* y *vacA* de *Helicobacter pylori*.

GEN	PRIMER	TAMAÑO pb
³ <i>cagA</i>	F 5'TGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA 3'	290
	R 5'AATAATCAACAAACATCACGCCAT 3'	
³ <i>vacA s1/s2</i>	F 5'ATGGAAATACAACAACACAC 3'	259/286
	R 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
³ <i>vacA m1/m2</i>	F 5'CAATCTGTCCAATCAAGCGAG 3'	567/642
	R 5'GCGTCTAAATAATTCCAAGG 3'	

Nota: Tomado de ³(Oktem et al.,2015), modificado por Daniela Núñez

La preparación de la Master Mix para la amplificación de estos genes se detalla en la **Tabla 11**; y el programa de termociclado utilizado para la amplificación es el anteriormente descrito en la **Tabla 9**. La corrida electroforética se realizó a 75 voltios por 60 minutos para la visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2%.

Tabla 11. Preparación de las Master Mix para los genes *vacA* y *cagA*

REACTIVO	Genes de patogenicidad de <i>Helicobacter pylori</i>					
	<i>cagA</i>		<i>vacA m1/m2</i>		<i>vacA s1/s2</i>	
	V (uL)	[]Final	V (uL)	[]Final	V (uL)	[]Final
Taq	6,25	1x	6,25	1x	6,3	1x

PF	0,50	0,4uM	0,50	0,4uM	1,0	0,8uM
PR	1,00	0,8uM	1,00	0,8uM	0,5	0,4uM
H ₂ O	3,75		3,75		3,8	
ADN	1	50ng/uL	1	50ng/uL	1	50ng/uL
TOTAL						12.5 uL

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

*PF(Primer Forward) *PR(Primer Reverse) *V (Volumen) *[] (Concentración)

– **Secuenciación de *Helicobacter pylori***

Los productos de PCR de amplificación de los genes *ureA* y *flaA2* fueron seleccionados para el estudio de variación génica. Se envió a purificar y secuenciar los amplicones de los genes *cagA* y *vacA* tanto la región región “m” como “s” empleando el servicio de la empresa Macrogen Inc Korea

Una vez obtenidos los resultados se ejecutó el análisis de las secuencias mediante el programa bioinformático MEGA v.5. Las secuencias consenso se obtuvieron tras el alineamiento y edición manual de las secuencias obtenidas en sentido y anti-sentido, mismas que posteriormente se compararon con la secuencia de *Helicobacter pylori* 26695 disponible en la base de genes GenBank utilizando la herramienta BLAST. La identidad de la secuencia fue evaluada tomando en consideración el porcentaje de identidad entre las secuencias.

– **Control de calidad**

Se utilizó como control positivo de amplificación la muestra n°#1 que dio una concentración de ADN óptima y además amplificó todos los genes en estudio; el control negativo de amplificación fue agua estéril. Se incluyó los controles positivo y negativo en cada corrida de electroforética.

d. Fase cuatro

– **Análisis de datos**

La información clínica de los pacientes incluidos en el estudio, el resultado microbiológico obtenido del cultivo y el resultado de la amplificación de los genes se organizó en una base de datos, para la posterior tabulación de los datos; los mismos que se representaron en tablas

y gráficos de frecuencias. En el análisis de las variantes génicas se consideró el cambio de nucleótidos que provocaron la traducción a una proteína diferente a la de la secuencia molde.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo incluyen las características generales de la población estudiada, el diagnóstico clínico de los pacientes del estudio, la identificación de la presencia del microorganismo por métodos microbiológicos y moleculares; la determinación de los genes de patogenicidad, las variaciones encontradas de los mismos y la relación que se presentó entre la expresión de los genes y las formas clínicas de la enfermedad.

4.1 Descripción general de la población incluida en el estudio

Durante el período de Septiembre 2016 a Febrero 2017 se recolectaron 231 biopsias gástricas en el servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N° 1, en pacientes que se realizaron endoscopías.

De los 231 pacientes que participaron en el estudio, 132 (57.1%) fueron de género masculino y 99 (42.9%) de género femenino, en edades comprendidas entre 18 a 85 años, siendo el rango de edad de mayor frecuencia de 53 a 69 años con el 44.1%, como lo indica el **Figura**

5.

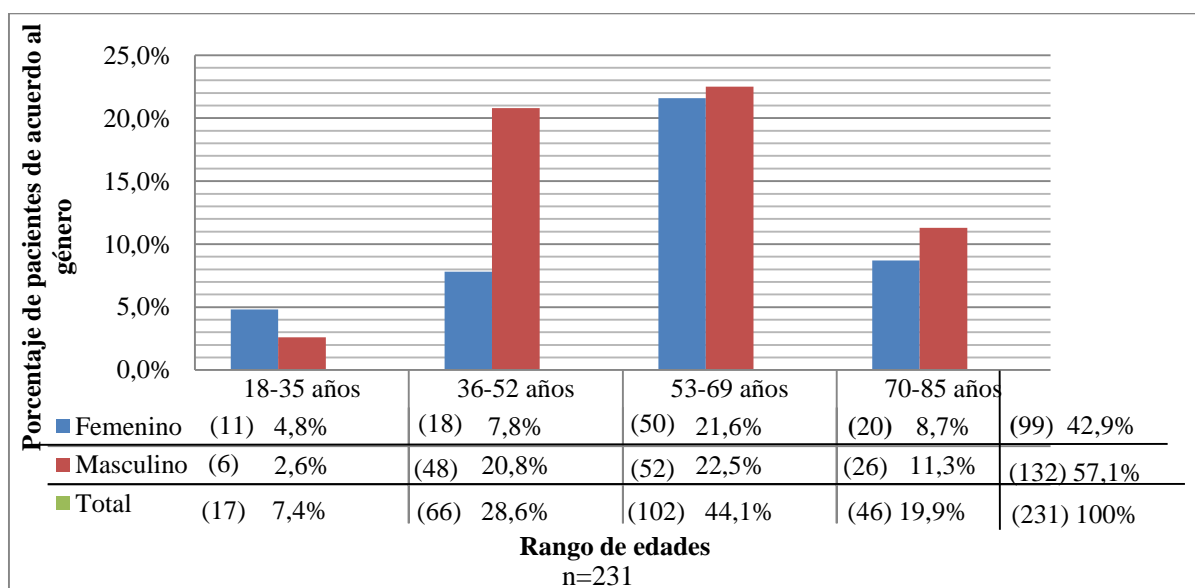


Figura 5. Representación del porcentaje de pacientes de acuerdo al género en relación con los rangos de edad establecido.

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

4.2. Resultado del diagnóstico clínico

La información clínica obtenida se presenta de la siguiente manera: el diagnóstico de acuerdo al CIE-10; el diagnóstico en base a los hallazgos endoscópicos y, el diagnóstico en base a los hallazgos histológicos.

El 68.4% del total de pacientes presentaron un diagnóstico de gastritis y duodenitis (K29 según la codificación del CIE-10), siendo este el diagnóstico más significativo, como se visualiza en el **Figura 6**. La categoría de exposición a factores de riesgo ocupacional, presentó la subclasificación de exposición ocupacional a otros factores (Z57.8), la misma que representa el 16% de los diagnósticos de acuerdo al CIE-10.

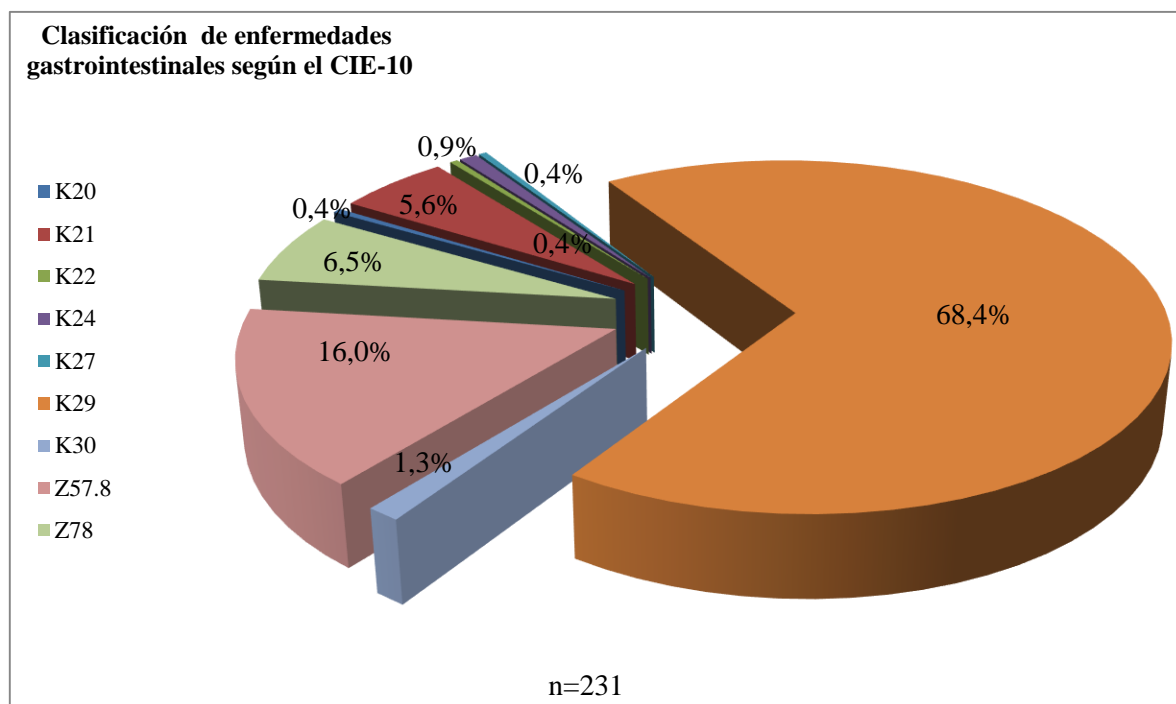


Figura 6. Porcentaje de pacientes diagnosticados con enfermedades gastrointestinales de acuerdo al CIE-10.

*K20 (Esofagitis) *K21 (Enfermedad del reflujo gastroesofágico) *K22 (Otras enfermedades del esófago) *K24 (Úlcera gástrica) *K27 (Úlcera péptica) *K29 (gastritis y duodenitis) *K30 (Dispepsia) *Z57.8 (Exposición ocupacional a otros factores) *Z78 (Chequeo prequirúrgico).

Fuente: Investigación *Elaborado:* Daniela Núñez

La categoría de K29 presentó subclasificaciones en el diagnóstico, de las cuales gastritis crónica atrófica (K29.4) presentó el 16.5%, seguida de gastritis crónica, no especificada (K29.5) con el 9.5%, sin embargo el mayor porcentaje (60.1%) no fue subclasificado como se puede observar en el **Figura 7**.

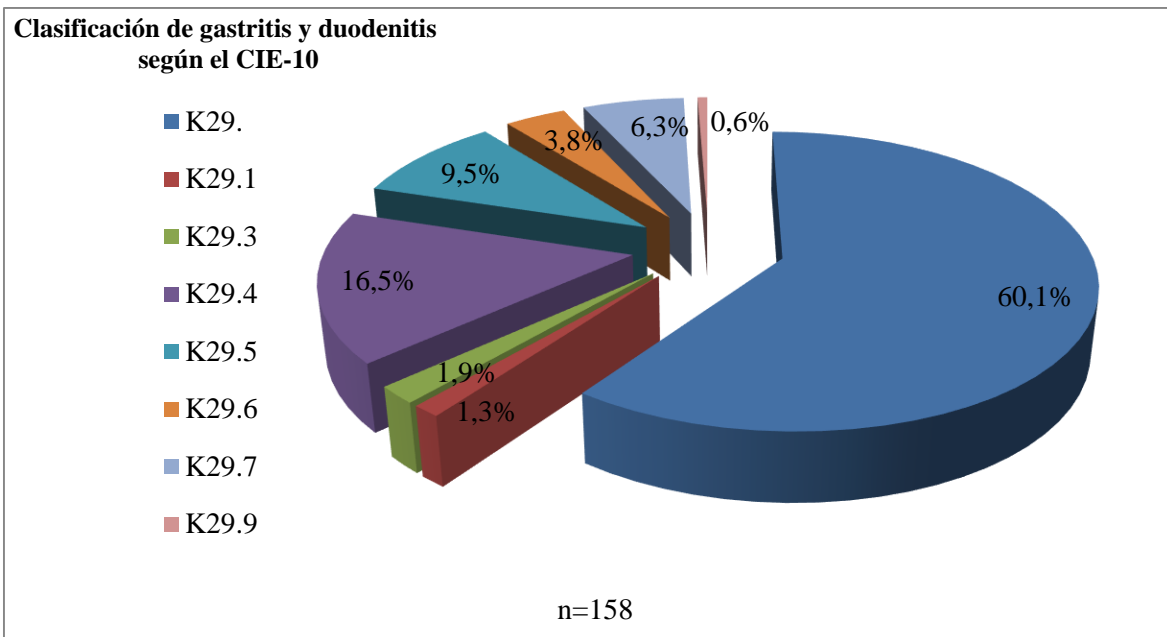


Figura 7. Porcentaje de pacientes diagnosticados con una subclasificación de gastritis y duodenitis de acuerdo al CIE-10.

*K29 (gastritis y duodenitis) *K29.1 (Otras gastritis agudas) *K29.3 (Gastritis crónica superficial) *K29.4 (Gastritis crónica atrófica) *K29.5 (Gastritis crónica, no especificada) *K29.6 (Otras gastritis) *K29.7 (Gastritis, no especificada) *K29.9 (Gastroduodenitis, no especificada)

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

El diagnóstico endoscópico fue analizado a partir de las historias clínicas, mostrando así que el 45.5% de pacientes presentó un diagnóstico de gastritis eritematosa en base a los hallazgos endoscópicos, el 30.3% de gastritis erosiva, mientras que el 23.4% corresponde a gastritis combinada por presentar ambos hallazgos endoscópicos (eritema, erosiones) y apenas el 0,9% presentó gastritis nodular, datos que se pueden observar en el **Figura 8**.

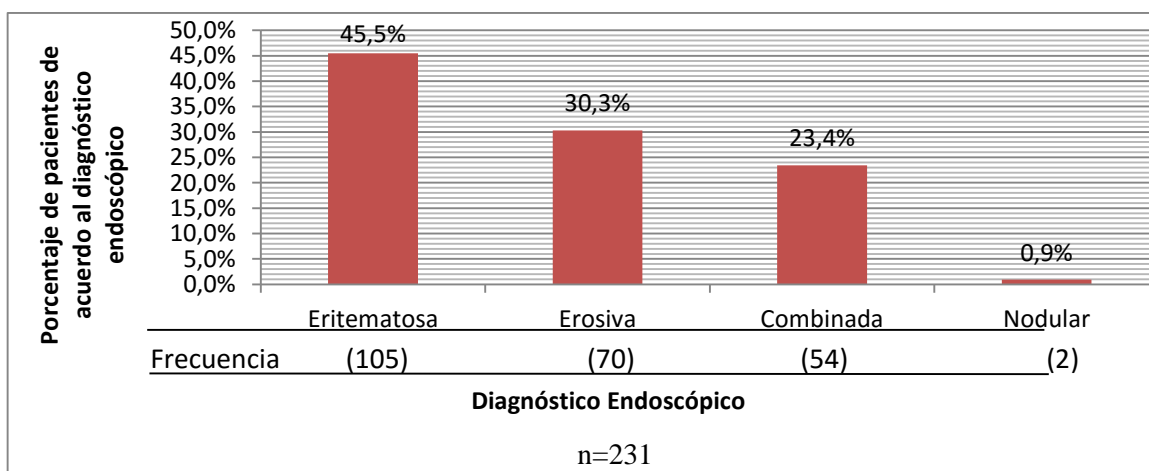


Figura 8. Porcentaje de pacientes con gastritis de acuerdo al diagnóstico endoscópico.

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

De igual manera el diagnóstico histopatológico fue obtenido de las historias clínicas, presentando 113 pacientes (48.9%) con gastritis no atrófica, en el cual sólo se consideró un grado de lesión, mientras que 118 pacientes (51.1%) presentaron el diagnóstico de gastritis atrófica, considerándose diferentes grados de lesión teniendo así, 53 casos (22.9%) con atrofia gástrica multifocal, 52 casos (22.5%) con metaplasia intestinal completa y 13 casos (5.6%) con metaplasia intestinal incompleta, información que se representa en el **Figura 9**.

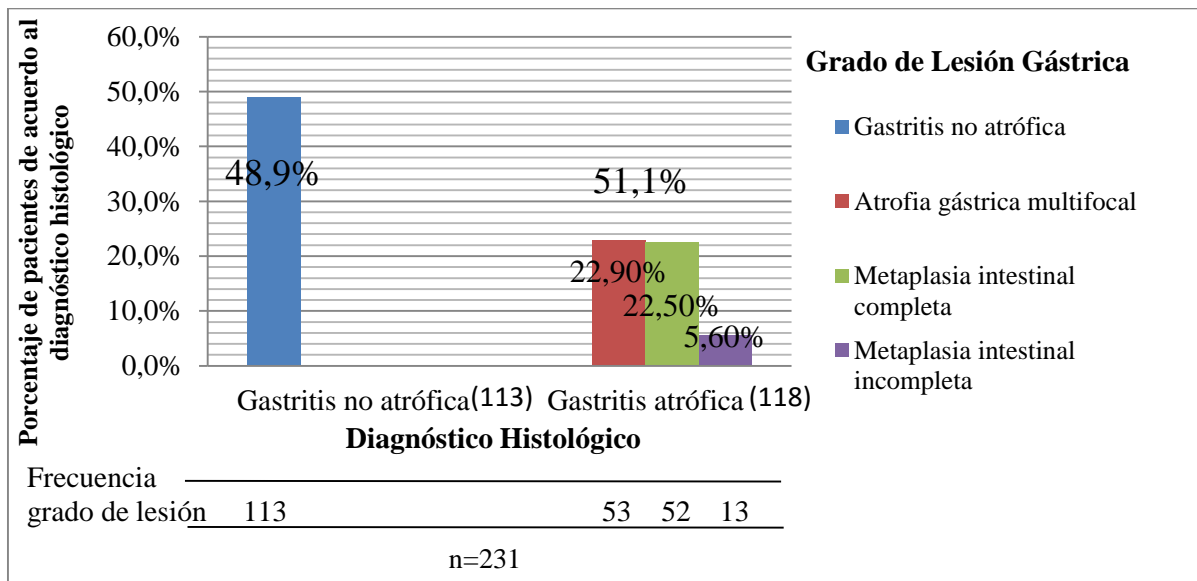


Figura 9. Representación gráfica del porcentaje de pacientes de acuerdo al diagnóstico histológico en relación con el grado de lesión.

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

4.3. Resultados microbiológicos

Las 231 biopsias fueron cultivadas en agar Columbia con 10% de sangre de cordero y suplementado con DENT en un lapso menor a 5 horas tras su recolección. Tras el tiempo de incubación (7 días) en las condiciones adecuadas de crecimiento, se observó el crecimiento de colonias pequeñas, transparentes de borde definidos como se observa en la **Figura 10**.

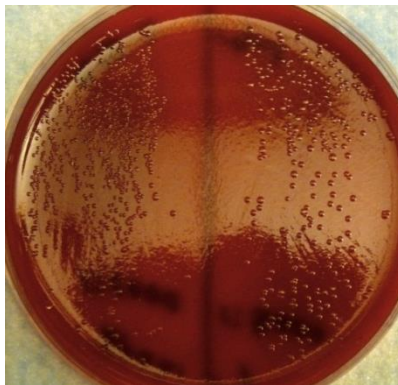


Figura 10. Colonias macroscópicas de *Helicobacter pylori* en Agar Columbia.

Fuente: Investigación

Las muestras positivas para el cultivo fueron 142 (61.5%), mientras que 89 muestras (38.5%) resultaron negativas. A las muestras positivas se les realizó tinción Gram, prueba de catalasa y oxidasa; además de la prueba bioquímica de la urea. En la microscopía se visualizó la presencia de bacilos Gram negativos, sin embargo en ocasiones se observó también formas cocoides Gram negativas. Las pruebas de catalasa y oxidasa dieron resultado positivo en todas las cepas al igual que la prueba de ureasa.

4.4. Resultados de pruebas moleculares

4.4.1. Resultados de extracción de ADN de las biopsias gástricas

El proceso de extracción de ADN se llevó a cabo a través de una técnica de ebullición estandarizada en este estudio. Consecutivamente se procedió a cuantificar el ADN dando una concentración promedio de 50 ng/ul. Además mediante electroforesis en geles de agarosa se determinó la calidad del ADN como se muestra en la **Figura 11**. Se obtuvieron ADN de óptima calidad para el posterior procesamiento, mientras que algunas muestras resultaron no óptimas para las pruebas moleculares, datos que se representan en la **Tabla 12**.

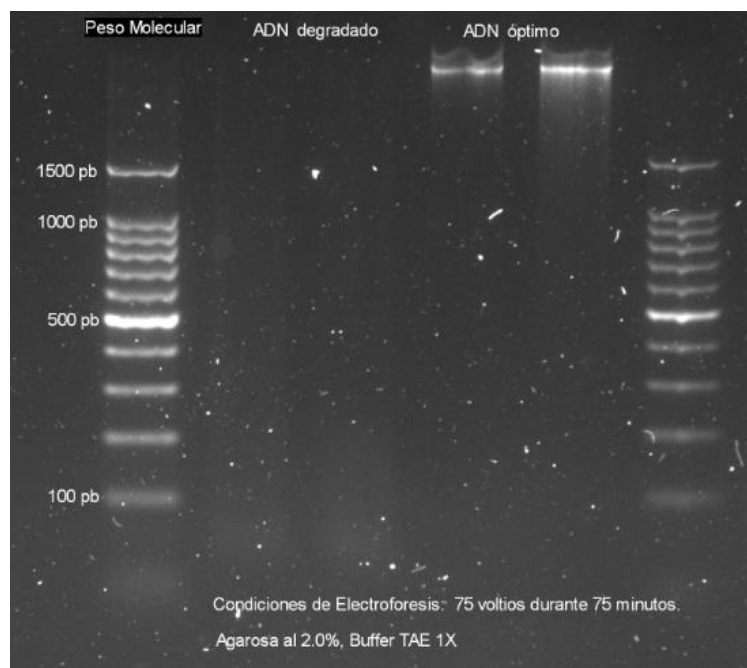


Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de muestras de ADN extraídas de biopsias gástricas.

Fuente: Investigación

Tabla 12. Comparación de la calidad del ADN

Calidad de ADN	Frecuencia	Porcentaje
Óptima calidad	168	72.7%
Mala calidad	63	27.3%
Total	231	100%

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

4.4.2. Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad y especificidad fueron calculadas omitiendo las muestras consideradas no aptas; eliminándolas tanto en la técnica de cultivo como en la técnica de PCR. Se consideró la técnica de PCR como método de comparación para la obtención de los valores de sensibilidad, la misma que fue del 73.2% y de especificidad del 80%, como se observa en la **Tabla 13**. Se obtuvo un valor predictivo positivo del 90,9% y un valor predictivo negativo del 52.2%.

Tabla 13. Sensibilidad y especificidad del cultivo en relación a la PCR para la detección de *Helicobacter pylori*

		PCR		Total
		POSITIVO	NEGATIVO	
CULTIVO	POSITIVO	90	9	99
	NEGATIVO	33	36	69
Total		123	45	168

S: 73,2% E: 80% VPP: 90.9% VPN: 52.2%

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

4.4.3. Identificación genotípica de *Helicobacter pylori*

Se amplificaron los genes *ureA*, *flaA2*, *cagA*, *vacA* de los 168 ADN, de los cuales 123 muestras fueron positivas y 45 negativas, datos que se expresan en la **Tabla 14**. Se consideraron positivas a todas las muestras que amplificaron al menos un gen del estudio.

Tabla 14. Proporción de muestras positivas para los genes en estudio

Muestras	Gen <i>ureA</i>	Gen <i>flaA2</i>	Gen <i>cagA</i>	Gen <i>vacA</i>
Proporción	49.6% (61/123)	43.1% (53/123)	50.4% (62/123)	57.7% (71/123)
n=123 (total muestras positivas)				

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

Los genes *ureA* y *flaA2* se utilizaron para la identificación de *Helicobacter pylori*. Las muestras que amplificaron ambos genes se consideraron para el estudio de secuenciación. El gen *ureA* amplificó en el 36.3% (61/168) de los casos con un peso molecular de 411pb, mientras que el gen *flaA2* amplificó en el 31.5% (53/168) con un peso de 504 pb como se puede observar en la **Figura 12**.

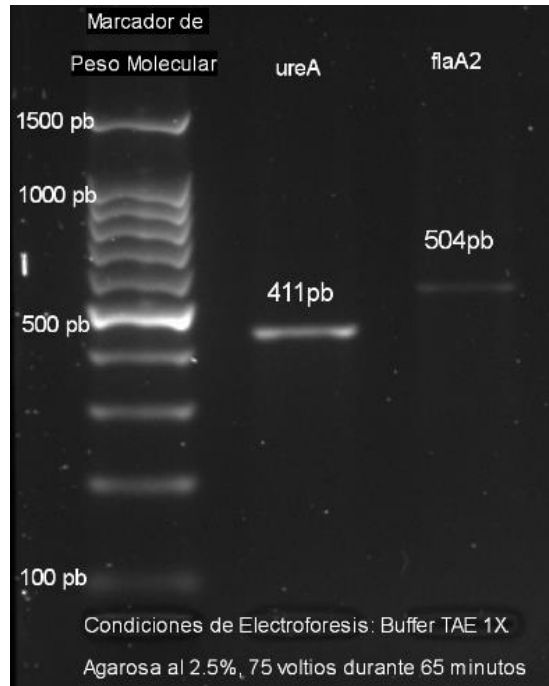


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación de los genes *ureA* y *flaA2*.
Fuente: Investigación

4.4.4. Genes de patogenicidad de *Helicobacter pylori*

a. Gen *cagA*

El gen *cagA* amplificó con un peso molecular de 289pb como se observa en la **Figura 13**, tras realizar el programa de termociclado anteriormente mencionado. Este gen se presentó en el 36.9% (62/168) de los casos.

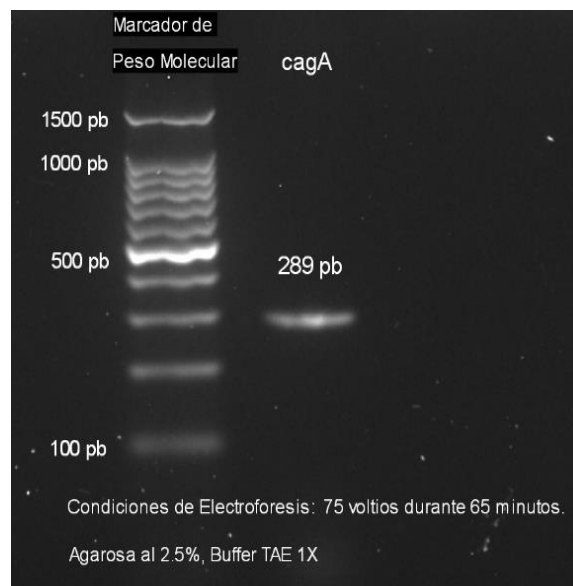


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación del gen *cagA*.
Fuente: Investigación

b. Gen *vacA*

El gen *vacA* se presentó en el 42.3% (71/168) de los casos, de los cuales se amplificó dos regiones que mediante diferencia de pesos en la electroforesis se pudo identificar los alelos *s1* y *s2* de la región “s” y los alelos *m1* y *m2* de la región “m”.

El alelo *s1* amplificó con un peso de 259pb diferenciándose del *s2* que amplificó con un peso de 286pb; el alelo *m1* tuvo un peso de 567pb, mientras que el alelo *m2* amplificó con un peso de 642pb como se observa en la **Figura 14**.

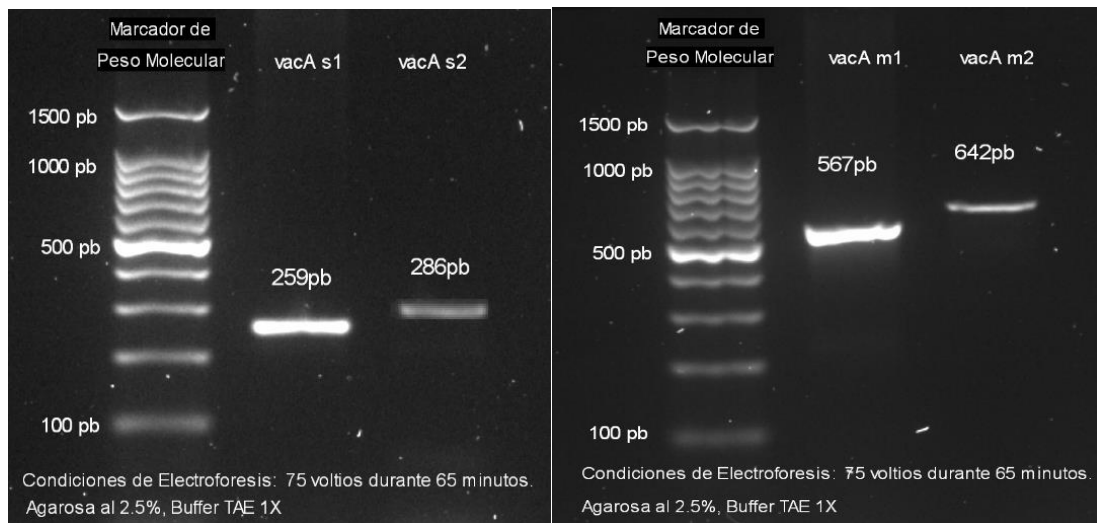


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de la amplificación de los alelos *s1*, *s2*, *m1*, *m2* del gen *vacA*.

Fuente: Investigación

La **Tabla 15** muestra la expresión de los alelos de las regiones “s” y “m”, en la cual se evidencia que los alelos *s1/m1* se presentan en el 81.7%, mientras que los alelos *s2/m2* se presentan en el 12.7%, seguido de los alelos *s1/m2* y *s2/m1* con el 4.2% y 1.4% respectivamente.

Tabla 15. Alelos de las regiones s y m del gen *vacA*

Alelos	Frecuencia	Porcentaje
<i>s1/m1</i>	58	81.7%
<i>s1/m2</i>	3	4.2%
<i>s2/m1</i>	1	1.4%
<i>s2/m2</i>	9	12.7%
Total	71	100%

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

4.4.5. Variaciones génicas de los genes *cagA* y *vacA*

Las 32 muestras que amplificaron ambos genes: *ureA* y *flaA2* se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen Inc. Korea para determinar las variaciones presentes en la secuencia amplificada de los genes *cagA* y *vacA*. Posterior a la limpieza y alineamiento de las secuencias se determinó que 24 correspondientes al gen *cagA*, 25 al gen *vacA* región “s” y 27 al gen *vacA* región “m”, permitieron el análisis.

a. Gen *cagA*

Las secuencias del gen *cagA* fueron comparadas con las secuencias de *Helicobacter pylori* ATCC 26695 (código de acceso GenBank KR154758), con *Helicobacter pylori* ATCC 49503 (código de acceso GenBank AB015415) y con *Helicobacter pylori* J-578 (código de acceso GenBank AB017923).

La **Tabla 16**, muestra el grado de similitud entre las secuencias analizadas en el estudio del gen *cagA* y las de *Helicobacter pylori* consideradas patrón. Las secuencias analizadas presentan mayor porcentaje de identidad con *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Tabla 16. Comparación del gen *cagA* con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori*

Gen <i>cagA</i>	Porcentaje de Similitud					
	<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 26695 (KR154758)		<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503 (AB015415)		<i>Helicobacter pylori</i> J-578 (AB017923)	
	%	Discordancia	%	Discordancia	%	Discordancia
001	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 0 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0023	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 1 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0044	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0046	94	(163/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(152/172pb) 0 Gap
0055	92	(160/173pb) 1 Gap	97	(167/172pb) 0 Gap	89	(154/173pb) 1 Gap
0064	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 0 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0067	94	(162/173pb) 1 Gap	99	(171/172pb) 0 Gap	89	(153/173pb) 0 Gap
0077	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 0 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0087	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(171/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0096	92	(160/173pb) 1 Gap	98	(169/172pb) 0 Gap	88	(151/173pb) 0 Gap
0099	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0135	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0141	92	(160/173pb) 1 Gap	98	(169/171pb) 0 Gap	88	(151/173pb) 0 Gap
0143	94	(163/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(154/173pb) 0 Gap
0144	92	(160/173pb) 1 Gap	97	(167/172pb) 0 Gap	89	(154/173pb) 1 Gap
0149	91	(157/173pb) 1 Gap	95	(164/172pb) 4 Gap	88	(152/173pb) 5 Gap
0159	94	(162/173pb) 1 Gap	98	(169/172pb) 0 Gap	90	(156/173pb) 1 Gap
0165	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 0 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0180	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0181	94	(163/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(154/173pb) 0 Gap
0188	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap
0193	92	(159/173pb) 1 Gap	97	(166/172pb) 0 Gap	89	(153/173pb) 1 Gap
0195	92	(159/173pb) 1 Gap	98	(168/172pb) 0 Gap	88	(153/173pb) 1 Gap
0221	93	(161/173pb) 1 Gap	99	(170/172pb) 0 Gap	90	(155/173pb) 1 Gap

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

La variación presente en las secuencias de gen *cagA* se muestran en la **Figura 15**, en la cual se puede observar el cambio de Gly (Glicina) por Asn (Asparagina) en 11 secuencias analizadas en la posición 467, además se observa la delección, es decir una eliminación de 4 bases nucleotídicas en la muestra 0149 en la posición 460-461 y 482-483.

Tabla 17. Comparación del gen *vacA* de la región “s” con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori*

Gen <i>vacA</i> “s”	Porcentaje de Similitud					
	<i>Helicobacter pylori</i> Y06 (AY737319)		<i>Helicobacter pylori</i> cc2c (HQ287754)		<i>Helicobacter pylori</i> J128 (U95971)	
	%	Discordancia	%	Discordancia	%	Discordancia
0001	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(132/141pb) 0 Gap
0044	92	(131/142pb) 0 Gap	97	(139/144pb) 0 Gap	92	(130/141pb) 0Gap
0046	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(132/141pb) 0 Gap
0053	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(131/141pb) 0 Gap
0055	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(131/141pb) 0 Gap
0064	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(131/141pb) 0 Gap
0067	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(131/141pb) 0 Gap
0072	92	(131/142pb) 0 Gap	97	(139/144pb) 0 Gap	92	(131/142pb) 0 Gap
0077	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0087	92	(130/142pb) 2 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	92	(130/142pb) 2 Gap
0096	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0099	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0135	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap
0141	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap
0143	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0144	92	(131/142pb) 0 Gap	97	(139/144pb) 0 Gap	92	(131/142pb) 0 Gap
0159	92	(131/142pb) 0 Gap	97	(139/144pb) 0 Gap	92	(131/142pb) 0 Gap
0165	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap
0166	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0180	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0181	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap
0188	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0193	93	(132/142pb) 0 Gap	96	(138/144pb) 0 Gap	93	(132/142pb) 0 Gap
0195	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap
0221	94	(133/142pb) 0 Gap	95	(137/144pb) 0 Gap	94	(133/142pb) 0 Gap

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

Las variaciones presentes en las secuencias de gen *vacA* de la región “s” se muestran en la **Figura 16**, en la cual se puede observar en la posición 35 un cambio por Asp (Ácido aspártico) en todas las muestras, en comparación de las secuencias patrón en las que se presenta Ser (Serina) o Gly (Glicina), además se presenta una deleción en la posición 47 en la muestra 0147 y una deleción en la posición 48 en las muestras 0087, 0193.

Secuencias patrón

Species/Abbrv	30n	35n	47n	76
1. Hpy Y06	F S R S V	S C H H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G	R Y R R	C R N G L R A S * L G A
2. Hpy J128	F S R S I G	S C H H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G	R Y R R	C R N G L R A S * L G A
3. Hpy cc2c	F S R S V G	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
4. 0001 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
5. 0044 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
6. 0046 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
7. 0053 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
8. 0055 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
9. 0064 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
10. 0067 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
11. 0072 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
12. 0077 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
13. 0087 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F ? N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
14. 0096 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
15. 0135 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
16. 0141 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
17. 0143 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
18. 0144 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
19. 0159 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L ? H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
20. 0165 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
21. 0166 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
22. 0180 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
23. 0181 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
24. 0188 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
25. 0193 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F ? N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
26. 0195 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
27. 0221 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A
28. 099 vacA s	F S R S V D	R H T A T K S C R L F H N R D H S S H C W G Y R Y R H	R	C R N G L R A S * L G A

Figura 16. Alineamiento de las secuencias del gen *vacA* región s, comparados con secuencias patrón de *Helicobacter pylori*.

La figura muestra las variaciones en la secuencia de aminoácidos desde la posición 30 a la posición 76. (*) Indica que los aminoácidos son idénticos, (?) indica delección de nucleótidos. **Fuente:** Investigación

La **Tabla 18**, muestra el grado de similitud entre las secuencias analizadas en el estudio del gen *vacA* región “m” y las de *Helicobacter pylori* consideradas patrón. Las secuencias analizadas presentan mayor porcentaje de identidad con *Helicobacter pylori* cc2c, excepto las muestras 0017 y 0149 las cuales presentan mayor similitud con *Helicobacter pylori* J128.

Tabla 18. Comparación del gen *vacA* de la región “m” con las secuencias patrón de *Helicobacter pylori*

Porcentaje de Similitud

Gen <i>vacA</i> "m"	<i>Helicobacter pylori</i> Y06 (AY737319)		<i>Helicobacter pylori</i> cc2c (HQ287754)		<i>Helicobacter pylori</i> J128 (U95971)	
	%	Discordancia	%	Discordancia	%	Discordancia
0001	94	(273/290pb) 0 Gap	96	(279/290pb) 0Gap	87	(109/125pb) 0Gap
0017	81	(137/170pb) 0Gap	72	(210/293pb) 12Gap	97	(356/363pb) 1 Gap
0023	96	(278/290pb) 2Gap	97	(282/290pb) 0Gap	86	(108/125pb) 2 Gap
0044	97	(282/290pb) 0Gap	97	(280/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0046	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(1107125pb) 0Gap
0053	95	(276/290pb) 0Gap	99	(286/290pb) 0Gap	86	(108/125pb) 0Gap
0055	95	(275/290pb) 0Gap	98	(283/290pb) 0Gap	86	(108/125pb) 0Gap
0062	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0064	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0067	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0072	97	(281/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0077	97	(282/290pb) 0Gap	96	(278/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0087	96	(279/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	90	(112/125pb) 0Gap
0096	96	(278/290pb) 0Gap	98	(278/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0135	97	(280/290pb) 0Gap	97	(280/290pb) 0Gap	90	(112/125pb) 0Gap
0141	97	(280/290pb) 0Gap	97	(280/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0143	94	(274/290pb) 0Gap	97	(280/290pb) 0Gap	87	(109/125pb) 0Gap
0144	95	(276/290pb) 0Gap	96	(277/290pb) 0Gap	87	(109/125pb) 0Gap
0149	81	(127/156pb) 0Gap	71	(209/293pb) 12Gap	96	(349/363pb) 1 Gap
0159	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0165	95	(276/290pb) 0Gap	98	(284/290pb) 0Gap	86	(108/125pb) 0Gap
0166	95	(276/290pb) 0Gap	98	(284/290pb) 0Gap	85	(106/125pb) 0Gap
0180	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0181	96	(277/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0188	95	(275/290pb) 0Gap	96	(279/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap
0193	96	(279/290pb) 0Gap	97	(281/290pb) 0Gap	89	(111/125pb) 0Gap
0221	96	(277/290pb) 0Gap	97	(281/290pb) 0Gap	88	(110/125pb) 0Gap

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

Las variaciones presentes en las secuencias de gen *vacA* de la región "m" se muestran en la **Figura 17**, en la cual se puede observar en la posición 485 y 487 una delección en la muestra 0023; en la posición 521 un cambio de Thr (Treonina) por His (Histidina) en las muestras 0001 y 0144, además se observa un cambio en la posición 529 por Gly (Glicina) en 18 muestras en comparación con las secuencias patrón en las que se encuentra Asp (Ácido aspártico) o Asn (Asparagina).

Las secuencias de las muestras 0017 y 0149 se muestran en la **Figura 18**, debido a que fueron comparadas únicamente con la secuencia de *Helicobacter pylori* J128 (código de acceso GenBank U95971) por presentar una secuencia diferente a las demás muestras. Se observa que existe un cambio de Lys (Lisina) por Arg (Arginina) en la posición 522, un cambio de Thr (Treonina) por Ser (Serina) en la posición 536. En la posición 546 se observa un cambio de Ala (Alanina) por Leu (Leucina) y en la posición 570 un cambio de Ile (Isoleucina) por Val (Valina).

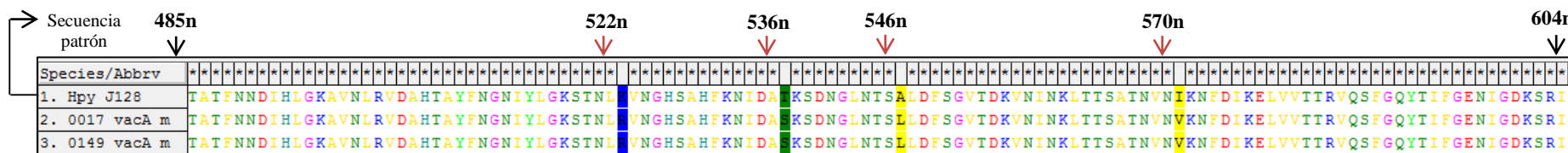


Figura 18. Alineamiento de las secuencias del gen *vacA* región “m” de las muestras 0017 y 0149, comparados con secuencia patrón de *Helicobacter pylori*. La figura muestra las variaciones en la secuencia de aminoácidos desde la posición 485 a la posición 604. (*) Indica que los aminoácidos son idénticos. **Fuente:** Investigación

4.4.6. Relación de la lesión gástrica con la expresión de los genes *cagA* y *vacA*

La expresión de los genes se relacionó con el grado de lesión obtenido realizando una prueba de chi cuadrado considerando una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0,05. Se determinó que no existe relación estadísticamente significativa entre la presencia del gen *cagA* y el grado de lesión como se observa en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Relación del grado de lesión con la expresión del gen *cagA*

Grado de Lesión	Gen <i>cagA</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Gastritis no atrófica	31(13,4%)	82(35,5%)	113(48,9%)
Atrofia gástrica multifocal	18 (7,8%)	35 (15,2%)	53(22,9%)
Metaplasia intestinal completa	12 (5,2%)	40 (17,3%)	52 (22,5%)
Metaplasia intestinal incompleta	1 (0,4%)	12 (5,2%)	13 (5,6%)
Total	62(26,8%)	169 (73,2%)	231 (100,0%)
Chi-cuadrado de Pearson: Valor: 4,192 ; GL: 3 ; p-valor: 0,241			

Fuente: Investigación *Elaborado:* Daniela Núñez

De igual manera se determinó que no existe relación significativa entre los alelos del gen *vacA* y el grado de lesión gástrica como se muestra en la **Tabla 20**

Tabla 20. Relación del grado de lesión con la expresión de los alelos del gen *vacA*

Grado de Lesión	Gen <i>vacA</i>				Total
	<i>s1/m1</i>	<i>s1/m2</i>	<i>s2/m1</i>	<i>s2/m2</i>	
Gastritis no atrófica	26 (36,6%)	3 (4,2%)	0 (0,0%)	3 (4,2%)	32 (45,1%)
Atrofia gástrica multifocal	18 (25,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (4,2%)	21 (29,6%)
Metaplasia intestinal completa	12 (16,9%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	2 (2,8%)	15 (21,1%)
Metaplasia intestinal Incompleta	2 (2,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	3 (4,2%)
Total	58 (81,7%)	3 (4,2%)	1 (1,4%)	9 (12,7%)	71 (100%)
Chi-cuadrado de Pearson: Valor: 8,853; GL: 9 ; p-valor: 0,451					

Fuente: Investigación *Elaborado:* Daniela Núñez

4.5. Prevalencia de *Helicobacter pylori*

La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* fue del 53.24% (123/231) detectado por medio de la técnica de PCR para la identificación de los genes *ureA*, *flaA2*, *cagA*, *vacA*; mientras que fue del 61.5% (142/231) cuando la detección se realizó por cultivo.

La infección por *Helicobacter pylori* fue mayor en el género masculino siendo la prevalencia determinada por la técnica de PCR, del 56.91%, mientras que en el género femenino la prevalencia fue de 43.08%. La prevalencia de muestras positivas para *Helicobacter pylori* de acuerdo a los grupos de edad es del 46.3% en el grupo de 53-69 años, del 31,7% en el

grupo de 36-52%, del 12.2% y 9.8% en los grupos de 18-35 y de 70-85 respectivamente como se observa en el **Figura 19**.

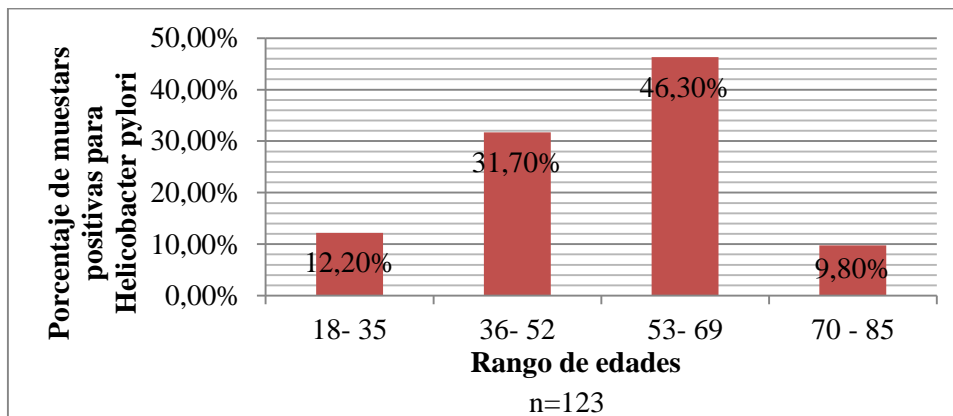


Figura 19. Prevalencia de muestras positivas para *Helicobacter pylori* de acuerdo a los rangos de edad determinados.

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

La prevalencia de muestras positivas para *Helicobacter pylori* de acuerdo a las enfermedades catalogadas por el CIE-10 se muestra en el **Figura 20**, en el cual se puede observar que existe mayor número de muestras positivas en gastritis y duodenitis (K29) que presenta el 66.7%.

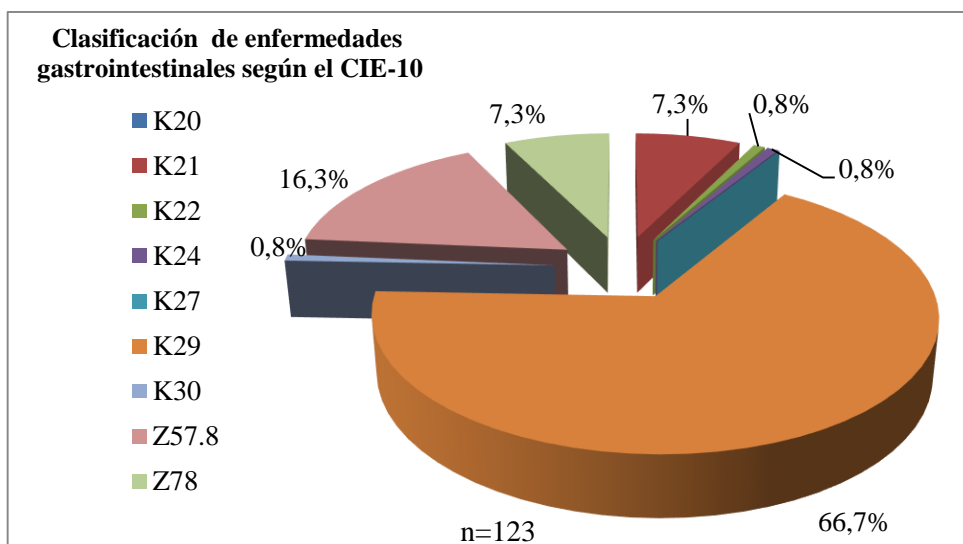


Figura 20. Prevalencia de enfermedades gastrointestinales según el CIE-10 en muestras *Helicobacter pylori* positivo.

*K20 (Esófagitis) *K21 (Enfermedad del reflujo gastroesofágial) *K22 (Otras enfermedades del esófago) *K24 (Úlcera gástrica) *K27 (Úlcera péptica) *K29 (gastritis y Duodenitis) *K30 (Dispepsia) *Z57.8 (Exposición ocupacional a otros factores) *Z78 (Chequeo prequirúrgico).

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

La prevalencia de muestras positivas en relación al grado de lesión fue: gastritis no atrófica el 46.3% (57/123), atrofia gástrica multifocal 26.8% (33/123), metaplasia intestinal completa 22% (27/123) y metaplasia intestinal incompleta 4.9% (6/123), como se observa en el **Figura 21**.

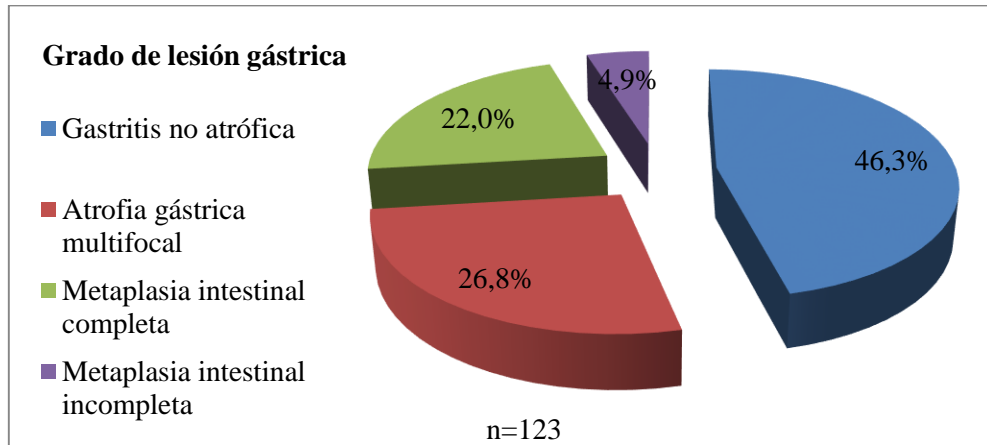


Figura 21. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en relación con el grado de lesión.

*K29 (gastritis y duodenitis) *K29.1 (Otras gastritis agudas) *K29.3 (Gastritis crónica superficial) *K29.4 (Gastritis crónica atrófica) *K29.5 (Gastritis crónica, no especificada) *K29.6 (Otras gastritis) *K29.7 (Gastritis, no especificada) *K29.9 (Gastroduodenitis, no especificada)

Fuente: Investigación **Elaborado:** Daniela Núñez

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Las enfermedades gastrointestinales se han reportado como un problema de salud pública a nivel mundial. *Helicobacter pylori* es reconocido por ser el principal causante de enfermedades gastrointestinales como gastritis, úlceras, y hasta cáncer gástrico (García-Mazcorro & Garza-González, 2015). En este estudio se incluyó 231 pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 que se realizaron endoscopía, en los cuales se identificó que la patología más frecuente fue la gastritis y duodenitis (K29), la misma que se presentó en el 68.4% del total de pacientes, similar a los datos de González & Sánchez (2012) en el estudio que realizó en una población de la ciudad de Quito en la que menciona que el 61.9% de pacientes fueron diagnosticados con gastropatía; igualmente, Vega et al (2010) reporta que el diagnóstico más frecuente fue gastritis y duodenitis con un porcentaje del 72.2% en la investigación que realizó en una población de Perú.

Del mismo modo, el diagnóstico de úlcera gástrica se presentó en el 0.9%, úlcera péptica en el 0.4% y cáncer gástrico en el 0% del total de pacientes. González & Sánchez (2012) enuncia que el 3.75% de pacientes de un Hospital de Quito presentó úlcera gástrica, 1.88% úlcera duodenal y ningún caso de cáncer gástrico; asimismo Albán (2016) señala en su estudio realizado en otro Hospital de la ciudad de Quito que el 0.5% de pacientes presentaron cáncer gástrico; por consiguiente se afirma que la frecuencia de estas enfermedades en la población de la ciudad de Quito es baja; contrario a lo que reporta Vega et al (2010) con un 25.4% para úlcera péptica y 3.3% para cáncer gástrico.

El diagnóstico endoscópico determinó que la gastritis eritematosa se presentó en el 45.5% de los pacientes estudiados, información similar a la obtenida en el estudio de González & Sánchez (2012) en el que el hallazgo de eritema se presentó en el 45.6% de los pacientes. La gastritis erosiva se presentó en el 30.3% y la gastritis nodular en el 0.9%; datos semejantes a los reportados por Ayala (2013) en su estudio realizado en una población con dispepsia en Lima-Perú, en donde se menciona que el 52.6% de la población presentó gastritis eritematosa, el 28.6% gastritis erosiva y el 11.6% gastritis nodular. En tanto que, González

& Sánchez (2012) citan que el 13.13% de la población presenta gastritis erosiva y el 10% gastritis nodular.

En el diagnóstico histológico, el 48.9% se determinó como gastritis no atrófica, mientras que el 51.1% como gastritis atrófica, datos que concuerdan con el estudio de Szkaradkiewicz et al (2016) quien reporta un del 42.9% de gastritis no atrófica y 57.1% de gastritis atrófica. A diferencia de lo mencionado por Gobbo et al (2005) quien describe que el 31.6% de la población presentó gastritis no atrófica, y el 13.3% gastritis atrófica; conjuntamente consideró otros diagnósticos como úlcera gástrica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma que representaron el 18.4% cada una; la metaplasia ha sido considerada en este estudio como uno de los grados de lesión dentro del diagnóstico de gastritis atrófica.

Los grados de lesión considerados fueron: gastritis no atrófica (48.9%), atrofia gástrica multifocal (22.9%), metaplasia intestinal completa (22.5%) y metaplasia intestinal incompleta (5.6%). No obstante, Sánchez-Cuén et (2016) en su estudio en una población con metaplasia reporta que la forma intestinal completa se presentó en el 76.1% y la intestinal incompleta en el 21.7%, contrario a la información obtenida en este estudio. Schneider et al (2015) planteó grados de lesión similares a los de la presente investigación, sin embargo la frecuencia de los mismos no fueron semejantes; la gastritis no atrófica se presentó en el 11.5%, la gastritis atrófica multifocal en el 17.3%, la metaplasia intestinal en el 61.5% y la displasia en el 9.6%. Yep-Gamarra et al (2016) plantea otros grados de lesión, entre los que se menciona que la atrofia leve se presentó en el 16%, atrofia moderada en el 2%, metaplasia intestinal en el 76% y displasia en el 6%, datos que no pueden relacionarse con los obtenidos debido a la distinta categorización de los grados de lesión.

Se describe diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *Helicobacter pylori*; Moncayo (2006) detalla la utilización medio agar tripticasa soya suplementado con sangre de oveja al 7%, Isovitalex y antimicrobianos (vancomicina, anfotericina, bacitracina, polimixina B y trimetoprim); Sánchez-Cuén, et al (2015) menciona el uso de agar Chocolate enriquecido con antibióticos y 1% de suero fetal de ternera; Semper (2017) recomienda la utilización de agar Wilkins-Chalgren con suero de caballo al 10% y suplemento DENT. Sin embargo, Bayona-Rojas et al (2013) especifica que el agar Columbia con 10% de sangre de

cordero y suplemento DENT es el mejor medio de cultivo para el crecimiento de colonias de este microorganismo, por este motivo se optó la utilización del mismo para este estudio.

Como resultado del cultivo 142 muestras presentaron colonias representativas de *Helicobacter pylori* por sus características fenotípicas. Además, se observaron formas atípicas cocoides como las que han sido descritas por Duś (2013) como formas viables que pueden ser cultivables y no cultivables, dependiendo de las condiciones nutricionales que se les proporcione. Por ello, se puede determinar que las formas cocoides observadas en este estudio fueron formas cultivables, sin embargo posterior al almacenamiento de las cepas en medio BHI + glicerol al 20% éstas se convirtieron en formas no cultivables probablemente por las condiciones en este medio que no fueron favorecedoras. A pesar de que la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología recomiendan como medio de conservación (López-Brea et al, 2004).

El desempeño de la técnica de cultivo depende de varios factores, entre los que se encuentra el medio de cultivo utilizado, las condiciones de incubación y el tiempo de incubación. La sensibilidad de la técnica de cultivo obtenido en este estudio fue del 73.2% tomando como método de comparación la técnica de PCR, mientras que Islam (2010) reporta una sensibilidad del 68.75%; y Ramis et al (2012) reporta una sensibilidad del 85.4%. En cuanto a la especificidad, en este estudio corresponde a 80%, mientras Islam (2010) y Ramis et al (2012) reportan una especificidad del 100%. La variación en el porcentaje de sensibilidad y especificidad puede deberse a las condiciones del cultivo que varían entre los estudios mencionados y el presente estudio. Además, como se mencionó anteriormente existen otros suplementos (requerimientos nutricionales y antibióticos) que pueden favorecer a la especificidad del medio, evitando que crezcan microorganismo contaminantes.

De igual manera, se identificó la presencia de *Helicobacter pylori* a través de la técnica de PCR por la amplificación de genes específicos del microorganismo como *ureA*, *flaA2*, *cagA* y *vacA* (Madhi, 2013; Oktem-Okullu, et al, 2015; Smith, 2013). La técnica de PCR presenta una alta sensibilidad, sin embargo en el caso de la muestra de biopsia gástrica se presentan interferencias propias del tejido que no favorecen la obtención de ADN de alta calidad; además en este estudio el método de extracción no fue realizado con un kit comercial sino

con una técnica in-house de ebullición. Todo esto afecta el rendimiento de la PCR, por ello se consideró 168 de muestras óptimas para el procesamiento molecular.

El gen *ureA* ha sido considerado en varios estudios para la detección de *Helicobacter pylori*; Sugimoto et al (2009) reporta una sensibilidad del 88% y una especificidad del 80% del gen en muestras de biopsia gástrica. En este estudio el 36.3% (61/168) dio un resultado positivo para *ureA*, dando una sensibilidad del 49.6%, especificidad del 100% y un VPN de 42%, datos que confirma Smith (2013) en su estudio, quien presenta un VPN de 44%, por lo que se sugiere que el gen *ureA* tiene una baja probabilidad de detectar un resultado negativo.

Madhi (2013) recomienda la amplificación del gen *flaA2* que codifica para la proteína de la flagelina de *Helicobacter pylori* para la detección de género y especie debido a la alta sensibilidad (100%) y especificidad (98%) que obtuvo en su estudio, por lo que en este estudio se consideró para la detección de infección por este microorganismo; sin embargo el gen *flaA2* resultó positivo en el 31.5% (53/168) de cepas de *Helicobacter pylori*, con una sensibilidad del 43.1% y especificidad del 100%. Al obtener una detección baja por parte del gen *ureA* y *flaA2* se optó por considerar positivo para *Helicobacter pylori* a todas las muestras que amplificaron para al menos un gen en estudio; considerando que todos son genes específicos de este microorganismo.

La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* determinada en este estudio fue del 53.24% mediante la técnica de PCR en biopsias gástricas, similar a la prevalencia reportada por Albán (2016) del 55.9% obtenida de pacientes de una Clínica privada de Quito; y de igual manera Valenzuela (2016) describe que la prevalencia de su estudio en la Universidad San Francisco fue del 56.9%. Ambos estudios determinaron su prevalencia mediante la técnica de PCR. En cambio Vásquez, P. en su estudio en el 2013 indica que la prevalencia fue del 40.2%, realizada en el Hospital Metropolitano de Quito a través de la técnica histológica (Vásquez, 2013). Por lo mencionado anteriormente, se puede indicar que la prevalencia es mayor cuando la infección es determinada por técnicas moleculares, determinando una mayor sensibilidad de éste método.

La prevalencia de este microorganismo y la distribución de los genotipos varían entre países. Correa et al (2016) reporta que *Helicobacter pylori* tiene una prevalencia del 36.4% en pacientes con síntomas dis péptico en una población de Medellín, mientras que la prevalencia

en México fue del 86.1% según el estudio de Martínez et al (2014). Porras, et al (2013) reporta una prevalencia del 79.4% en poblaciones de varios países de América Latina.

Entre los genes de patogenicidad que presenta *Helicobacter pylori* se encuentra el gen *cagA*, que se expresó en el 50.4% de las cepas positivas; Pinheiro et al (2014) reportó una frecuencia del 58.5% del gen; lo que se relaciona con la alta prevalencia de *Helicobacter pylori* (97%), y a las características de la población en estudio, la misma que presenta condiciones socioeconómicas bajas y sanitarias deficitantes, a diferencia de la población en la presente investigación que está considerada dentro de un estrato social medio. Albán (2016) mostró una prevalencia del 44% del gen *cagA*, porcentaje que se relaciona con el estatus socioeconómico de la población estudiada; en el cual no se encontró aumento significativo del riesgo de contraer ninguna patología gástrica por la presencia del gen. Esta información concuerda con la obtenida en este estudio, en el que tampoco se determinó relación significativa entre la presencia del gen y el grado de lesión gástrica debido a que el mayor porcentaje de cepas positivas para el gen *cagA* (13.4%) se encuentra en el menor grado de lesión (gastritis no atrófica) y el mayor grado de lesión (metaplasia intestinal completa) a penas presenta el 0.4%.

La expresión de este gen *cagA* es considerado como un marcador de patogenicidad, puesto que su presencia se ha relacionado con el desarrollo de úlcera duodenal, úlcera gástrica y cáncer gástrico, por ello estudios como el de (Faundez, Troncoso, & Figueroa, 2002), (Yadegar, 2015) y (Chiurillo, 2017) reportan una frecuencia elevada del gen (57- 85%) en pacientes con estas enfermedades; sin embargo en este estudio el porcentaje de estas enfermedades, úlcera gástrica(0.9%), úlcera péptica(0.4%) y cáncer gástrico (0%), es poco representativo por lo que no puede relacionarse con la expresión del gen.

Las secuencias del gen *cagA* analizadas presentaron una alta similitud con la secuencia patrón de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 que fue de 97-99%, por el contrario con *Helicobacter pylori* ATCC 26695 se indicó una semejanza del 92-94% y con *Helicobacter pylori* J-578 una concordancia del 88-90%. La comparación de estas secuencias reveló un cambio de aminoácido de glicina a asparagina en la posición 467 de 11 cepas en estudio; variación que no ha sido descrita anteriormente en otros estudios. Adicionalmente, se presentó la delección de cuatro aminoácidos: en la posición 460 en la que en el resto de

muestras se observa el aminoácido serina, en la posición 461 en la que se encontró alanina al igual que en la posición 482 y en la 483 se presentó ácido aspártico, únicamente en la cepa 0149.

El gen *vacA* también es reconocido como otro importante factor de virulencia, se presentó en el 57.7% de cepas positivas, de igual manera Essawi et al (2013) determinó que el gen se expresó en el 43.2% de pacientes con síntomas gastroduodenales. El gen *vacA* presenta dos regiones que fueron amplificadas, la región s (secuencia de la señal) que se presenta como formas alélicas s1 o s2 y la región m (región media) que se presenta como forma alélica m1 o m2. En este estudio la variante alélica más frecuente fue *s1/m1* con el 81.7%, descrita como la más prevalente en América Latina (Vega et al, 2010); seguido de la variante *s2/m2* con el 12.7%; las variantes *s1/m2* y *s2/m1* presentaron una frecuencia muy baja correspondiente a 4.2% y 1.4% respectivamente. De acuerdo a Albán (2016) la prevalencia del genotipo *s1/m1* es del 76.5%; dato semejante al obtenido en este estudio; sin embargo el genotipo *s2/m2* se presentó en menor frecuencia (9.9%) a la encontrada en la presente investigación; mientras que el genotipo *s1/m2* se presentó con una mayor frecuencia (7.4%) y ningún genotipo *s2/m1* fue reportado.

De acuerdo con Pinheiro et al (2014), la expresión de los alelos del gen *vacA* no está relacionado con la patología gástrica, pues no presenta una relación estadísticamente significativa entre su expresión y la presencia de gastritis crónica activa e inactiva. De la misma manera en este estudio no se describe la relación del gen *vacA* y sus alelos con el grado de lesión gástrica, a pesar de que se observa que la mayor expresión de los mismos se presenta en los pacientes con diagnóstico de gastritis atrófica. Por el contrario, Sallas et al (2017) indica que el 84.2% de pacientes con cáncer gástrico presentó el genotipo *s1/m1* estableciendo una relación significativa entre la presencia del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* y sus variantes alélicas y el aumento de los riesgos de enfermedades gástricas.

Las secuencias analizadas del gen *vacA* región “s” presentaron mayor semejanza con la secuencia de *Helicobacter pylori* cc2c con 95-97%; de la misma manera, la región “m” presentó un 96-98% de similitud. Por el contrario, presentaron menor concordancia con la secuencia de *Helicobacter pylori* J128. En la posición 35 de la región “s” del gen ninguna de las secuencias presentó similitud con las secuencias patrón; en lugar del aminoácido serina

o glicina se observó ácido aspártico. En tanto que, en la posición 521 de la región “m” se dio el cambio de treonina por histidina en las cepas 0001 y 0144. En la posición 529 se observó la presencia del aminoácido glicina en 18 muestras, mientras que en las secuencia de *Helicobacter pylori* Y06 se encuentra ácido aspártico y en *Helicobacter pylori* cc2c asparagina en esa posición.

Las muestras 0017 y 0149 mostraron un patrón diferente a las demás cepas, presentando una similitud del 96-97% con la secuencia de *Helicobacter pylori* J-128 a diferencia de las demás muestras. En estas secuencias se observó varios cambios de aminoácido con respecto a la secuencia patrón. En la posición 522, 536 546 y 570.

CONCLUSIONES

La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* determinada fue del 53.24% presentándose en mayor frecuencia en pacientes diagnosticados con gastritis y duodenitis, con un grado de lesión de gastritis no atrófica. De igual manera la prevalencia de infección fue mayor en el género masculino (56.91%) y mayor en el rango de edad de 53-69 años (46.3%).

Los resultados muestran que el gen *cagA* se expresó en 50.4% de las muestras positivas, mientras que el gen *vacA* se presentó en el 57.7%, siendo el genotipo *s1/m1* la variante alélica más frecuente con el 81.7% de las cepas *vacA* positivas.

Las variaciones en las secuencias de los genes *cagA* y *vacA* encontradas en este estudio no han sido descritos previamente, por lo cual no se puede concluir que estas mutaciones afectan funcionalmente en la expresión de los genes o si están relacionadas con la presencia de las patologías gástricas.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión del gen *cagA* y el grado de lesión gástrica. De la misma manera no se encontró relación entre gen *vacA* y sus genotipos *s1/m1*, *s2/m2*, *s1/m2* y *s2/m1* y la presencia de una lesión gástrica grave, considerándose está la metaplasia intestinal completa e incompleta; sin embargo se observó una mayor frecuencia del genotipo *s1/m1*, considerado como el de mayor patogenicidad, en los pacientes con diagnóstico de gastritis atrófica.

RECOMENDACIONES

Se recomiendan realizar estudios epidemiológicos que incluyan factores socioeconómicos para la identificación de factores de riesgo asociados al desarrollo de infección por *Helicobacter pylori*.

En cuanto al almacenamiento se recomienda el ensayo de medios de conservación que permitan la recuperación de cepas viables de *Helicobacter pylori* en tiempos prolongados

Con respecto a la identificación del gen *cagA*, dado los resultados no concluyentes de las variaciones en la región amplificada, se recomienda realizar un estudio más profundo de las mutaciones presentes en este gen sobretodo de la región EPIYA y su asociación con las patologías gástricas.

De igual forma se sugiere realizar el estudio de las variantes *vacA* s1a, s1b, s1c y *vacA* m2a, m2b para establecer su relación con las patologías gástricas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudo, S. (2010). *Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por Helicobacter pylori*. *Kas.Unibe.Ch*. Retrieved from http://www.kas.unibe.ch/logo2013/Abstracts/PrimoCano_Carlos.pdf
- Albán, A. (2016). Identificación de los genes de virulencia vacA, cagA y oipA mediante PCR multiplex de Helicobacter pylori en pacientes positivos en la clínica AXXIS de la Ciudad de Quito.
- Anselmi, S., Guillermo, A., Rosa, S. La, Medina, Y., & Marcano-lozada, M. J. (2008). Helicobacter pylori: Un Camino Al Cáncer.
- Bae, J., & Kim, E. H. (2016). Helicobacter pylori Infection and Risk of Gastric Cancer in Korea : A Quantitative Systematic Review Final Selection of Related Articles, 197–204.
- Bayona-Rojas et al. (2013). Microbiological conditions for culturing Helicobacter pylori. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología*, (4).
- Bermúdez, L. Domínguez, E. Torres, L. (2008). Métodos para la detección de la infección por Helicobacter pylori Techniques used for the Helicobacter pylori infection detection, 1–14.
- Boluda, R. (2015). Gastritis, úlcera y hemorragia digestiva. *Servicio de Gastroenterología Infantil*, 83–91.
- Bravata-Alcántara et al. (2012). Detección molecular simultánea de diferentes genotipos de Helicobacter pylori, 79(4), 229–233.
- Carabaño, I. La Orden Izquierdo, E. Garriga, S. (2012). Patogenia y expresión endoscópica de la infección por H.pylori en niños, 69–74.
- Cava, F. (2003). Dos décadas de Helicobacter pylori. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 12(1), 1–10.
- Chiurillo, et al. (2017). Genotyping of Helicobacter pylori virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(2013), 750–756. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.004>
- Correa et al. (2016). Prevalencia de Helicobacter pylori y características histopatológicas en biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en un centro de referencia de Medellín Biopsies from Patients with Dyspeptic Symptoms at a Referral Center in Medellin. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología*, 9–15.
- Correa, P., & Piazuolo, M. B. (2013). *Clinical & Experimental Pathology*, 3(3). <http://doi.org/10.4172/2161-0681.1000147>

- Correa.P. (2011). Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Revista Colombiana de Cirugía*, 111–117.
- Da Costa, D. M., Dos Santos Pereira, E., & Rabenhorst, S. H. B. (2015). What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 21(37), 10563–10572. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10563>
- Derakhshan, M. H., Oien, K., Gillen, D., Fyfe, V., Crabtree, J. E., & Mccoll, K. E. L. (2006). Gastric histology, serological markers and age as predictors of gastric acid secretion in patients infected with *Helicobacter pylori*, 1293–1299. <http://doi.org/10.1136/jcp.2005.036111>
- Díaz, A. S., & Rentería, L. F. (2010). PCR : reacción en cadena, 53–74.
- Domínguez, R. and Huanca, A. (2013). POBLACIÓN DE NIVEL SOCIOECONÓMICO MEDIO Y ALTO Prevalence of *H. pylori* in a population of middle and upper socioeconomic levels, 19(1), 35–39.
- Dunn, B. E., & Cohen, H. (2000). *Helicobacter pylori*, 10(4), 720–741.
- Duś, et al. (2013). Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research – new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria, 261–268.
- Espino, A. (2010). Infección por *Helicobacter pylori*, 21, 323–327.
- Essawi, et al, . (2013). Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *ISRN Gastroenterology*, (August 2012).
- Faundez, G., Troncoso, M., & Figueroa, G. (2002). *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non- ulcerative dyspepsia patients, 4, 4–7.
- García, E. (2006). *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas, 49(4), 163–168.
- García, E. C. (2012). *Helicobacter pylori*.
- García-Mazcorro, J. F., & Garza-González, E. (2015). Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterología Y Hepatología*, (xx). <http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.01.004>
- Gisbert, J. (2016). *Gastroenterología y Hepatología*, 34(Supl 1), 16–27.
- Gisbert, J., & Graham, D. et al. (2010). Infección por *Helicobacter pylori*, 281–290.
- Gisbert, J. P. (2015). *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Gastroenterología Y Hepatología*, 38(Supl 1), 39–48. [http://doi.org/10.1016/S0210-5705\(15\)30018-2](http://doi.org/10.1016/S0210-5705(15)30018-2)
- Gobbo, et al, . (2005). Comparison of Histological and Molecular Diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 36, 12–16.

- González, E. (2002). *Helicobacter pylori*, 1–7.
- Gonzalez, Lidice. Boris, L. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori* Pathogenesis of infection due to *Helicobacter pylori*, *50*(4), 441–452.
- González, F. & Sánchez, M. (2012). Correlación de la Endoscopia digestiva alta en el diagnóstico de *H.pylori* demostrado con el estudio Histopatológico en pacientes que acuden por primera vez al servicio de videoendoscopia del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo en el período de Diciembre.
- Gustavo Barriga, C. A. and M. F. (2004). Prueba de aliento en el diagnóstico de la infección con *Helicobacter pylori*. *Federación Mexicana de Patología Clínica*, *51*.
- Hatakeyama, M., & Higashi, H. (2005). *Helicobacter pylori* CagA : a new paradigm for bacterial carcinogenesis, *96*(12), 835–843. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00130.x>
- Henao, S., & Otero, W. et al. (2009). Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá , Colombia Primary resistance to Metronidazole in *Helicobacter pylori* isolates in adult patients in Bogotá , Colombia, 10–15.
- Hernando-harder, A. N. A. C., Franke, A., Singer, M. V, & Harder, H. (2007). Dispepsia funcional: Nuevos conocimientos en la fisiopatogenia con implicaciones terapeuticas, 379–388.
- Hunt, R. H. (2010). *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo.
- Islam, et al. (2010). A Comparative Study Among Different Invasive Methods For The Diagnosis Of *Helicobacter Pylori*. *Faridpur Medical College Journal*, *5*(1), 21–24.
- Jaime, F., Villagrán, A., Serrano, C., Cerda, J., & Harris, P. R. (2013). Prevalencia de la infección por, 1249–1254.
- Jang, S., Jones, K. R., Olsen, C. H., Joo, Y. M., Yoo, Y., Chung, I., ... Merrell, D. S. (2010). Epidemiological Link between Gastric Disease and Polymorphisms in, *48*(2), 559–567. <http://doi.org/10.1128/JCM.01501-09>
- Jones, K. R., Whitmire, J. M., & Merrell, D. S. (2010). A tale of two toxins : *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease, *1*(November), 1–17. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00115>
- Kayaçetin, S., & Güreşçi, S. (2014). What is gastritis ? What is gastropathy ? How is it classified ?, *2014*. <http://doi.org/10.5152/tjg.2014.7906>
- Keeken, N. Van, Hattum, E. Van, & Boer, W. A. De. (2006). Validation of a new , commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies, *64*(9), 329–333.

- Kusters, J. G., Vliet, A. H. M. Van, & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection, *19*(3), 449–490. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Leja, M., Axon, A., & Brenner, H. (2016). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *21*, 3–7. <http://doi.org/10.1111/hel.12332>
- López, A. M., Delgado, M. P., Jaramillo, C., Amézquita, A., Parra, G., & Echeverry, M. M. (2009). Caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes residentes en Tolima, Colombia, 4–10.
- López-Brea, et al. (2004). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *17*.
- Madhi, et al. (2013). Recommendation of *flaA* and *flaB* as Recommendation of *flaA* and *flaB* as housekeeping genes in detection of *Helicobacter pylori*, (July).
- Malfertheiner, P., Chan, F. K. L., & Mccoll, K. E. L. (2017). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, *374*(9699), 1449–1461. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60938-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60938-7)
- Malfertheiner, P., Megraud, F., Morain, C. A. O., Atherton, J., Axon, A. T. R., Bazzoli, F., ... Kuipers, E. J. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection d the Maastricht IV / Florence Consensus Report. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
- Mario Valdivia. (2011). Gastritis y Gastropatías. *Revista Gastroenterología Perú*, *31-1*, 38–48.
- Martinez, et al. (2014). Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Revista de Gastroenterología de México*, *79*(4), 220–228. <http://doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>
- Masahide, K. Kenji, Y. et al. (2013). The Genetic Diversity of *Helicobacter pylori* Virulence Genes Is Not Associated with Gastric Atrophy Progression. *Acta Medica Okayama*, *Vol.67*, 93–98.
- Maya, C. (2007). La clínica y el laboratorio, (5), 211–231.
- Me, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing, *20*(2), 280–322. <http://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Menezes, D., Pereira, S., Helena, S., Rabenhorst, B., Menezes, D., & Pereira, S. (2015). What exists beyond *cag A* and *vac A*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases, *21*(37), 10563–10572. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10563>
- Mentis, A., Lehours, P., & Francis, M. (2015). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *20*, 1–7. <http://doi.org/10.1111/hel.12250>

- Moncayo, et al. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia Colombia Médica ninguna sintomatología. El riesgo de desarrollar enferme- descubrimiento específico de anticuerpos anti- H. la saliva. La. *Colombia Médica*, 37, 203–212.
- Montecucco, C., & Rappuoli, R. (2001). LIVING DANGEROUSLY: HOW *HELICOBACTER PYLORI* SURVIVES IN THE HUMAN STOMACH, 2(June).
- Monteiro, L., Mascarel, A. De, Sarrasqueta, A. M., Bergey, B., Barberis, C., Talby, P., ... Me, F. (2001). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection: Noninvasive Methods Compared to Invasive Methods and Evaluation of Two New Tests, 96(2).
- Moreno, C. et al. (2009). Mecanismos de resistencia de.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. E. N. S., & Pfaller, M. A. (2013). *MICROBIOLOGÍA*.
- Ogiwara, Hiroaki. Graham, D. (2008). i-Region Subtyping, 2008. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.062>
- Oktem-Okullu, et al, . (2015). Multiplex-PCR-Based Screening and Computational Modeling of Virulence Factors and T-Cell Mediated Immunity in *Helicobacter pylori* Infections for Accurate Clinical Diagnosis, 17, 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136212>
- Osaki, T., Konno, M., Yonezawa, H., Hojo, F., Zaman, C., Takahashi, M., ... Kamiya, S. (2017). Analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese families, (2015), 67–73. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.080507-0>
- Paez, V. Barón, S. and Nadaff, B. (2006). Infección por *Helicobacter pylori* (13 C-UBT) y factores nutricionales y socioeconómicos asociados en escolares de estratos bajos de la ciudad de Valencia. Venezuela, 56, 2006.
- Pardo-Sandoval, M. (2010). Efecto in vitro del extracto de *Solanum sessiliflorum* cocona sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*, 13(1), 30–33.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., & Vogelstein, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection, 297–301.
- Pinheiro, P., Bessa, D. N., Barbosa, F. C., Paula, A., Furtado, G. B., Barroso, F. C., ... Rabenhosrt, B. (2014). Presence of the Genes *cag A*, *cag E*, *vir B11* and Allelic Variation of *vac A* of *Helicobacter pylori* Are Associated with the Activity of Gastritis, (November), 347–355.
- Piñol, F. (2011). Mediadores bacterianos de la inflamación en la gastritis crónica por *helicobacter pylori*, 38(4), 276–283.
- Porras, et al. (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701), 209–215. <http://doi.org/10.1007/s10552-012-0117-5>

- Ramis, et al. . (2012). Evaluation of diagnosis methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 903–908.
- Ranjbar, R., Khamesipour, F., Jonaidi-Jafari, N., & Rahimi, E. (2016). *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water: *VacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA2* genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS Open Bio*, 6(5), 433–441. <http://doi.org/10.1002/2211-5463.12054>
- Rhead, J. L., Schiavon, S., Guariso, G., Ceroti, M., & Nitti, D. (2008). Clinical Relevance of, 91–99. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.041>
- Rivas-Traverso, F and Hernandez, F. (2000). *Helicobacter pylori* : Factores de virulencia , patología y diag-, 11(3), 187–205.
- Rodriguez, A. (2011). Resistencia antibiótica del *Helicobacter Pylori* *Helicobacter pylori* ' s resistance to antibiotics, 167–169.
- Rugge, Massimo. Capellesso, Rocco. Nitti, D. (2017). Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Precancerous lesions in the stomach : From biology to clinical patient management. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(2), 205–223. <http://doi.org/10.1016/j.bpg.2012.12.007>
- Saeidi, E., & Sheikhshahrokh, A. (2016). *vacA* Genotype Status of *Helicobacter pylori* Isolated from Foods with Animal Origin, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/8701067>
- Sallas, et al. . (2017). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* , *cagA* , *dupA* and *oipA* Genotypes in Patients with Gastric Disease, (January). <http://doi.org/10.4236/aim.2017.71001>
- Sánchez-Cuén, et. . (2016). Regression of gastric intestinal metaplasia after the eradication of *Helicobacter pylori* infection in a hospital in Mexico. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 108(12), 770–775. <http://doi.org/10.17235/reed.2016.4194/2016>
- Sánchez-Cuén, et al. . (2015). Concordancia entre procedimientos diagnósticos invasivos para la infección por *Helicobacter pylori* en adultos, 57(4), 352–357.
- Sánchez-Delgado, J. (2013). Nuvas Estrategias Terapéuticas en la Infección por *Helicobacter pylori*.
- Schneider, et al. . (2015). DNA Methylation Predicts Progression of Human Gastric Lesions, (15), 1607–1614. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0388>
- Semper, et al. (2017). *Helicobacter pylori* – Induced IL-1 β Secretion in Innate Immune Cells Is Regulated by the NLRP3 Inflammasome and Requires the Cag Pathogenicity Island. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1400362>

- Sgouras, D. N., Thi, T., Trang, H., & Yamaoka, Y. (2015). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection, *20*, 8–16. <http://doi.org/10.1111/hel.12251>
- She, R. C., Wilson, A. R., & Litwin, C. M. (2009). Evaluation of *Helicobacter pylori* Immunoglobulin G (IgG), IgA , and IgM Serologic Testing Compared to Stool Antigen Testing □, *16*(8), 1253–1255. <http://doi.org/10.1128/CVI.00149-09>
- Sipponen, P., & Maarros, H. (2017). Chronic gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *5521*(April). <http://doi.org/10.3109/00365521.2015.1019918>
- Smith, et al. (2013). Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cag A gene in gastric biopsy specimens, *10*(13), 1958–1960.
- Stolte, M., Kroher, G., Meining, A., Morgner, A., Bayerdörffer, E., Bethke, B., ... Bethke, B. (2016). A Comparison of *Helicobacter pylori* and *H. heilmannii* Gastritis: A Matched Control Study Involving 404 Patients, *5521*(June). <http://doi.org/10.3109/00365529709025059>
- Suárez, Y. R., Samada, M., Cansino, J. G., Sabatier, C. A., Arroyo, M. M., Marrero, A., ... Rodríguez, L. (2005). Comparación de métodos en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales, *36*(3), 191–197.
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-omar, E. M., Miura, S., ... Uemura, N. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis, 1353–1367. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
- Sugimoto, et al, . (2009). Unreliability of Results of PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical or Environmental Samples □ †. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(3), 738–742. <http://doi.org/10.1128/JCM.01563-08>
- Suriani, R., Mb, M. C., Cardesi, E., Mazzucco, D., Marino, M., Grosso, S., ... Borghi, A. (2008). CagA and VacA *Helicobacter pylori* antibodies in gastric cancer, *22*(3), 255–258.
- Sylvana Ayala Rios, Oscar Pichilingue Prieto , Tito Capcha Loyola, Maria Esther Alba Rodriguez, C. P. R. (2013). Dyspepsia : clinical characteristics , endoscopic and histological findings in patients of the Hospital Nacional Hipolito Unanue , during 2010. *Sociedad de Gastroenterología Del Perú*, *33*(1), 28–33. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292013000100003
- Szkaradkiewicz, et al, . (2016). Expression of cagA , virB / D Complex and / or vacA Genes in *Helicobacter pylori* Strains Originating from Patients with Gastric Diseases, 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148936>
- Torres, L. E. (2008). Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*, *39*(1).

- Trujillo, E., Martínez, T., & Bravo, M. M. (2014). Genotipificación de los factores de virulencia *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico.
- Valenzuela, S. (2016). Estudio epidemiológico en la población ecuatoriana de los factores de riesgo asociados a la infección con *Helicobacter*.
- Vásquez, P. (2013). Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* y asociación con patologías gástricas en pacientes adultos de chequeo ejecutivo desde enero del 2010 hasta septiembre del 2012 del Hospital Metropolitano de Quito- Ecuador.
- Vega, et al, . (2010). Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in western Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.022>
- Vellejos et al, . (2003). Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori* : aspectos clínicos y moleculares, (562), 1313–1320.
- Watari, J., Chen, N., Amenta, P. S., Fukui, H., Oshima, T., Tomita, T., ... Das, K. M. (2014). *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis , clinical syndromes , precancerous lesions , and pathogenesis of gastric cancer development, 20(18), 5461–5473. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5461>
- Windsor, H. M. (2000). *Bacteriology and Taxonomy of Helicobacter*, 29(3), 633–648.
- Yadegar, et al. (2015). Infection , Genetics and Evolution Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs. *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION*, 35, 19–26. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.026>
- Yamaoka, Y. (2011). *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration, 15(9), 829–834. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02967.x>.*Helicobacter*
- Yamaoka, Y., & Graham, D. Y. (2014). *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis, 10, 1487–1500.
- Yep-Gamarra, et al, . (2016). Utilidad de la endoscopia sistemática con bicromoendoscopia para la detección de displasia en pacientes con lesiones premalignas gástricas. *Gastroenterología Y Hepatología*, 39(2), 49–54. <http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.08.005>

ANEXOS

Anexo 1. Autorización del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 para realizar el trabajo de investigación



Queseras del Medio 521 y Av.
Colombia
Teléfono: 2568009
www.hospitalmilitar.mil.ec

COMANDO CONJUNTO DE LAS FF.AA.

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES FUERZAS ARMADAS No. 1

Oficio No.16-210-HE-1-5
Quito, 17 de octubre de 2016

SEÑORITA ESTUDIANTE
DANIELA KATHERINE NÚÑEZ ACURIO

En su despacho.-

Asunto: Comunicando autorización

REF.: OF. No. 2016-0193-HE-1-10 CPIC

De mi consideración:

Para su conocimiento comunico a usted señorita Estudiante, que previo criterio favorable del Comité de Bioética y del Proceso de Investigación Clínica, esta Dirección le autoriza a que realice el trabajo de investigación sobre el tema: "DETECCIÓN DE GENES *vacA* Y *cagA* EN CEPAS DE *helicobacter pylori* OBTENIDAS DE UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE QUITO Y SU ASOCIACIÓN CON EL GRADO DE LESIÓN GÁSTRICA ", por lo que agradeceré se sirva dar cumplimiento a las normativas vigentes en esta Casa de Salud.

Atentamente,

10 OCT 2016
DIRECCION DE
SERVICIOS DE SALUD
HOSPITALARIOS

Dr. Leonardo Crespo Jara

Coronel CSM.

DIRECTOR DE SERVICIOS DE SALUD HOSPITALARIOS

Elaborado por: Tga. Marcela Navarrete
Revisado por: CRNL CSM. Crespo L.
Supervisado por: CRNL CSM. Crespo L.

Distribución:

Orig.: Dest.
Copia: HE-1-5
Ref.: 2677



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO
DE INVESTIGACIÓN**

Título de la investigación: “Diversidad génica de factores de patogenicidad *cagA* y *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a los antibióticos aisladas de pacientes sintomáticos que acuden a 2 Hospitales de la ciudad de Quito”

¿Cuál es el propósito del estudio?

El estudio determinará la presencia de factores de virulencia en cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a antibacterianos utilizados en el tratamiento.

¿Qué sucederá en este estudio?

Durante el estudio un personal entrenado realizará el procedimiento para extracción del material biológico (biopsia gástrica) que servirán para la investigación de *H. pylori*.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?

Los resultados inmediatos obtenidos de las pruebas realizadas en el estudio, ayudará al personal médico para mejorar el tratamiento y disminuir el fallo terapéutico, por tanto los resultados serán de mucha importancia para los futuros usuarios de nuestra casa de salud.

¿Cuáles son los posibles riesgos de participar en este estudio?

No existe ningún riesgo debido a que las muestras que se utilizarán para el estudio son las de biopsia gástrica obtenida de la endoscopia a la que usted se está sometiendo.

¿Tengo que participar?

La decisión de participar es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, todos los servicios que usted recibe en este hospital continuarán, sin ningún cambio. También puede optar por retractarse más adelante y dejar de participar. No se le paga por participar y usted no tiene que pagar nada por participar en este estudio.

¿Mis registros se mantendrán en privado?

Se mantendrá la confidencialidad de cualquier información personal que se obtiene en relación con este estudio. Los datos se introducirán en una base de datos segura, a la que sólo los investigadores con clave, tendrán acceso. Usted será identificado por un número en la base de datos.

FIRMAS

Su firma en este formulario indica que usted ha entendido satisfactoriamente la información sobre su participación en el proyecto de investigación y está de acuerdo en participar. De ninguna manera renuncia a sus derechos legales, ni libera a los investigadores de sus responsabilidades legales y profesionales. Si tiene más preguntas sobre los asuntos relacionados con esta investigación, por favor póngase en contacto con:

Nombre del contacto: Jorge Reyes

Teléfonos: 0994551824

Email: jorgereyes83@gmail.com

a) Nombre del/la participante

Firma y fecha

c) Jorge Reyes/Daniela Núñez

Firma y fecha

Una copia firmada de este formulario de consentimiento se le ha entregado a usted para que la guarde y la conserve

RETRACCIÓN:

Título del estudio:

Fecha: _____

Motivo de la retracción (obligatorio):

Anexo 3. Base de datos de información clínica

N°	<u>DATOS CLÍNICOS</u>					<u>HISTORIA CLÍNICA</u>			
	HC	GENERO	EDA	MUESTRA	CIE-10	DIAGNÓSTICO CIE-10	D. ENDOSCÓPICO	D. HISTOLÓGICO	GRADO DE LESIÓN
1	505065	Femenino	34	HMI-HP1	K29.7	Gastritis, no especificada	Nodular	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
2	104516	Masculino	50	HMI-HP2	K29.7	Gastritis, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
3	36752	Masculino	75	HMI-HP3	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
4	20654	Masculino	68	HMI-HP4	K29.3	Gastritis crónica superficial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
5	38008	Femenino	70	HMI-HP5	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
6	57158	Femenino	55	HMI-HP6	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
7	46950	Masculino	78	HMI-HP7	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
8	254314	Masculino	47	HMI-HP8	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
9	122318	Femenino	57	HMI-HP9	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
10	107820	Femenino	60	HMI-HP10	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
11	87050	Masculino	61	HMI-HP11	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
12	163785	Femenino	50	HMI-HP12	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
13	13246	Femenino	69	HMI-HP13	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
14	177229	Femenino	52	HMI-HP14	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
15	97745	Femenino	70	HMI-HP15	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
16	9469	Femenino	66	HMI-HP16	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17	23120	Masculino	68	HMI-HP17	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
18	25384	Masculino	84	HMI-HP18	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta

19	18208 3	Masculino	65	HMI-HP19	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
20	12547 5	Masculino	67	HMI-HP20	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
21	15731 3	Masculino	48	HMI-HP21	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
22	50441 1	Femenino	45	HMI-HP22	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
23	4497	Femenino	67	HMI-HP23	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
24	96692	Masculino	53	HMI-HP24	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
25	88766	Masculino	85	HMI-HP25	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
26	43139 7	Femenino	29	HMI-HP26	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
27	16222 4	Masculino	48	HMI-HP27	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
28	81561	Masculino	74	HMI-HP28	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
29	21237 7	Masculino	49	HMI-HP29	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
30	13187 2	Femenino	71	HMI-HP30	K30	Dispepsia	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
31	72221 3	Femenino	74	HMI-HP31	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
32	4188	Femenino	51	HMI-HP32	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
33	22587 6	Femenino	55	HMI-HP33	K29.3	Gastritis crónica superficial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
34	2941	Masculino	72	HMI-HP34	K29.3	Gastritis crónica superficial	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
35	7355	Femenino	77	HMI-HP35	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
36	8751	Femenino	73	HMI-HP36	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
37	12183	Femenino	78	HMI-HP37	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
38	1787	Masculino	66	HMI-HP38	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
39	33338	Masculino	65	HMI-HP39	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
40	41229 8	Femenino	37	HMI-HP40	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal

41	14669 6	Masculino	51	HMI-HP41	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
42	11405 8	Masculino	54	HMI-HP42	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
43	30281	Masculino	73	HMI-HP43	K29.7	Gastritis, no especificada	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
44	94818	Femenino	61	HMI-HP44	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
45	13352 0	Masculino	48	HMI-HP45	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
46	39453 3	Femenino	20	HMI-HP46	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
47	31152 2	Masculino	46	HMI-HP47	K29.7	Gastritis, no especificada	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
48	17565 6	Masculino	79	HMI-HP48	K20	Esofagitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
49	31443	Masculino	67	HMI-HP49	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
50	43953 9	Masculino	60	HMI-HP50	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
51	13110	Masculino	73	HMI-HP51	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
52	25427	Femenino	68	HMI-HP52	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
53	8719	Femenino	73	HMI-HP53	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
54	14862	Femenino	66	HMI-HP54	K24	Úlcera gástrica	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
55	30060 0	Femenino	37	HMI-HP55	K29.7	Gastritis, no especificada	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
56	2062	Femenino	71	HMI-HP56	K27	Úlcera péptica	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
57	18537 3	Masculino	48	HMI-HP57	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
58	4517	Femenino	67	HMI-HP58	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
59	16560 3	Masculino	47	HMI-HP59	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
60	19596 3	Masculino	47	HMI-HP60	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
61	44250 7	Femenino	32	HMI-HP61	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofágico	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica

62	8692	Masculino	66	HMI-HP62	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
63	52650	Masculino	82	HMI-HP63	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
64	20829 7	Masculino	41	HMI-HP64	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
65	49263 8	Femenino	34	HMI-HP65	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
66	13001 1	Masculino	56	HMI-HP66	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
67	24652 8	Masculino	42	HMI-HP67	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
68	50756 4	Femenino	26	HMI-HP68	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
69	29539 0	Femenino	58	HMI-HP69	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
70	31136	Masculino	54	HMI-HP70	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
71	13659 4	Masculino	48	HMI-HP71	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
72	30228 5	Femenino	60	HMI-HP72	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
73	24511	Femenino	72	HMI-HP73	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
74	46059 0	Femenino	55	HMI-HP74	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
75	10974 4	Masculino	60	HMI-HP75	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
76	49119 5	Masculino	33	HMI-HP76	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
77	22107 2	Masculino	55	HMI-HP77	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
78	17308 1	Masculino	46	HMI-HP78	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
79	42876	Masculino	78	HMI-HP79	K29.6	Otras gastritis	Nodular	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
80	50686 8	Masculino	55	HMI-HP80	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
81	24729 3	Femenino	58	HMI-HP81	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
82	4759	Femenino	62	HMI-HP82	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica

83	11783 5	Masculino	54	HMI-HP83	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
84	97953	Femenino	53	HMI-HP84	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
85	24046 8	Femenino	60	HMI-HP85	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
86	50767 7	Masculino	54	HMI-HP86	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
87	43312 4	Masculino	51	HMI-HP87	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
88	11498 7	Masculino	50	HMI-HP88	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
89	25028 8	femenino	53	HMI-HP89	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
90	86139	Masculino	63	HMI-HP90	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
91	40384	Masculino	69	HMI-HP91	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
92	11528 1	Masculino	46	HMI-HP92	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
93	16324	Masculino	78	HMI-HP93	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
94	54000	Masculino	54	HMI-HP94	K30	Dispepsia	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
95	10076	femenino	67	HMI-HP95	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
96	49212 1	Masculino	47	HMI-HP96	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
97	13269	Masculino	64	HMI-HP97	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
98	19123 3	Masculino	51	HMI-HP98	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
99	20344 9	Masculino	55	HMI-HP99	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
100	20739 5	femenino	55	HMI-HP100	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
101	12107 0	Masculino	49	HMI-HP101	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
102	52245	Masculino	49	HMI-HP102	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
103	14360	Masculino	77	HMI-HP103	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
104	10878	femenino	68	HMI-HP104	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa

105	281036	Masculino	18	HMI-HP105	K29.1	Otras gastritis agudas	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
106	404088	femenino	27	HMI-HP106	K29.7	Gastritis, no especificada	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
107	274007	femenino	58	HMI-HP107	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
108	506650	femenino	29	HMI-HP108	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
109	359153	Masculino	31	HMI-HP109	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
110	8647	femenino	73	HMI-HP110	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
111	152538	Masculino	48	HMI-HP111	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
112	79488	Masculino	46	HMI-HP112	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
113	86380	Masculino	51	HMI-HP113	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofágial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
114	183750	Masculino	55	HMI-HP114	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
115	117605	Masculino	66	HMI-HP115	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
116	172856	Femenino	80	HMI-HP116	K24	Úlcera gástrica	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
117	82371	Femenino	58	HMI-HP117	K29.7	Gastritis, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
118	506618	Masculino	29	HMI-HP118	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
119	247786	Masculino	51	HMI-HP119	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
120	264886	Masculino	49	HMI-HP120	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
121	202153	Femenino	50	HMI-HP121	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
122	481145	Masculino	71	HMI-HP122	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
123	416217	Femenino	62	HMI-HP123	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
124	119400	Masculino	49	HMI-HP124	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica

12 5	18988 0	Masculino	47	HMI- HP125	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
12 6	15741 2	Femenino	59	HMI- HP126	K29.7	Gastritis, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
12 7	26135	Masculino	68	HMI- HP127	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
12 8	28168	Femenino	63	HMI- HP128	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
12 9	33204	Femenino	45	HMI- HP129	K29	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
13 0	34376	Femenino	74	HMI- HP130	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
13 1	30302 2	Femenino	65	HMI- HP131	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
13 2	6269	Masculino	50	HMI- HP132	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
13 3	5377	Masculino	74	HMI- HP133	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
13 4	14635 0	Femenino	28	HMI- HP134	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
13 5	26007 9	Masculino	52	HMI- HP135	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
13 6	16775 2	Femenino	57	HMI- HP136	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
13 7	35049	Masculino	84	HMI- HP137	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
13 8	21591	Femenino	60	HMI- HP138	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
13 9	13632 1	Femenino	61	HMI- HP139	K29.6	Otras gastritis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
14 0	48495	Masculino	62	HMI- HP140	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
14 1	3455	Masculino	29	HMI- HP141	K29.9	Gastroduodenitis, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
14 2	29044	Masculino	78	HMI- HP142	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
14 3	28498 2	Masculino	38	HMI- HP143	K29.7	Gastritis, no especificada	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
14 4	15408 2	Masculino	49	HMI- HP144	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal

14 5	20708 1	Masculino	46	HMI- HP145	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
14 6	34739	Masculino	81	HMI- HP146	K29.4	Gastritis crónica atrofica	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
14 7	44125	Masculino	60	HMI- HP147	K29.4	Gastritis crónica atrofica	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
14 8	7009	Femenino	76	HMI- HP148	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
14 9	49502 6	Masculino	53	HMI- HP149	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
15 0	88385	Masculino	62	HMI- HP150	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
15 1	72663	Femenino	60	HMI- HP151	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Combinada	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
15 2	99933	Masculino	64	HMI- HP152	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
15 3	18902 8	Femenino	52	HMI- HP153	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
15 4	16247 6	Masculino	50	HMI- HP154	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Erosiva	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
15 5	16897 4	Femenino	52	HMI- HP155	K22	Otras enfermedades del esófago	Erosiva	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
15 6	26513 7	Masculino	49	HMI- HP156	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Combinada	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
15 7	85307	Femenino	59	HMI- HP157	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
15 8	21203 8	Femenino	47	HMI- HP158	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
15 9	76961	Masculino	68	HMI- HP159	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
16 0	14461 3	Femenino	55	HMI- HP160	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
16 1	30458 3	Femenino	64	HMI- HP161	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica
16 2	2248	Masculino	66	HMI- HP162	K29.6	Otras gastritis	Erosiva	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal completa
16 3	88612	Femenino	57	HMI- HP163	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrofica	Metaplasia intestinal incompleta
16 4	53659	Masculino	41	HMI- HP164	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrofica	Gastritis no atrofica

16 5	34013 6	Femenino	61	HMI- HP165	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
16 6	22076 8	Masculino	50	HMI- HP166	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
16 7	15703 7	Masculino	51	HMI- HP167	K29.7	Gastritis, no especificada	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
16 8	33764 9	Femenino	57	HMI- HP168	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
16 9	71072	Masculino	84	HMI- HP169	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
17 0	26094 4	Femenino	41	HMI- HP170	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
17 1	37124 4	Femenino	79	HMI- HP171	K29.6	Otras gastritis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 2	77112	Masculino	71	HMI- HP172	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 3	15419	Femenino	54	HMI- HP173	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
17 4	18276 9	Femenino	51	HMI- HP174	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
17 5	78634	Masculino	62	HMI- HP175	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 6	36428	Masculino	67	HMI- HP176	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 7	48639 1	Masculino	25	HMI- HP177	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 8	16970 4	Femenino	55	HMI- HP178	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
17 9	19142 2	Masculino	47	HMI- HP179	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 0	22794 7	Femenino	65	HMI- HP180	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofágico	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 1	37271 1	Masculino	45	HMI- HP181	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 2	46238	Masculino	79	HMI- HP182	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 3	49756	Masculino	75	HMI- HP183	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 4	93020	Masculino	63	HMI- HP184	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal

18 5	13242 1	Masculino	53	HMI- HP185	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
18 6	16348	Femenino	67	HMI- HP186	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
18 7	39997 5	Masculino	36	HMI- HP187	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
18 8	17088 0	Masculino	52	HMI- HP188	K29.1	Otras gastritis agudas	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
18 9	12793 2	Femenino	77	HMI- HP189	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
19 0	82720	Femenino	67	HMI- HP190	K30	Dispepsia	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 1	6135	Masculino	72	HMI- HP191	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 2	26013 1	Femenino	44	HMI- HP192	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
19 3	43577 8	Femenino	71	HMI- HP193	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 4	12003 7	Femenino	53	HMI- HP194	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
19 5	90685	Masculino	65	HMI- HP195	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofágial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 6	41934 1	Femenino	31	HMI- HP196	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
19 7	50925 6	Masculino	53	HMI- HP197	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 8	36114 2	Masculino	46	HMI- HP198	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
19 9	69122	Masculino	60	HMI- HP199	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
20 0	73703	Masculino	70	HMI- HP200	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
20 1	24346	Masculino	67	HMI- HP201	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
20 2	4096	Femenino	70	HMI- HP202	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
20 3	21381 3	Femenino	50	HMI- HP203	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
20 4	19227 7	Masculino	48	HMI- HP204	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica

205	120409	Masculino	50	HMI-HP205	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
206	434698	Femenino	62	HMI-HP206	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
207	165528	Femenino	56	HMI-HP207	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
208	465570	Femenino	34	HMI-HP208	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
209	25106	Masculino	70	HMI-HP209	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Erosiva	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
210	150374	Masculino	50	HMI-HP210	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
211	103558	Femenino	57	HMI-HP211	K29.4	Gastritis crónica atrófica	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
212	173888	Femenino	47	HMI-HP212	K29.6	Otras gastritis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
213	370851	Masculino	64	HMI-HP213	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
214	384	Masculino	64	HMI-HP214	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
215	191188	Masculino	54	HMI-HP215	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
216	252302	Femenino	39	HMI-HP216	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal incompleta
217	188069	Masculino	57	HMI-HP217	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
218	46667	Femenino	61	HMI-HP218	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
219	29281	Masculino	61	HMI-HP219	K29	Gastritis y duodenitis	Erosiva	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
220	68365	Masculino	63	HMI-HP220	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
221	146559	Femenino	47	HMI-HP221	K29.6	Otras gastritis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
222	13197	Femenino	66	HMI-HP222	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
223	57854	Masculino	59	HMI-HP223	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
224	264891	Masculino	59	HMI-HP224	K29.5	Gastritis crónica, no especificada	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa

22 5	44606	Femenino	72	HMI- HP225	K21	Enfermedad del reflujo gastroesofagial	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
22 6	98953	Masculino	75	HMI- HP226	Z78	Chequeo Pre quirúrgico	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
22 7	95864	Femenino	53	HMI- HP227	K29	Gastritis y duodenitis	Combinada	Gastritis crónica atrófica	Atrofia gástrica multifocal
22 8	37332	Masculino	56	HMI- HP228	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica no atrófica	Gastritis no atrófica
22 9	12281 1	Masculino	49	HMI- HP229	Z57.8	Exposición ocupacional a otros factores	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
23 0	11460	Femenino	76	HMI- HP230	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa
23 1	16455 0	Masculino	57	HMI- HP231	K29	Gastritis y duodenitis	Eritematosa	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal completa

Anexo 4. Control de Calidad del agar Columbia

	CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO (Agares - Semisólidos - Líquidos)		Código:	F-MDC-032
			Edición:	00
	MACRO PROCESO: Vigilancia Epidemiológica y Laboratorio de Referencia Nacional.	PROCESO INTERNO: Centro de Referencia Nacional de Medios de Cultivo.	Fecha Aprobación:	15/08/2016

NOMBRE: Agar Columbia
CÓDIGO: ACo081216
FECHA DE RECEPCIÓN: 13 de Diciembre del 2016
FECHA DE ELABORACIÓN: 08 de Diciembre del 2016
FECHA DE EXPIRACIÓN: 08 de Enero del 2017 a 2-8°C

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS				RESULTADOS
COLOR:	Rojo			CONFORME
VOLUMEN:	25 ml C/U			CONFORME
PRESENTACIÓN:	Cajas Monopetri Plásticas			CONFORME
pH:	N/A			N/A
CONTROL DE ESTERILIDAD A 35°C ± 2 °C POR 24 HORAS				RESULTADOS
A 36°C X 24 HORAS NO SE OBSERVO MACROSCÓPICAMENTE NI MICROSCÓPICAMENTE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS				N/A
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CON INCUBACIÓN A 35°C ± 2 °C 48 HORAS (NORMA ISO/TS11133-2)				RESULTADOS
Microorganismo	Características Físicas / Características Químicas	Selectividad	Productividad	
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	CRECIMIENTO ESCASO	NO	NO	CONFORME
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	CRECIMIENTO ESCASO	NO	NO	CONFORME
% Productividad		N/A	N/A	CONFORME

Nota: Este medio de cultivo fue elaborado por el Laboratorio de Bacteriología de la Sede Zonal Quito. El certificado de control de calidad solo respalda el parametro microbiológico del medio de cultivo.

Responsable:	MGS. Q.F Sandra Uruchima Campoverde	Firma:	
--------------	-------------------------------------	--------	---

Esta prohibida la reproducción total o parcial. Este documento es de propiedad del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública