
Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* por PCR en jugo gástrico y biopsias gastroesofágicas de pacientes dispépticos.

Ligia Abrante¹, Nelson Reyes¹, M. Alexandra García-Amado¹, Paula Suárez², Roberto Romero³, Fabián Michelangeli¹ y Mónica Contreras¹.

¹Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

²Laboratorio de Organismos Acuáticos, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar (USB).

³Servicio Oncológico Hospitalario del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS). El Cementerio, Caracas. Venezuela.

Palabras clave: jugo gástrico, biopsias gastroesofágicas, PCR, *H. pylori*.

Resumen. *Helicobacter pylori* es el principal agente bacteriano implicado en lesiones gastroduodenales inflamatorias en humanos y una de las bacterias patógenas más comunes, con una alta prevalencia en Venezuela. El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se realiza frecuentemente en biopsias gástricas mediante PCR; sin embargo, el jugo gástrico y las biopsias esofágicas podrían también ser utilizadas como muestras alternativas para determinar la infección. En el presente trabajo se evaluó la infección por *H. pylori* en diferentes muestras del tracto digestivo superior de pacientes dispépticos, mediante la detección por PCR de genes esenciales (*glmM* y *ureA*) y de virulencia (*cagA*). De los 104 pacientes estudiados, *H. pylori* fue encontrado en 53,8; 69,2 y 58,7% de las muestras de jugo gástrico y biopsias gástricas y esofágicas, respectivamente, con una predominancia de cepas tipo I (*cagA*+) en jugo y biopsias gástricas y cepas tipo II (*cagA*-) en biopsias esofágicas. La detección de *H. pylori* en jugo gástrico y biopsias esofágicas mostró una alta sensibilidad y especificidad en relación a la detección en biopsias gástricas, lo cual sugiere que ambos tipos de muestras pueden ser utilizados eficazmente para un diagnóstico seguro de la infección por *H. pylori*.

Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR in gastric juice and gastroesophageal biopsies from dyspeptic patients

Invest Clin 2012; 53(2): 168 - 177

Keywords: gastric juice, gastroesophageal biopsies, PCR, *H. pylori*.

Abstract. *Helicobacter pylori* is the main bacterial agent implicated in human gastroduodenal inflammatory pathologies; being one of the most common bacterial pathogens, with a high prevalence in Venezuela. The diagnosis of *H. pylori* infection is performed primarily in gastric biopsies through PCR; however, string-absorbed gastric juice and esophageal biopsies could be also used as alternative specimens to determine the infection. In this study the *H. pylori* infection was assessed in different specimens of the upper tract digestive of dyspeptic patients, though the detection by PCR of essential genes (*glmM* and *ureA*) and genes encoding virulence factors (*cagA*). Of 104 patients studied, *H. pylori* was found in 53.8, 69.2 and 58.7% of gastric juice, and gastric and esophageal biopsies, respectively; with predominance of the strains type I (*cagA*+) in juice and gastric biopsies, and strains type II (*cagA*-) in esophageal biopsies. The detection of *H. pylori* in gastric juice and esophageal biopsies showed high sensitivity and specificity, in comparison with the detection in gastric biopsies, suggesting that both types of specimens may be used efficiently for a secure diagnosis of *H. pylori* infection.

Recibido: 09-12-2011. Aceptado: 07-06-2012

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria genéticamente diversa, implicada en numerosas enfermedades gastroduodenales tales como gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa, por sus siglas en inglés) (1). Su capacidad para sobrevivir y adaptarse a las condiciones fisiológicas excepcionales de la mucosa gástrica, le permite colonizar y persistir en el estómago durante años (2). A nivel mundial se ha reportado una alta prevalencia de infección por *H. pylori*, con un alto porcentaje de casos asintomáticos, por lo que es considerada una de las más comunes en humanos con alta morbilidad y baja mortalidad (3). En países desarrollados, se encuentra infectada menos del 30% de la pobla-

ción; mientras que en países en vías de desarrollo, la prevalencia oscila entre el 50 y 90% (4, 5). En Venezuela, estudios recientes han revelado una alta prevalencia de la infección tanto en niños y adolescentes (65%) como en adultos sintomáticos y asintomáticos (46-95%) (6-8). Sin embargo, son pocos los estudios reportados en pacientes asintomáticos a nivel epidemiológico.

En vista de la clara asociación entre esta bacteria y un número importante de enfermedades gastroduodenales, se han desarrollado diversos métodos diagnóstico, de los cuales las técnicas moleculares son las más aplicadas en laboratorios de investigación y clínica, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a su alta sensibilidad y especificidad (9). A diferencia de otras técnicas como la histología y/o la serología, la PCR permite la rápi-

da detección de genes específicos que contribuyen al diagnóstico y tratamiento adecuado de la infección (10).

A pesar de que *H. pylori* se desarrolla principalmente en la mucosa gástrica, recientemente se ha encontrado en otros sitios del tracto digestivo superior tales como jugo gástrico y mucosa esofágica; la colonización en esta última es inducida principalmente por el reflujo del jugo gástrico como consecuencia de una hipersecreción ácida del estómago (11). De manera que su presencia ha sido también implicada en patologías severas del esófago, aunque esto no ha sido claramente demostrado (12). No obstante, en Venezuela no hay antecedentes de estudios dirigidos a la validación del uso de biopsias esofágicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

La detección de *H. pylori* en el jugo gástrico se ha determinado mediante el uso de la prueba del hilo (o cápsula Entero-test pediátrica), empleada inicialmente para el diagnóstico de parásitos gastroduodenales tales como *Giardia lamblia* y bacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Mycobacterium tuberculosis* (13). Es un método fácil, seguro y poco invasivo para la población general, tanto a nivel clínico como epidemiológico, es altamente sensible y específico con particular valor en niños menores de 3 años para determinar el comienzo de la infección (10,13).

El diagnóstico por PCR para detectar directamente *H. pylori* en muestras clínicas provee una sensibilidad tan alta como el cultivo para la detección de la infección (13). Este método puede ser realizado mediante la amplificación de genes esenciales y de virulencia. Los genes esenciales están presentes en todas las cepas y definen el estatus de la infección como *glmM* que codifica para la enzima fosfoglucoSAM mutasa (14) y *ureA* de la ureasa A (15). Los genes de virulencia definen el grado de patogenicidad de la bacteria de acuerdo al tipo de

cepa presente, el gen A asociado a la citotoxina (*cagA*) es el más estudiado como factor de virulencia de *H. pylori* (16, 17). De acuerdo al grado de patogenicidad se han definido 2 tipos de cepas, tipo I *cagA* (+) y tipo II *cagA* (-) (17). Así mismo, el gen ARN ribosomal 16S ha sido ampliamente usado en estudios taxonómicos y filogenéticos para la detección e identificación de especies del género *Helicobacter* (18).

En el presente estudio se determinó la prevalencia de la infección por *H. pylori* en muestras de jugo gástrico y biopsias gastroesofágicas de pacientes dispépticos, mediante la amplificación por PCR de genes esenciales y de virulencia (*glmM*, *ureA* y *cagA*) propios de la bacteria a fin de diagnosticar la infección en muestras de distintas procedencias en el tracto gastroduodenal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Participaron en el estudio 104 pacientes voluntarios dispépticos (con síntomas en el tracto digestivo superior como ardor o acidez, presión abdominal, gases estomacales o flatulencia, náuseas o vómitos y reflujo) (19), con edades comprendidas entre 17 y 70 años, que acudieron por primera vez a consulta médica en el Servicio Oncológico Hospitalario-IVSS de Caracas (antiguo Hospital Padre Machado) entre Octubre del año 2008 hasta Marzo del 2010. En cumplimiento con los requerimientos éticos, todos los pacientes incluidos fueron informados sobre el estudio y firmaron un consentimiento escrito. El criterio de inclusión utilizado fue no haber recibido antibióticos, sales de bismuto o inhibidores de la bomba de protones por al menos un mes previo a la toma de las muestras. El protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y del Servicio Oncológico Hospitalario-IVSS.

Tipos de muestras

Antes de realizar la endoscopia, el paciente en ayunas ingirió una cápsula Entero-test pediátrica o prueba del hilo (HDL Corp., USA), que consistió en un hilo de nylon absorbente (90 cm) enrollado dentro de una cápsula de gelatina para facilitar su deglución, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez ingerida la cápsula, el extremo superior del hilo se fijó a un lado de la boca del paciente y 1 hora después se retiró. Posteriormente, el médico tratante, tomó biopsias gastroesofágicas, durante la endoscopia. De cada paciente se tomaron dos biopsias, una en la región antral del estómago y otra en la mucosa esofágica (tercio inferior y/o 2 cm de la línea Z). Las muestras de hilo con el jugo gástrico absorbido y las biopsias gastroesofágicas fueron transportadas al Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal y conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción del ADN

El hilo con el jugo gástrico absorbido se colocó en un tubo de centrífuga de 15 mL que contenía 10 mL de solución salina (0,9%), se agitó vigorosamente con vórtex y se retiró el hilo. La suspensión se centrifugó a 12000g durante 20 minutos, de acuerdo con el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal (10). El ADN genómico del precipitado del jugo gástrico y de las biopsias gastroesofágicas fue extraído utilizando el estuche Mini DNA Qiapm QIAGEN de acuerdo al protocolo del fabricante (QIAGEN, Valencia, CA, USA).

Análisis de PCR específico para el género *Helicobacter* y especie *H. pylori*

Se realizaron cuatro reacciones de PCR por cada muestra de jugo gástrico y biopsias (gástrica y esofágica) de cada paciente. La primera reacción de PCR se realizó para determinar el género *Helicobacter*,

utilizando cebadores que amplifican una región específica del gen ARNr 16S de 399 pb (20) y tres reacciones posteriores para detectar la especie, *H. pylori*, con cebadores que amplifican dos genes específicos, *glmM* de 294 pb (21) y *ureA* de 491 pb (22), y un gen de virulencia, *cagA* de 128 pb (23). Las reacciones de PCR (PCRs) fueron realizadas mediante el estuche "PCR Master Mix" (Promega Corporation, Madison, USA), en un termociclador modelo GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystems, Hayward, CA) y con las mismas condiciones de ciclos de amplificación para cada par de cebadores, descritas previamente por los autores. Cada reacción contenía todos los componentes de PCR, más 1 a 6 μL de ADN, 3 μL de la mezcla de cada par de cebadores (concentración final 5 μM) y agua estéril para completar un volumen final de 25 μL . El control negativo de la reacción se realizó sin ADN, mientras que el control positivo correspondió a 1 μL de ADN de una cepa de referencia de *H. pylori* (Hp26695). Posteriormente, 15 μL de cada reacción de PCR (o amplicon) se visualizó por corrida electroforética con el tampón de carga y bromuro de etidio en un gel de agarosa TBE al 2% permitiendo la detección del producto amplificado.

Análisis estadístico

Las comparaciones de detección entre tipos de muestras para cada gen y prevalencias en la población estudiada fueron realizadas usando pruebas Chi-cuadrado, con el programa estadístico R2.9.2. Para evaluar el grado de concordancia entre los resultados de detección de los genes de *H. pylori*, se utilizó el Índice de Kappa. La sensibilidad y especificidad de las muestras usadas fue determinada mediante pruebas diagnósticas simples con un 95% de confianza. Ambas pruebas se realizaron con el programa estadístico Epidat3.1 y tomando como regla dorada la detección en biopsias gástricas.

RESULTADOS

El gen ARNr 16S, perteneciente al género *Helicobacter* spp., se detectó en 56 (53,8%) de las muestras de jugo gástrico de los 104 pacientes estudiados, 71 (68,3%) de biopsia gástrica y 59 (56,7%) de biopsia esofágica (Tabla I). Los genes *glmM* y *ureA*, específicos de *H. pylori*, se encontraron en proporciones similares a la detección del ARNr 16S, como se indica en la Tabla I. Mientras que el gen *cagA* se detectó en 32 (30,8%), 38 (36,5%) y 22 (21,2%) de las muestras de jugo gástrico, biopsia gástrica y biopsia esofágica, respectivamente. Este último fue el más variable por ser un gen que puede o no estar presente en el ADN genómico de *H. pylori*. Al comparar la detección de cada uno de los genes entre tipos de muestras, no se observaron diferencias significativas.

Dos de los genes de *H. pylori* utilizados ampliamente para definir el estatus de la infección son el *glmM* y el *ureA*. En los 104 pacientes estudiados se encontró que estos dos genes estaban presentes en la mayor parte de las muestras *Helicobacter* spp. positivas (Tabla I), con una concordancia muy buena en la detección de ambos genes tanto en jugo como en biopsia gástrica

(Kappa=0,92 y 0,87; respectivamente) y buena en biopsia esofágica (Kappa= 0,77).

En los tres tipos de muestras estudiadas hubo una alta detección de *H. pylori* con una prevalencia promedio del 59,6%. Al estudiar la detección de cepas en la población, se encontró una predominancia de cepas tipo I en las muestras de jugo y biopsia gástrica (57,1 y 53,5%, respectivamente) y de cepas tipo II en biopsia esofágica (62,7%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la detección de los tipos de cepas entre muestras (Tabla II).

Los resultados obtenidos de las PCRs en biopsias gástricas se tomaron como criterio absoluto o "regla dorada" para la evaluación de la infección por *H. pylori* en las muestras de jugo y biopsia esofágica. La sensibilidad de las PCRs en estos tipos de muestras fue de 79 y 83%, respectivamente, mientras que la especificidad fue del 100% en ambas (Tabla III).

DISCUSIÓN

En los tres tipos de muestras estudiadas hubo una alta detección de *H. pylori*, lo que demuestra un diagnóstico seguro de la infección en el tracto digestivo superior. El hilo gástrico permite la recolección de bac-

TABLA I
DETECCIÓN DE GENES ESENCIALES Y DE VIRULENCIA DE *H. pylori* EN MUESTRAS DE JUGO GÁSTRICO, BIOPSIA GÁSTRICA Y BIOPSIA ESOFÁGICA DE PACIENTES SINTOMÁTICOS

Genotipo	Tipo de Muestra						p
	Jugo Gástrico (n=104)		Biopsia Gástrica (n=104)		Biopsia Esofágica (n=104)		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
ARNr 16S	56	53,8	71	68,3	59	56,7	N.S. ¹
<i>glmM</i>	54	51,9	67	64,4	53	51,0	N.S.
<i>ureA</i>	54	51,9	69	66,3	53	51,0	N.S.
<i>cagA</i>	32	30,8	38	36,5	22	21,2	N.S.

Método estadístico usado: Pruebas diagnósticas simples. IC: 95%. ¹N.S. = Diferencia no significativa.

TABLA II
DETECCIÓN DE CEPAS DE *H. pylori* SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA

Tipo de Cepa	Tipo de Muestra						p
	Jugo Gástrico (n=104)		Biopsia Gástrica (n=104)		Biopsia Esofágica (n=104)		
	N°	%	N°	%	N°	%	
Tipo I (<i>cagA</i> +)	32	57,1	38	53,5	22	37,3	N.S. ¹
Tipo II (<i>cagA</i> -)	24	42,9	33	46,5	37	62,7	N.S.
Negativos	48	46,2	33	31,7	45	43,3	N.S.

Método estadístico usado: Pruebas diagnósticas simples. IC: 95%. ¹N.S.= Diferencia no significativa.

TABLA III
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*
EN JUGO GÁSTRICO Y BIOPSIAS ESOFÁGICAS EN RELACIÓN A BIOPSIAS GÁSTRICAS

		Biopsia Gástrica (n=104)			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
		+	-	Total		
Jugo Gástrico (n=104)	+	56	0	56	79	100
	-	15	33	48		
	Total	71	33	104		
Biopsia Esofágica (n=104)	+	59	0	59	83	100
	-	12	33	45		
	Total	71	33	104		

Método estadístico usado: Pruebas diagnósticas simples. IC: 95%.

terias presentes en el jugo gástrico para la obtención de ADN o de cepas bacterianas, con una mínima incomodidad para el paciente, durante en el proceso y una alternativa viable para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* (10, 13). La toma de muestras de jugo gástrico para detectar *H. pylori* es poco empleada en Venezuela, a pesar de que es una técnica fácil de realizar. Se basa en la adhesión de las bacterias circulantes en el jugo gástrico a un hilo de nylon, que llega hasta la primera porción del duodeno (10). Los inconvenientes asociados a este método se presentan por contaminación u obtención insuficiente de muestra debido a una baja concentración

bacteriana y poco jugo gástrico presente, así mismo, al realizar este tipo de muestreo no se puede establecer el nicho exacto de la bacteria, por lo que es probable que la detección provenga del estómago, esófago, u otro lugar a lo largo del tracto gastroduodenal (8).

Las biopsias gástricas, por su parte, son ampliamente usadas para la detección de *H. pylori* o cepas bacterianas (13), aun cuando son obtenidas por un método invasivo y representan una molestia para el paciente. Este es el primer estudio, del conocimiento de los autores, en el que se utilizan biopsias esofágicas para la detección de *H. pylori* en pacientes sintomáticos venozo-

lanos. Su uso a nivel mundial con fines diagnóstico está dirigido principalmente al papel que juega la bacteria en patologías del esófago, como esofagitis por reflujo o enfermedad por reflujo gastroesofágico, esófago de Barrett y carcinoma esofágico (25, 26), hecho que aun sigue siendo controversial y que no ha sido claramente establecido. Sin embargo, hasta el presente no se conocen estudios previos sobre la validación de esta técnica como prueba diagnóstica de la infección en las muestras clínicas. Estudios recientes en el laboratorio han mostrado una alta prevalencia de *H. pylori* en la mucosa gastroesofágica (86%) de pacientes dispépticos, lo cual sugiere que la existencia de esta bacteria en el esófago es probablemente una consecuencia de la infección gástrica, mas no es la especie residente dominante (24).

La semejanza encontrada al comparar la detección de *H. pylori* en las muestras de jugo y biopsias gastroesofágicas, sugiere que la distribución de la bacteria en el tracto gastroduodenal superior no está restringida únicamente a la mucosa gástrica sino que, en la mayoría de los casos puede ser encontrada de forma generalizada. Ello explicaría por qué *H. pylori* puede ser detectada independientemente del tipo de muestra. Así mismo, la alta detección encontrada en la mucosa esofágica apunta a la realización de otros estudios que ayuden a comprender cómo esta bacteria reside en el esófago, donde el pH es relativamente neutro (pH 6) y no requiere, aparentemente, de una adaptación drástica para su colonización, dado que las condiciones imperantes son diferentes a las del estómago en cuanto a pH, estructura celular y funcionamiento.

En el presente estudio, se utilizó una región interna conservada del gen ARNr 16S como marcador para la detección del género *Helicobacter* spp. La alta detección encontrada en la mucosa gástrica, indica

una mayor prevalencia de *H. pylori* en el estómago aunque esta diferencia no fue significativa. Los genes *glmM* y *ureA* fueron encontrados en el 100% de las muestras *Helicobacter* spp. positivas, lo cual sugiere la ausencia de especies de *Helicobacter* no-*pylori* en las muestras estudiadas.

En Venezuela, la prevalencia reportada de la infección gástrica por *H. pylori* es alta, en un rango de 45 a 95% en la población sintomática (9-10, 27-29), lo cual coincide con lo encontrado en este estudio. Asimismo, la prevalencia de la infección en jugo gástrico por PCR fue similar a la reportada en un estudio previo en Venezuela (48,9%) (10) y menor a la encontrada en Perú (64,8%), otro país latinoamericano en vías de desarrollo (13).

El gen *cagA*, que codifica para una proteína altamente inmunodominante, denominada CagA, es un gen variable cuya presencia está asociada con un mayor grado de patogenicidad de la bacteria (30-33). En este estudio se encontró que la prevalencia de cepas tipo I (*cagA*+) en jugo y biopsia gástrica es similar y en biopsia esofágica es menor, mientras que la prevalencia de las cepas tipo II (*cagA*-) es mayor en biopsia esofágica en relación con el jugo y biopsia gástrica. Esta predominancia de cepas por tipo de muestra sugiere que existe una multi-infección de *H. pylori* en el tracto digestivo superior. La prevalencia de *cagA* en los 3 tipos de muestras se encuentra dentro del rango reportado en estudios previos en Venezuela y en otros países (32 a 77%), utilizando diferentes técnicas diagnósticas como serología y ensayo de sonda lineal (Line probe assay) (28-29, 34-37).

Finalmente, el estudio de PCR mostró una detección de *H. pylori* similar en jugo y en biopsias esofágicas con una alta sensibilidad y especificidad al ser comparados con biopsias gástricas, lo cual indica que ambos tipos de muestras pueden ser utilizados eficazmente para un diagnóstico seguro de la

infección, empleando genes esenciales y de virulencia propios de la bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Misión Ciencia, Proyecto de Investigación y Desarrollo en Red N° 2007001442. Sub-proyecto Bacterias, sub-objetivo 1.3.2. *H. pylori*.

REFERENCIAS

1. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009; 119:2475-2487.
2. Contreras M, Labigne A. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: what are they?. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27:401-408.
3. Mishra S, Singh V, Rao GR, Dixit VK, Gulati AK, Nath G. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects— A nested PCR based study. *Infect Genet Evol* 2008; 8:815-819.
4. Bamford KB, Bickley J, Collins JS, Johnston BT, Potts S, Boston V, Owen RJ, Sloan JM. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut* 1993; 34:1348-1350.
5. Miehle S, Thomas R, Guitierrez O, Graham DY, Go MF. DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric Cancer patients suggests infection with a single predominant strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 245-247.
6. Alvarez A, Arrieche D, Cala E, Aristimuño L, Rodríguez R. Diagnóstico de Infección por *Helicobacter pylori* en niños y adolescentes mediante determinación de IgG. *Rev Soc Ven Microbiol* 2002; 22:122-127.
7. Alvarez L, Mendoza M, Marquez L, Rojas E. Infección por *Helicobacter pylori* en niños que acuden a la emergencia del hospital “José Gregorio Hernández” de Trujillo, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23:7-8.
8. García-Amado MA, Al-Soud WA, Borges-Landaéz P, Contreras M, Cedeño S, Baéz-Ramírez E, Domínguez-Bello MG, Wadström T, Gueneau P. Non-*pylori* *Helicobacteraceae* in the upper digestive tract of Asymptomatic Venezuelan subjects: detection of *Helicobacter cetorum*-like and Candidatus *Wolinella africanus*-like DNA. *Helicobacter* 2007; 12:553-558.
9. Contreras M, García-Amado MA, Rodríguez MJ, Borges-Landaéz P, Zambrano Y, Álvarez M, Mosquera R, Arias Y, Gueneau P. Validez de un test inmunocromatográfico rápido para la detección de *H. pylori* en heces. *Interciencia* 2006; 31:136-139.
10. Domínguez-Bello MG, Cienfuentes C, Romero R, García P, Gómez I, Magó V, Reyes N, Gueneau P. PCR detection of *Helicobacter pylori* in string-absorbed gastric juice. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 198:15-16.
11. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4250-4255.
12. Ferrández A, Benito R, Arenas J, García-González MA, Sopena F, Alcedo J, Ortego J, Sainz R, Lanás A. CagA-positive *Helicobacter pylori* infection is not associated with decreased risk of Barrett's esophagus in a population with high *H. pylori* infection rate. *BMC Gastroenterol* 2006; 6:7.
13. Velapatiño B, Balqui J, Gilman RH, Bussalleu A, Quino W, Finger SA, Santivañez L, Herrera P, Piscoya A, Valdivia J, Cok J, Berg DE. Validation of string test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44:976-980.
14. De Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol* 1997; 179:3488-3493.
15. Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Wren BW, Tabaqchali S. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:362.
16. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cyto-

- toxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:5791-5795.
17. **Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R.** *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 1999; 284:1328-1333.
 18. **Rodicio Mdel R, Mendoza M del C.** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22:238-245.
 19. **Agréus L.** Natural history of dyspepsia. Gut 2002; 50:iv2-9.
 20. **Germani Y, Dauga C, Duval P, Huerre M, Levy M, Pialoux G, Sansonetti P, Grimont P.** Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. Res Microbiol 1997; 148:315-326.
 21. **Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, Braimi N, Dupont C, Labigne A.** Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. Res Microbiol 1996; 147:661-669.
 22. **Peek R, Miller G, Tham K, Perez G, Cover T, Atherton J, Dunn D, Blaser M.** Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. J Clin Microbiol 1995; 33: 28-32.
 23. **Rugge M, Busatto G, Cassaro M, Shiao Y, Russo V, Leandro G, Avellini C, Fabiano A, Sidoni A, Covacci A.** Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. Cancer 1999; 85:2506-2511.
 24. **Contreras M, Salazar V, García-Amado M, Reyes N, Aparcero M, Silva O, Castro D, Romero R, Gueneau P, Michelangeli F.** High frequency of *Helicobacter pylori* in the esophageal mucosa of dyspeptic patients and its possible association with histopathological alterations. Int J Infect Dis 2012; 16:e364-370.
 25. **Corley D, Kubo A, Levin T, Block G, Habel L, Rumore G, Quesenberry C, Buffler P, Parsonnet J.** *Helicobacter Pylori* and gastroesophageal reflux disease: A community-based study. Helicobacter 2008; 13: 352-360.
 26. **Gisbert J, Pajares J.** Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en la enfermedad por reflujo gastroesofágico y en el esófago de Barrett: revisión sistemática y metaanálisis. Med Clin (Bare) 2002; 119: 217-223.
 27. **Pacheco N, Mago V, Gomez I, Gueneau P, Guelrud M, Reyes N, Pericchi LR, Domínguez-Bello M.G.** Comparison of PCR and common clinical tests for the diagnosis of *H. pylori* in dyspeptic patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2001; 39: 207-210.
 28. **Perrone M, Muñoz L, Camorlinga M, Correnti M, Cavazza M, Lecuna V, Torres J.** Importance of IgG anti-CagA antibodies of *Helicobacter pylori* in Venezuelan patients with gastric diseases. Invest Clin 2005; 46:357-367
 29. **Ghose C, Perez-Perez G, Van Doorn L, Domínguez-Bello M, Blaser M.** High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. J Clin Microbiol 2005; 43: 2635-2640.
 30. **Costa A, Figueiredo C, Touati E.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2009; 14:15-20.
 31. **González C, Serrano C, Harrys P.** Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. Rev Méd de Chile 2007; 135:182-188.
 32. **Molina A, Jaramillo C, Delgado M, Bohórquez M, Ámezquita A.** Detección y genotipificación de *Helicobacter pylori* sobre la base de los genes ADNr 16S y el gen asociado a citotoxina (*cagA*) y posible asociación con enfermedades gastrointestinales. Rev Cubana Med Trop 2008; 60:105-110.
 33. **Tsuge H, Tsurumura T, Utsunomiya H, Kise D, Kuzuhara T, Watanabe T, Fujiki H, Suganuma M.** Structural basis for the *Helicobacter pylori*-carcinogenic TNF- α -Inducing protein. Biochem Biophys Res Commun 2009; 388:193-198.
 34. **Ghose C, Perez-Perez G, Domínguez-Bello M, Pride D, Bravi C, Blaser M.** East Asian genotypes of *Helicobacter pylori*

- strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15107-15111.
35. **Wu J, Sung J, Chan F, Ching J, Ng A, Go M, Wong S, Ng E, Chung S.** *Helicobacter pylori* infection is associated with milder gastro-esophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14:427-432.
36. **Wu A, Crabtree J, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng C, Forman D.** Role of *Helicobacter pylori cagA+* strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003; 103:815-821.
37. **Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, Zojaji H, Aslani M, Reza M.** Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cagA* pathogenicity island isolated from Iranian population. *Dig Liver Dis* 2010; 41: 634-638.