

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

Estudio epidemiológico en la población ecuatoriana de los factores de riesgo asociados a la infección con *Helicobacter pylori*.

Proyecto de investigación

**Santiago Lenín Valenzuela Zapata**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 22 de julio del 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Estudio epidemiológico en la población ecuatoriana de los factores de riesgo asociados a la infección con *Helicobacter pylori*.**

**Santiago Lenín Valenzuela Zapata**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio Machado, PhD

Firma del profesor

-----

Quito, 22 de julio del 2016

## **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Santiago Lenín Valenzuela Zapata

Código:

00107196

Cédula de Identidad:

1714236567

Lugar y fecha:

Quito, 25 de junio del 2016

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa que coloniza el estómago de más del 50% de la población de seres humanos. Solo el 15% de la población con presencia de *H.pylori* desarrollan enfermedades patológicas asociadas incluyendo gastritis, úlceras duodenales y el cáncer gástrico asociado al linfoma de MALT. El grado de patogenicidad es el resultado de las cepas de *H.pylori* con mayor virulencia que ayudan en su persistencia y daño tisular. Así mismo, se han confirmado factores epidemiológicos de importancia que influyen en la prevalencia de *H.pylori*. Actualmente, altas prevalencias de infección con *H.pylori* han sido relacionadas con factores de riesgo que afectan de mayor manera a países en desarrollo, específicamente países de Sur América. Por lo que varios estudios en estos países concuerdan en una alta prevalencia en pacientes adultos (60-80%) y prevalencias de hasta 90% en niños. En el presente estudio se aplica la estrategia de detección por PCR de la región 16S-rRNA para identificar al patógeno en muestras gástricas de 246 pacientes adultos voluntarios donadas por diferentes centros clínicos de diferentes ciudades en Ecuador. La prevalencia detectada en la población ecuatoriana en estudio fue del 56,9% lo cual es un valor inferior a lo esperado. La caracterización de *H.pylori* de la población resultó en la alta presencia de cepas asociadas a la población hpEurope de *H.pylori* suponiendo una posible migración de las bacterias a la población ecuatoriana. El análisis estadístico identifica a poblaciones como son la temprana edad, las ocupaciones manuales, o servicios y el tabaquismo con mayor probabilidad de poseer *H.pylori*.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico, 16S rRNA, PCR, epidemiología

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a gram negative bacteria that specifically colonizes the stomach of humans. The 15% of patients with the presence of *H.pylori* develop chronic associate disease such as gastritis, peptic and duodenal ulcers, and gastric cancer is the worst scenario. The degree of pathogenicity varies between strains of *H.pylori* in their phenotypes to a linked virulence factor present in the genome. Also, epidemiologic risk factors have been determined as published in earlier studies. Currently, the prevalence of *H.pylori* in multiple developing countries, especially in South America has been reported as high in both adult (60-80%) and children (>90%). In the present study we apply the molecular method of PCR for the identification of the 16S-rRNA region of *H.pylori* in 246 gastric biopsies donated from different cities around Ecuador. The detected prevalence was of 56, 9% in the Ecuadorian population, a value that didn't match with the high prevalence detected in other developing countries. The strain characterization appointed for a high prevalence of strains associated with the geographic population hpEurope of *H.pylori* suggestion a possible migration of these strains from the European continent. Furthermore, epidemiological analysis with chi square test and logistic regression identified the earlier ages, manual occupations, and smoking as potential risk factors for the prevalence of *H.pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric cancer, 16SrRNA, PCR, epidemiology

## TABLA DE CONTENIDO

### Contenido

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1	Características generales del patógeno .....	7
1.2	Factores de patogenicidad de <i>H. pylori</i> .....	8
1.3	Detección del patógeno .....	12
1.4	Epidemiología .....	15
1.5	Poblaciones y cepas de riesgo de <i>H.pylori</i> .....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1	Pacientes y recolección de datos .....	21
4.2	Colección de muestras gástricas .....	21
4.3	Extracción de ADN de muestras gástricas.....	21
4.4	Diseño <i>in-silico</i> de primers para región 16S-rRNA y genes específicos de las cepas de riesgo .....	23
4.5	Determinación <i>in-silico</i> de la sensibilidad y especificidad de los primers diseñados.....	25
4.6	Amplificación de la región 16S-rRNA de <i>H.pylori</i> en muestras de ADN de biopsias gástricas. ....	26
4.7	Amplificación de regiones de genes específicos para las cepas de riesgo de <i>H. pylori</i> 27	
4.8	Análisis estadístico de los resultados de encuestas y detección de <i>H.pylori</i> .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1	Análisis <i>in-silico</i> de primers para la región 16S-rRNA.....	29
5.2	Determinación prevalencia de infección <i>H.pylori</i> en población ecuatoriana .....	30
5.3	Predominancia cepas de riesgo <i>H.pylori</i> en muestras positivas .....	32
5.4	Análisis estadístico para factores demográficos de la población .....	33
5.5	Análisis estadístico para factores socio-económicos de la población .....	35
5.6	Análisis estadístico para factores de hábitos personales e historia clínica de la población .....	37
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
6.1	Detección molecular de <i>H. pylori</i> por PCR en muestras gástricas .....	39
6.2	Comparación de la prevalencia en la población ecuatoriana con otros países. ...	40
6.3	Identificación de cepas de riesgo en el Ecuador .....	42
6.4	Factores de riesgo para infección con <i>H.pylori</i> .....	44
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>51</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características generales del patógeno

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Helicobacteraceae* la cual coloniza específicamente el tejido gástrico del ser humano (Aziz et al., 2014) y descubierto en la superficie de la mucosa gástrica en 1987. Posteriormente, fue exitosamente aislado mediante la técnica de cultivo desarrollada por Skirrow para el género *Campylobacter* debido a su gran semejanza con el mismo (Furuta et al., 1966). Las características morfológicas incluyen forma helicoidal o espiral y motilidad mediante 4-7 flagelos unipolares y su tamaño promedio va desde 2.4- 4.0  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5-1.0 de ancho (Malnick et al., 2014). La bacteria fue inicialmente caracterizada como *Campylobacter pylordis* hasta que estudios de hibridación de rRNA y secuenciación, en 1987 confirmaron la separación de *H. pylori* en su propio género. El análisis de su peptidoglicano revela una composición única de muropéptido donde esta es menos compleja estructuralmente que otras bacterias gram negativas (Kusters, Van Vliet, & Kuipers, 2006).

*Helicobacter pylori* es una bacteria de lento crecimiento, microaeróbica y microaerofílica presentado un crecimiento óptimo a niveles de 2 a 5% de  $\text{O}_2$  y la necesidad adicional de 5 a 10% de  $\text{CO}_2$  con un ambiente de alta humedad (Malnick et al., 2014). Su metabolismo se enfoca en el consumo de glucosa como fuente de energía mas no de otros carbohidratos complejos como se ha observado en estudios genómicos de cepas como 26695 y J99 (Kusters et al., 2006). También, carece de ciertas rutas biosintéticas para algunos amino ácidos dificultando así su cultivo *in vitro* (Kabir, 2001). *H. pylori* es ureasa, catalasa y oxidasa positiva las cuales son usadas como un método de identificación mediante cultivo (Garza-González et al., 2014)

La bacteria habita un estrecho rango de organismos hospederos donde se encuentra exclusivamente en humanos y en otros primates como es el caso del macaco y monos Rhesus (Duynhoven & Jonge, 2001). Su presencia se ha observado en diversos tipos de muestras biológicas, como por ejemplo en saliva, vomito, reflujo gástrico y heces (Duynhoven & Jonge, 2001). Las nuevas infecciones están relacionadas con transmisión humano-humano más que vía oral (Lopes, Vale, & Oleastro, 2014). Sin embargo, la bacteria puede entrar vía oral por la ingesta de alimentos contaminados, esto fue demostrado en 1985 con experimentos de auto ingestión por Marshall y Morris lo cual resultó en el desarrollo de gastritis y varias patologías posteriores (Kusters et al., 2006). *H. pylori* por tanto es un patógeno humano persistente y su colonización produce enfermedades crónicas.

## **1.2 Factores de patogenicidad de *H. pylori***

La colonización de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica se realiza a través de diversos factores de virulencia, tales como la enzima ureasa y la motilidad de la bacteria mediante flagelos. Estos factores están involucrados con la colonización pero no en el daño tisular del paciente el cual es producto de otros factores de virulencia. La motilidad depende de la expresión de las dos proteínas flagelares mayores específicamente las proteínas FlaA y FlaB (Newell, 1991). La motilidad mediante sus flagelos ayuda a la bacteria dirigirse a regiones dentro del estómago donde el pH es óptimo para su crecimiento. También, estudios con mutantes *H.pylori* que carecen de flagelos se ha observado que no pueden iniciar una infección persistente (Worku, Sidebotham, Walker, Keshavarz, & Karim, 1999).

Por otro lado, la presencia de adhesinas, como es el caso de la estudiada *BabA*, que codifican proteínas que ayudan a *H.pylori* en las etapas tempranas de colonización mediante su interacción con receptores antígenos como el antígeno de Lewis del epitelio gástrico. Este factor se encuentra presente en gran cantidad de cepas que desarrollan enfermedad.



*Helicobacter pylori*, al no ser una bacteria acidófila, produce la enzima ureasa que permite hidrolizar la urea existente en el estómago en  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  (Yamaoka, 2011). La producción de  $\text{NH}_3$  permite neutralizar el ambiente ácido de la mucosa gástrica lo cual promueve la prevalencia de *H. pylori*. Adicionalmente, la enzima ureasa posee una afinidad a su sustrato mucha más grande que otras enzimas, lo cual le ayuda a *H.pylori* a ser más eficiente en la captación de la urea limitante en el estómago (Yamaoka, 2011)

*H. pylori* puede colonizar el tejido gástrico sin ocasionar una infección o daño tisular teniendo así a pacientes asintomáticos. Sin embargo, existen pacientes que si desarrollan enfermedades (15% de las personas infectadas) como es el desarrollo de gastritis, úlceras, atrofia glandular gástrica, adenocarcinomas gástrico o linfoma MALT (Worku et al., 1999). La aparición de síntomas se debe a las distintas características genómicas y fenotípicas de las diferentes cepas existentes donde la expresión de varios factores de virulencia y sistema inmune del hospedador son factores que condicionan la evolución de una infección eventual en el estómago (Matsunari et al., 2012). La patogenicidad de *H. pylori* incluye por tanto factores de virulencia que le ayudan a la penetración y daño intercelular donde la capa del estómago es debilitada permitiendo el paso de ácido hacia las capas sensibles del estómago ocasionando las mencionadas úlceras secreción de cito toxinas y evasión del sistema inmune del hospedador (Kusters et al., 2006). A continuación se presentan algunos de los factores de virulencia más estudiados de cepas de *H. pylori*.

### **Isla de patogenicidad CagA**

Existen cepas de *H. pylori* clasificadas como tipo I como 26695 y J99 que están asociadas con las infecciones más severas debido a la presencia de la isla de patogenicidad (CagPAI) (Newell, 1991). La isla de patogenicidad es un locus de 40 kb el cual contiene 31 genes. Estos genes corresponden a un sistema de secreción del tipo IV involucrado en la inducción en la producción de IL-8 (atracción de neutrófilos) mediante la activación de la

proteína tirosina-quinasa presente en el epitelio gástrico también promueve la infiltración de neutrófilos en el epitelio gástrico. Muchos genes de la isla de patogenicidad poseen homología con los genes de otros patógenos como el caso de *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella* spp. and *Bartonella* spp que su virulencia depende de dicho sistema de secreción (Fischer et al., 2014) los cuales expresan subunidades para sistemas de secreción del tipo IV los cuales son utilizados para entregar factores de virulencia de las bacterias dentro de los epitelios como es el caso de citotoxinas, esto indica una posible adquisición de estos genes por transferencia horizontal (Yamaoka, 2011).

La proteína citotoxina cagA es codificada por el gen *cagA* y es fosforilada por otras proteínas presentes en las células. Al ser fosforiladas, la proteína cagA comienza a interactuar con proteínas quinasas y otros factores de transcripción que inducen a la elongación y despolarización de las células (Jones, Whitmire, & Merrell, 2010). Sin la necesidad de fosforilación de la proteína cagA también puede ocasionar otros cambios como pueden ser fallos en la unión entre células. La proteína es descrita como un antígeno inmunodominante que posee una masa molecular de 120 kDa (Newell, 1991). Además, es coexpresada con otros factores de virulencia, como por ejemplo la citotoxina vacA, la cual necesita de la expresión de cagA para activar su expresión (Jones et al., 2010). La presencia de CagPAI está asociada al desarrollo de gastritis activa crónica, ulceración peptídica y gastritis atrófica con incremento en el riesgo al cáncer gástrico (Yamaoka, 2011). Estas lesiones inflamatorias producen habitualmente casos de intoxicación alimentaria debido a la transmisión de alérgico a través del epitelio gástrico que generan respuestas IgE (Yamaoka, 2011)

La incidencia de cepas de *H. pylori* con la presencia de CagPAI es de 60-70% en todo el mundo donde Japón y Corea poseen índices de hasta 100%. Así, en estos países asiáticos la presencia de CagPAI ya no representa un buen marcador en la patogénesis del organismo (Kusters et al., 2006). También, se ha observado la presencia de ambos fenotipos positivos y

negativos de CagA en un mismo paciente lo cual indica un equilibrio dinámico entre ambas cepas donde la dominancia del fenotipo positivo es la que modula la expresión de la enfermedad (Aziz et al., 2014).

### **Gen *VacA***

El gen *vacA* es uno de los factores de virulencia primarios de *H. pylori* que codifica una proteína citotóxica oligomérica con un peso molecular de 87 kDa (Cao, 1995) . La proteína ocasiona cambios en el citoesqueleto, apoptosis y degeneración vacuolar de las células hospedadoras(Kusters et al., 2006). A pesar de que este gen está presente en casi todas las cepas, se ha observado que solo la mitad producen efectivamente una vacuolización de las células *in vitro* y por tanto una virulencia acentuada (Jones et al., 2010). Esta citotoxina también produce la inactivación del metabolismo de energía debido a daño mitocondrial (Jones et al., 2010). Normalmente, la proteína está localizada en el periplasma y en la membrana externa de toda la bacteria (Jones et al., 2010). Existen diferentes familias de alelos del gen *vacA*, el cual posee dos regiones variables, *s* y *m*. La región *s* expresa péptidos de señalización donde existen dos alelos: *s1* (*s1A s1B*) y *s2*. La región *m*, localizada en la mitad del gen, consta de dos alelos: *m1* y *m2* (Cao, 1995). La expresión combinada en forma de mosaico de todos estos alelos produce fenotipos diferentes los cuales determinan la producción de la citotoxina y el grado de virulencia inherente a su actividad biológica (Miernyk et al., 2011). Las bacterias clasificadas como *s1m1* son las asociadas a la producción incrementada de la citotoxina (Cao, 1995). Por otro lado, las cepas *s1m2* poseen una expresión moderada de la proteína y el genotipo *s2m2* que posee baja expresión de la citotoxina(Cao, 1995).

### 1.3 Detección del patógeno

Existen varias formas de diagnóstico de infección con *H. pylori* que se pueden clasificar como invasivas o no invasivas dependiendo de si requieren o no de una endoscopia (obtención de biopsia) para el análisis (César et al., 2005; Lage et al., 1995). Dentro de los métodos de diagnóstico más utilizados en el área clínica, se puede identificar al análisis histológico, prueba de ureasa, el análisis mediante cultivo y el método de PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) (Garza-González et al., 2014). Por otro lado, los métodos no invasivos incluyen a la prueba de ureasa por aliento y serología (Garza-González et al., 2014).

#### **Análisis histológico**

La técnica histológica resultará ser invasiva y provee de información crítica relacionada con la mucosa gástrica como es la presencia de inflamación, displasias, neoplasias o atrofas glandulares (César, et al. 2005). El Gold standard para la toma de muestras gástricas demanda la recolección en 5 diferentes sitios del estómago para poder eliminar incertidumbre. (César et al., 2005). La visualización de *H.pylori* se realiza a través de colorantes inespecíficos como la hematoxilina y eosina (Rimbara, Sasatsu, & Graham, 2013). Sin embargo, esta observación histológica no detecta específicamente *H.pylori* y tampoco su grado de virulencia (Garza-González et al., 2014).

El método histológico tiene varias limitaciones como el ser una técnica subjetiva dependiendo del observador y su característica de ser invasiva no la hace apta para detección en niños (César et al., 2005). También, al depender del criterio del examinador, la sensibilidad y especificidad reportada en estudios es siempre diferente (Calvet et al., 2009; Garza-González et al., 2014; Lopes et al., 2014). Sin embargo, al incrementar el número de muestras gástricas se puede incrementar estos porcentajes pero también el daño en el paciente.

### **Análisis mediante cultivo**

El método de cultivo es útil debido a que no se espera obtener el crecimiento de otras bacterias comensales debido a la naturaleza ácida de las muestras gástricas por lo que *H. pylori* es normalmente la única bacteria en el estómago. Sin embargo, la sensibilidad es muy baja pero resultar ser un método menos invasivo debido a que el patógeno puede ser aislado de otros tipos de muestras como es el caso del reflujo gástrico (Malnick et al., 2014). La tasa de crecimiento de *H.pylori* en medio de cultivo resultar ser baja debido a estrictos requerimiento de nutrientes y condiciones que necesita la bacteria obteniendo así porcentajes de recuperación bajos de 40-60% (Kabir, 2001). Pudiendo resultar en un gran número de posibles casos de falsos negativos en los pacientes.

Otra desventaja del método es la necesidad de análisis lo más pronto posible. También, el diagnóstico mediante esta técnica depende de la experiencia del analista, la calidad de las muestras y un transporte adecuado. La presencia de la bacteria por tanto es positiva si la bacteria resulta ser oxidasa, catalasa y ureasa positiva. La técnica es utilizada principalmente para investigaciones epidemiológicas más no en exámenes clínicos rutinarios (Yamaoka, 2011).

### **Test rapid de Urease**

El test RUT (del inglés, Rapid Urea Test) aprovecha la habilidad de *H. pylori* de utilizar la urea y transformarla en productos que cambien el pH alrededor (Lopes et al., 2014). Para ello la biopsia gástrica debe ser puesta en medio de cultivo con urea y un indicador de pH. Si la enzima ureasa está presente, la urea es degradada produciendo dióxido de carbono y amonio los cuales cambian el pH del medio cambiando de color con la ayuda del indicador de pH. El método de RUT es sencillo, rápido y barato (Kusters et al., 2006). Sin embargo, todas las especies gástricas del genero *Helicobacter* presentan la enzima ureasa (Brandi et al., 2006) y por tanto el método no es específico para *H. pylori* . Por otro lado, estudios previos

confirman que la presencia de la bacteria en saliva no necesariamente está relacionada a una infección persistente con *H. pylori* (Bickley et al., 1993).

### **Análisis serológico**

Este método resulta ser no invasivo por la utilización de muestras de sangre para la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori*. El método utiliza el ensayo inmunológico por enzima (EIA) el cual detecta IgG contra *H. pylori*. Las pruebas serológicas son relativamente baratas y sencillas por lo que se puede utilizar en laboratorios para un fácil diagnóstico (Lopes et al., 2014). Sin embargo, el método serológico tiene la desventaja de generar falsos positivos debido a reacciones cruzadas o por anticuerpos que permanecen a pesar de la erradicación de la enfermedad en el paciente (Sayed et al., 2011). Este número elevado de falsos positivos reduce considerablemente la confiabilidad de la técnica como método de diagnóstico. A pesar de esto, la técnica de serología es utilizada para ensayos preliminares o *screening* de pacientes. La alternativa resulta ser más atractiva que que la prueba de aliento de ureasa (Malnick et al., 2014).

### **Detección por PCR**

La detección de *H. pylori* por PCR tiene como principales ventajas la utilización de pequeñas muestras, no requiere de transporte especial y las muestras pueden ser de métodos invasivos o no invasivos (Garza-González et al., 2014). Este método es más rápido y específico que los métodos anteriormente mencionados pudiendo incluso identificar varios genotipos de la bacteria por lo que se utiliza mucho actualmente para estudios epidemiológicos (Ecker et al., 2006; Falush et al., 2003; Miernyk et al., 2011). También, las variantes del método de PCR, como es el *Multilocus Sequence Typing* (MLST), es un herramienta molecular de alta resolución que utiliza la detección de genes *housekeeping* para discriminar entre especies bacterianas que están estrechamente relacionadas (Ecker et al.,

2006; Matsunari et al., 2012). Además, la técnica ha resultado de ayuda para la identificación de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos (Oleastro et al., 2003).

## 1.4 Epidemiología

A nivel mundial, la organización mundial de la salud (WHO) estima que aproximadamente la mitad de la población adulta posee infección con *H. pylori* y el 75% de esas infecciones son responsables de casos de cáncer gástrico (Yeh, Goldie, Kuntz, & Ezzati, 2009). La prevalencia de *H.pylori* varía ampliamente con la geografía. Se ha observado que en países en desarrollo donde la prevalencia puede llegar hasta el 80% incluso en edades tempranas (Goodman et al., 1996; Malnick et al., 2014). Por otro lado, la prevalencia en países industrializados se mantiene generalmente alrededor del 40% y es considerablemente baja en niños y adolescentes. Estas diferencias pueden estar ligadas a la mejora en la calidad socioeconómica de vida, mejores prácticas de higiene y la eliminación de la sobrepoblación las cuales disminuyen la prevalencia de la infección con *H. pylori* en dichos países (Eshraghian, 2014). En países del oeste asiático, la prevalencia es considerablemente alta en comparación a países desarrollados (Ozaydin et al., 2013). También, países en desarrollo, los índices en niños han aumentado considerablemente (Kusters et al., 2006). Sin embargo, en países asiáticos se ha observado que la prevalencia va disminuyendo y consecuentemente los índices de cáncer gástrico en países como Corea desde el año 1990 (Peleteiro et al., 2014). Actualmente, los estudios se enfocan en los países en desarrollo como es el caso de países en Sur América y América Central los cuales poseen prevalencias similares a los países Asiáticos (Kusters et al., 2006; Peleteiro et al., 2014).

Países sur americanos como Colombia y Brasil, han reportado prevalencias de *H.pylori* entre un 60 al 90% donde se destacan factores de riesgo de higiene, sanidad de alimentos y agua potable como los factores que influyen directamente (Khalifa et al., 2010; Klein,

1991). Otros factores socioeconómicos como es el caso de ocupación afuera de casa y la sobrepoblación en hogares aumentan la probabilidad de contraer la infección (Porrás et al., 2014).

Sin embargo, el método de detección utilizado para la recolección de datos de prevalencia en estudios epidemiológicos debe ser considerado (Hunt et al., 2004). La mayoría de estudios incluyen métodos de diagnóstico que generan gran cantidad de falsos positivos como método el análisis serológico y el test RUT(Hunt et al., 2004; Santos et al., 2005).

Por otro lado, también puede existir falsos negativos en sujetos viejos debido a tratamiento de erradicación de la bacteria que disminuye la presencia de *H. pylori* y por tanto se diluyen los niveles de IgG (Garza-González et al., 2014). La técnica de PCR resulta de gran eficiencia debido a su rapidez y especificidad alta para detectar la presencia de *H. pylori*. Actualmente, se comienza a incluir en los estudios epidemiológicos el análisis de resistencia de microbiana y otros factores de virulencia que están asociados a la población (Matsunari et al., 2012).

## **1.5 Poblaciones y cepas de riesgo de *H.pylori***

*H.pylori* presenta una alta variedad genética debido a que el patógeno posee altas tasas de mutación, una recombinación frecuente con otras especies y también con miembros de su misma especie (Falush et al., 2003; Fischer et al., 2014) A pesar de su alta variedad genética, se ha observado que muchas etnias de *H.pylori* han conservado genes que han marcado su éxito en la infección en el ser humano a lo largo de su migración y adaptación. (Falush et al., 2003; Fischer et al., 2014) Por tanto, se ha podido dividir las diferentes cepas existentes de *H.pylori* en diversas poblaciones etiologicas principales hpEurope, hpAsia2, hpAfrica2 y hpNEAfrica, hpAfrica1, hpEastAsia (hspAmerind incluida)(Falush et al., 2003).



El análisis de variación genética entre cepas de *H.pylori* es detectable mediante estudios comparativos de la variabilidad de 7 genes conservados (*housekeeping*) para *Helicobacter pylori*. El panel de marcadores genéticos para el análisis MLST de *Helicobacter pylori* son *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, y *phC* (Matsunari et al., 2012). También, con la ayuda de esta técnica se ha podido identificar la variación genética de poblaciones de cepas con distintas distribuciones geográficas (Matsunari et al., 2012).

Existen muchas cepas patógenas, como HPAG1, P12, J99, Shi470 y J166 en que sus genomas han sido secuenciados y comparados para búsqueda de zonas de plasticidad donde se encuentran las regiones específicas para cada cepa (Fischer et al., 2014). Estas cepas de referencia son aislados de pacientes con enfermedades gástricas de importancia clínica para el estudio de sus factores de virulencia (Baltrus et al., 2009; Fischer et al., 2010; Kersulyte et al., 2010; You et al., 2012). Asimismo, otros estudios comparativos con resultados de microarrays han logrado determinar zonas de plasticidad (alta variabilidad genética) para cada cepa de riesgo y también predecir ciertas regiones del genoma como únicas en su genoma (You et al., 2012). Mediante análisis filogenéticos con marcadores moleculares, las diferentes cepas de referencias J99, Shi470, HPAG1, P12 y J166 son relacionadas con cierta población *H.pylori*. Donde los genomas de HPAG1, P12 y J166 resultan ser siempre categorizado dentro de la misma subpoblación hpEurope (Fischer et al., 2010; You et al., 2012). Mientras que, la cepa Shi470 es categorizada con otras cepas específicas de sur América (Kersulyte et al., 2010) como es el caso de V225d y por último la cepa J99 es fuertemente asociada a todas las cepas pertenecientes hpAfrica (You et al., 2012).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas crónicas de patógenos persistentes están asociadas con el desarrollo de cáncer alrededor del mundo (De Martel et al., 2012). El cáncer gástrico (GC) se ha convertido en el 2<sup>do</sup> tipo de cáncer con mayor mortalidad el 4<sup>to</sup> cáncer más incidente en la población humana (De Martel et al., 2012). *Helicobacter pylori* es el primer patógeno que ha sido relacionado directamente a la formación de cáncer gástrico (tipo adenocarcinoma) pero también es productor de otras enfermedades crónicas como la dispepsia, gastritis crónica y linfoma asociado al tejido de la mucosa gástrica MALT (Aziz et al., 2014). La infección persistente del patógeno en el estómago se debe a los factores de virulencia presentes en algunas de sus cepas en *Helicobacter pylori* como la isla de patogenicidad Cag-A y el gen de ureasa y que están asociadas al 75% de las causas de cáncer en el mundo (De Martel et al., 2012; Peleteiro et al., 2014). Su presencia en heces, saliva y alimentos resultan un problema para su reinfección y por tanto los pacientes después de curarse vuelven a contraer el patógeno.

A pesar de la confirmación sobre una disminución de la incidencia de cáncer gástrico y la estabilización de las infecciones con *Helicobacter pylori*, el patógeno sigue siendo un problema en países en desarrollo los cuales poseen problemas en sanidad y salud preventiva efectiva (Eshraghian, 2014; Ozaydin et al., 2013; Peleteiro et al., 2014; Porras et al., 2014). Varios estudios se han enfocado en países de Sur América para confirmar la alta prevalencia sobre todo en zonas rurales y aisladas (Goodman et al., 1996; Kersulyte et al., 2010; Santos et al., 2005). Por tanto, la diversidad genética de los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* no son los únicos factores ligados a la prevalencia mundial.

Por consiguiente, es necesario un estudio de la prevalencia de *H.pylori* y los factores de riesgo demográficos y socio-económicos asociados de la población ecuatoriana donde no existen datos epidemiológicos al respecto. También, una caracterización preliminar de las cepas de *H. pylori* como J99, HPAG1, P12 y Shi470 en pacientes con la presencia del patógeno resulta de vital importancia para monitorear la situación de virulencia en la población y distribución del patógeno a nivel nacional.

La mayoría de las investigaciones epidemiológicas con grandes poblaciones de pacientes se han llevado a cabo con técnicas de diagnóstico tanto serológicas, cultivo o test de urea en aliento para detectar *Helicobacter pylori* debido al precio y rapidez. No obstante, estas técnicas hasta cierto punto no resultan ser tan eficientes debido a posibles inhibiciones o falsos positivos. La técnica molecular como la PCR ha demostrado ser un método eficiente y confiable para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* sobre todo si se amplifica fragmentos de la región ribosomal 16S del RNA. Un estudio epidemiológico con dicha técnica de diagnóstico resulta más certero y confiable para estudiar la prevalencia en la población ecuatoriana.

La utilización de la técnica PCR también puede ser utilizada para poder identificar cepas de riesgo de *H.pylori* las cuales poseen varios factores de virulencia y están vinculados fuertemente a pacientes con cáncer gástrico. Es de vital importancia caracterizar las cepas de riesgo más comunes de *H.pylori* en la población ecuatoriana para un análisis y comparación con otros países en Sur América.

### 3 OBJETIVOS

**General:** Determinar los factores de riesgo asociados a la infección con *Helicobacter pylori* en la población ecuatoriana.

**Específicos:**

1. Implementar un método de extracción ADN bacteriano para biopsias gástricas.
2. Diseñar de un set de primers *in silico* para la amplificación de un fragmento de la región ribosomal 16S de *Helicobacter pylori*.
3. Diseñar *in-silico* de sets de primers para la identificación de cepas de riesgo de *H. pylori* (J99, HPAG1, P12, J166 y Shi470).
4. Desarrollar un método PCR convencional para detección de región 16S y genes específicos de las cepas de riesgo.
5. Realizar un análisis estadístico de los factores epidemiológicos de riesgo vinculados a la infección con *H. pylori*.
6. Comparar la prevalencia ecuatoriana de *H. pylori* con otros estudios epidemiológicos de diferentes países en desarrollo.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Pacientes y recolección de datos

Los sujetos en estudio fueron pacientes de un grupo de centros clínicos privados y públicos de varias ciudades del Ecuador, principalmente las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca. Los pacientes que necesitaban ser sometidos a endoscopia por problemas estomacales o por control de rutina fueron invitados a participar en el estudio epidemiológico. Para esto, un consentimiento previo informado fue entregado a cada uno para su participación como establecido por el Comité de Bioética de la USFQ con el código 2014-130M. Adicionalmente, el médico colaborador realizó una encuesta a cada paciente incluyendo su información personal, demográfica, socio-económica, hábitos alimenticios e historia clínica para el posterior análisis estadístico.

### 4.2 Colección de muestras gástricas

Un total de 246 biopsias gástricas fueron paulatinamente recolectadas según fueron recibidas las donaciones de los diferentes centros clínicos y hospitales. Las endoscopias fueron realizadas por los gastroenterólogos encargados en cada centro clínico. De cada paciente, dos muestras gástricas fueron recolectadas del antro y cuerpo del estómago respectivamente debido a su efectividad en el posterior diagnóstico de la infección (Lan et al., 2012). Las muestras clínicas fueron depositadas en tubos tipo falcón adicionando 98,9% de metanol (nivel molecular) y su posterior refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de ADN.

### 4.3 Extracción de ADN de muestras gástricas

El método de extracción de ADN de las muestras gástricas requirió el uso de CTAB (del inglés, *Cationic Surfactant Hexadecyltrimethylammonium Bromide*) para la ruptura de

tejidos extracelulares utilizado en estudios previos en tejidos vegetales. El protocolo fue modificado para aplicarlo a muestras gástricas y para evitar contaminantes e inhibidores de PCR. Para la extracción se utilizaron ambas muestras de antro y cuerpo para un análisis por duplicado de cada paciente. El contenido en los tubos falcón fue centrifugado a 3000 x g por 5 minutos para obtener el pellet celular. El sobrenadante fue retirado para luego adicionar un mismo volumen de metanol 98,9% y centrifugar a 3000 x g por 5 minutos para el primer lavado. El segundo y tercer lavado se realizaron añadiendo un mismo volumen de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7). Después de los respectivos lavados, se suspendió el pellet celular en 700 µL de solución CTAB (2% CTAB weight/vol, 1.4M NaCl, 20mM EDTA pH 8, 100mM TrisHCl pH 8) y una posterior incubación de 2 horas a 65°C con agitación ocasional de las muestras. Después, las muestras fueron digeridas con 20 µL de proteinasa K(20 mg/ml). Para lograr la separación del ADN genómico del resto de material se utilizó 700 µL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1 vol/vol) con agitación vigorosa de la muestra antes de centrifugar a 13,300 x g por 5 minutos. La fase superior acuosa fue transferida a otro microtubo eppendorf procurando de no transferir parte de la fase inferior donde se encuentran los contaminantes y residuos. En el nuevo microtubo eppendorf presente la fase acuosa superior, se añadieron 1000 µL de etanol frio al 100% para precipitar el ADN genómico y poder visualizarlo. La solución obtenida se la conservo a 20°C por toda una noche. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 16,110 x g por 15 minutos. Se realizó un último lavado con 1000 µL de etanol al 70% para luego centrifugar de nuevo a 16,110 x g por 15 minutos.

Por último, el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido se lo secó a temperatura ambiente para después suspenderlo en 50 µL de buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8, 0.1mM EDTA) y conservarlo a -20°C. La cuantificación y la calidad (260/280 o 260/230 ratios) de ácidos nucleicos de las muestras de ADN extraídas fue realizada mediante el

espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) de acuerdo a las instrucciones del equipo.

#### **4.4 Diseño *in-silico* de primers para región 16S-rRNA y genes específicos de las cepas de riesgo**

La región ribosomal 16S-rRNA de las bacterias posee la característica de ser conservativa (única) y por tanto permite el desarrollo de nuevas técnicas moleculares para la detección del patógeno, en este caso de *Helicobacter pylori* (Germani et al., 1997; Goodman et al., 1996; Sugimoto et al., 2009)

Por lo tanto, en el presente estudio se optó por el diseño de primers (secuencias iniciadoras) específicos para la detección de la región 16S-rRNA de *Helicobacter pylori* mediante PCR convencional. Las secuencia 16S rRNA molde para el diseño de primers específicos fueron extraídas de la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP II, Michigan State University, USA, <https://rdp.cme.msu.edu/>). Posteriormente, se utilizó el programa bioinformático ClustalW2 (EMBI, Cambridgeshire, UK) para realizar una alineación múltiple de los moldes de la secuencia 16S-rRNA para poder utilizar la secuencia molde optima a partir de la cual se realizara el diseño de primers.

La secuencia molde seleccionada para el diseño del primer fue la secuencia de la cepa *H. pylori* ATCC49396 con el número de identificación S00000525 en el RDPII. El diseño de primers fue realizado mediante el programa bioinformático Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, USA) donde se pudo generar candidatos de primers mediante el análisis de la secuencia molde 16S-rRNA previamente extraída. Los criterios de selección del par de primers para el estudio fueron un tamaño entre 18 a 22 nucleótidos, una temperatura de fusión entre 58 y 62°C, un porcentaje de %GC entre 40-60% y también que amplificasen una región entre 200 a 1000pb Véase Tabla No.1.

La especificidad y sensibilidad fueron analizadas mediante la herramienta de ProbeMatch de RDP II y la herramienta nucleotide BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Otros criterios también fueron tomados en cuenta como es su alta complementariedad con la secuencia blanco, baja autocomplementariedad para evitar sub productos de amplificación (DNA fold, <http://unafold.rna.albany.edu/>) como son los dímeros de primers y similitud de los puntos de fusión de ambos primers. Todos los softwares utilizados fueron de libre acceso y disponibles para cualquier tipo de estudio.

Adicionalmente, se optó por el análisis de las cepas de riesgo de *Helicobacter pylori* (J99, Shi470, HPAG1, P12 y J166) las cuales actualmente presentan sus genomas secuenciados en su totalidad mediante técnicas moleculares como los microarrays (You et al., 2012). Un estudio comparativo de los genomas de estas cepas de riesgo tuvo como producto de investigación la identificación de regiones genómicas que son específicas para cada cepa de riesgo registrada. Por tanto, a partir de estas secuencias específicas se intentó diseñar primers específicos para la identificación de cada cepa de riesgo en muestras positivas de *Helicobacter pylori*. Los criterios de selección de los primers fueron los mismos que para los primers 16S rRNA y se utilizó la herramienta nucleotide BLAST para verificar que los primers no sean complementarios a secuencias que no son de interés. Sin embargo, los primers para las cepas de *H. pylori* tenían como blancos genes específicos de su genoma a diferencia de los primers para la detección de *H. pylori* (ver Tabla No.1).

*Tabla No. 1. Tabla de primers diseñados in silico tomando en cuenta parámetros de selección.*

Cepa	Secuencia (5'→3')	TM	%GC	Amplicon	Región
16S	GCGGGATAGTCAGTCAGGTG	59.90	60	706 pb	Región
	AAGATTGGCTCCACTTCGCA	59.96	50		16S-r-RNA



J99	CCTGGTAGCGGCAAAAGTTA	60.26	50	591 pb	Jhp0164
	TTTCATTGATGGTGGTGCAA	60.91	40		
Shi470	GGGGTTTTAGGTTTTCAACG	58.47	45	422 pb	Región genómica 874998- 876074
	ATTCAAGTGCATGGATAGGG	57.49	45		
HPAG1/J166	GGCTCAAATCTCGTGAAAGA	58.02	45	457 pb	Región genómica 94738- 95736
	AACCACCAAATACCCCTCAT	58.09	45		
P12/J166	GGGGGCTTTGTTGTTTAAAT	57.97	40	477 pb	VirB10-2
	GCTCATTAGTGCCGATGTCT	57.92	50		

Condiciones de selección: Tm (del inglés, *Melting Temperature*), porcentaje de guanosina-citosina %GC y amplicon entre 200 a 1000 pb.

#### 4.5 Determinación in-silico de la sensibilidad y especificidad de los primers diseñados

El set de primers seleccionado para la identificación de la región 16S-rRNA de *Helicobacter pylori* fue luego sometido a una evaluación de su especificidad y su sensibilidad mediante cálculos teóricos y fórmulas. Esto fue realizado a través de un análisis en ProbeMatch en la base de datos de RDP II que permite observar si los primers identifican secuencias de otras bacterias que no sean específicamente *Helicobacter pylori* y también el número de secuencias blanco que identifica el set de primers. Con dichos valores, es posible aplicar la fórmula para el cálculo de la sensibilidad  $(ts/(Tts) \times 100)$  donde ts es el número de

secuencias 16S blanco detectadas por los primer diseñados y Tts se refiere al número total de secuencias 16S blanco disponibles en la base de datos RDP II. Por otro lado, el cálculo de la especificidad teórica fue realizado mediante la siguiente formula  $nts/(Tnt) \times 100$  donde nts es el número de secuencias 16S no blanco que no son detectadas por los primer diseñados y Tnt se refiere a número total de secuencias 16S no blanco disponibles en la base de datos RDP II. Para confirmar y validar la eficiencia del set de primers se realizó el cálculo de la sensibilidad y especificidad teórica de otros primers 16S rRNA de otros estudios para una posterior comparación con los primers de este estudio (Ver Tabla No.2 en resultados).

#### **4.6 Amplificación de la región 16S-rRNA de *H.pylori* en muestras de ADN de biopsias gástricas.**

Los ensayos de PCR fueron realizados a una concentración de 20 µg/mL de ADN. Para esto, se necesitó realizar una dilución previa con solución de buffer TE para alcanzar la concentración necesaria. El set de primers diseñado para amplificar la región 16S-rRNA de *H. pylori* amplifican un fragmento de 709 pares de base (pb) dentro de la secuencia molde S00000525. Para verificar que los primers identifican satisfactoriamente *H. pylori* se realizaron ensayos PCR de prueba con cepas aisladas de *H.pylori* donadas por el Instituto de Salud Pública (INSPI) y también cepas donadas por colaboradores en Portugal (NCTC, 169, 2768 y 968) las cuales fueron confirmadas como *H.pylori* mediante la técnica de cultivo y luego consideradas como controles positivos en los ensayos posteriores. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas en lugar de los 2 µl de ADN de muestra gástrica que se adicionan a cada ensayo PCR. Cada reacción de PCR fue llevada a cabo a 10µL de volumen final con la presencia de buffer PCR 1X (PROMEGA, Wisconsin, USA), solución MgCL<sub>2</sub> 2.5 mM, 10µM de cada primer, dNTP mix 250 µM (PROMEGA, Wisconsin, USA) y finalmente 0.5 U/ul de enzima ADN polimerasa GoTaq (PROMEGA, Winsconsin, USA). Las

condiciones de PCR utilizados fueron de una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C de temperatura de *annealing* por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Finalmente una fase de elongación a 72°C por 5 minutos. Para poder visualizar los productos de PCR se utilizó la técnica de electroforesis en gel al 1.5% de agarosa con la presencia de 1 µL de bromuro de etidio para darle color al ADN y poder visualizarlo. Un ladder de ADN de 1KB (PROMEGA, Winsconsin, USA) fue utilizado para comparar el tamaño del amplicon de interés de 709 pb.

#### **4.7 Amplificación de regiones de genes específicos para las cepas de riesgo de *H. pylori***

Los ensayos de PCR para la identificación de regiones específicas de las cepas de riesgo de *H.pylori* (J99,P12,HPAG1,J166 y Shi470) fueron realizados con el mismo volumen final de 10 µl para cada reacción y con las mismas concentraciones de reactivos utilizados en los ensayos PCR para la región 16S-rRNA. Igualmente, se realizaron las respectivas optimizaciones de cada primer para poder encontrar la temperatura óptima de *annealing* para la amplificación de los fragmentos de interés. Los programas de PCR para cada set de primers fue el mismo que para el set de primers 16S-rRNA con la única diferencia en la temperatura de *annealing* que cambia según el set de primers que se está utilizando. Por último, la visualización de los amplicones fue realizada mediante la técnicas de electroforesis en gel a 1.5% de agarosa con la presencia de 1 µl de bromuro de etidio para la coloración del ADN y visualización bajo luz UV.

#### **4.8 Análisis estadístico de los resultados de encuestas y detección de *H.pylori***

Posterior a la detección de la región 16S-rRNA y de las cepas de riesgo de *H.pylori* en las 246 muestras gástricas donadas se prosiguió a realizar el respectivo análisis estadístico de

los posibles factores de riesgo asociados a la infección con *Helicobacter pylori* en la población ecuatoriana. El análisis estadístico fue llevado a cabo en el paquete estadístico STATA 13.0 (College Station, TEXAS, USA). En primer lugar, la variable de infección con *Helicobacter pylori* fue categorizada como ausencia o presencia de *H. pylori* para poder realizar la comparación de los diferentes factores de riesgo dentro de estos dos grupos en estudio. Las variables demográficas (edad, sexo, región, estado civil), variables socioeconómicas (ocupación, nivel de instrucción), hábitos personales (consumo de alcohol, tabaco y condimentos) y otras variables de referencia (estrés, problemas de estómago) fueron consideradas variables categóricas para el análisis estadístico. Para poder evaluar las diferencias de los factores de riesgo entre los dos grupos de prevalencia de *H.pylori* se realizó un test Chi-cuadrado considerando un valor  $P < 0.05$  y un intervalo de confianza de 95% para significancia estadística. También, se realizó una regresión logística para cada factor de riesgo y obtener los OR (del inglés, *Odd Ratios*) crudos. Después de obtener dichos ORs crudos se seleccionaron los factores con significancia estadística para ajustarlos y verificar que en efecto existe una relación directa con dicho factor de riesgo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análisis *in-silico* de primers para la región 16S-rRNA

Los primers diseñados para la identificación de la región 16S-rRNA de *H.pylori* demostraron poseer una sensibilidad y especificidad altas (93% y 100% respectivamente). Los primers en estudio, al compararse con otros primers de otros estudios (ver Tabla No.2), presentan menos probabilidad de producir falsos positivos debido a que solo detectan 11 bacterias no blanco siendo estas del género *Helicobacter*. La mayoría de estos primers resultan ser inespecíficos para *Helicobacter pylori* detectando gran cantidad de especies no blanco, sin embargo la mayoría pertenecientes al género *Helicobacter* como los primers HPF y HPR (Kobayashi et al., 2016). Igualmente, existen primers de otros estudios que, a pesar de poseer una gran especificidad, estos no resultan ser sensibles a la gran cantidad de cepas de *Helicobacter pylori* que pueden existir en el estómago, como por ejemplo los primers ACT1 y ACT2 que solo reconocen a 66 secuencias de las 241 secuencias totales de *Helicobacter pylori*. Asimismo, se puede observar la gran diferencia de efectividad con otras técnicas de detección del patógeno previamente explicadas.

*Tabla No. 2- Tabla comparativa de primers 16S-RNA con primers de otros estudios para la misma región.*

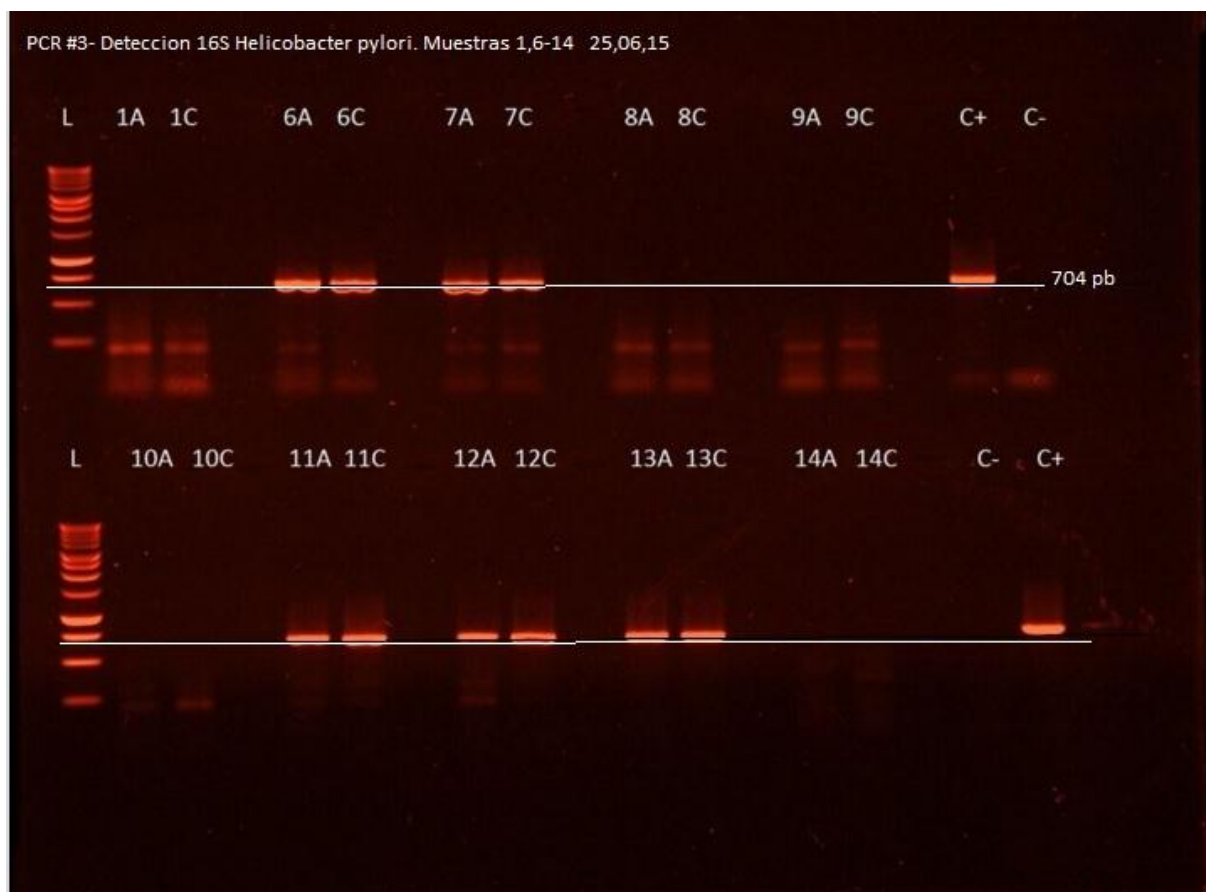
Nomb re	Secuencia (5'→3')	No. <i>H.pylori</i> detecta do	No. <i>H.pylori</i> no target detecta do	Especificid ad (%)	Sensibilid ad (%)	Referenc ia

<b>Heli-F</b>	<b>AACGATGAAGCTTCTAGCTTG</b> <b>CTAG</b>	<b>147</b>	<b>142</b>	<b>99,9</b>	<b>60,9</b>	(Germani et al., 1997)
<b>Heli-R</b>	<b>GTGCTTATTCTNAGATACCG</b> <b>TCAT</b>					
<b>ACT1</b>	<b>CTTGCTAGAGTGCTGATTA</b>	<b>66</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>27,4</b>	(Thoreson, Borre, & Andersen , 1995)
<b>ACT2</b>	<b>TCCCACACTCTAGAATAGT</b>					
<b>Hp-F</b>	<b>CTCATTGCGAAGGCGACCT</b>	<b>231</b>	<b>399</b>	<b>99,8</b>	<b>95,8</b>	(Kobayashi et al., 2016)
<b>Hp-R</b>	<b>TCTAATCCTGTTTGCTCCCCA</b>					
<b>Tet-F</b>	<b>CGG TCG CAA GAT TAA AAC</b>	<b>229</b>	<b>18</b>	<b>99,9</b>	<b>95,0</b>	(Lawson, Elviss, & Owen, 2005)
<b>Tet-R</b>	<b>GCG GAT TCT CTC AAT GTC</b>					
<b>H-pyl</b>	<b>GCGGGATAGTCAGTCAGGTG</b>	<b>227</b>	<b>11</b>	<b>100</b>	<b>93,8</b>	<b>Este estudio</b>
<b>H-pyl</b>	<b>AAGATTGGCTCCACTTCGCA</b>					

## 5.2 Determinación prevalencia de infección *H.pylori* en población ecuatoriana

La optimización de los ensayos de PCR fue un requisito para la realización del estudio de prevalencia de *H. pylori* en el grupo de muestras recolectadas de la población ecuatoriana. Por tanto, los ensayos preliminares de PCR usaron los controles positivos del INSPI y de colaboradores portugueses (NCT, 169 2768 y 968) para evaluar la

eficiencia de los primers diseñados. La optimización de dichos primers fue realizada a 3 temperaturas diferentes (57,58 y 59) y diluciones en serie de la muestra original (1/10, 1/100 y 1/1000) donde se pueden observar mejores resultados con la muestra original a 20 ng/uL. La temperatura de *annealing* óptima observada fue de 58°C. El fragmento de interés de 709 pb amplificado correspondiente a la detección de la región 16S rRNA mediante PCR se puede observar en el gel de agarosa al 1.5% en la Figura No.1



*Figura No. 1 Detección molecular por PCR de la presencia de H. pylori en muestras gástricas (antro y cuerpo) de pacientes voluntarios.*

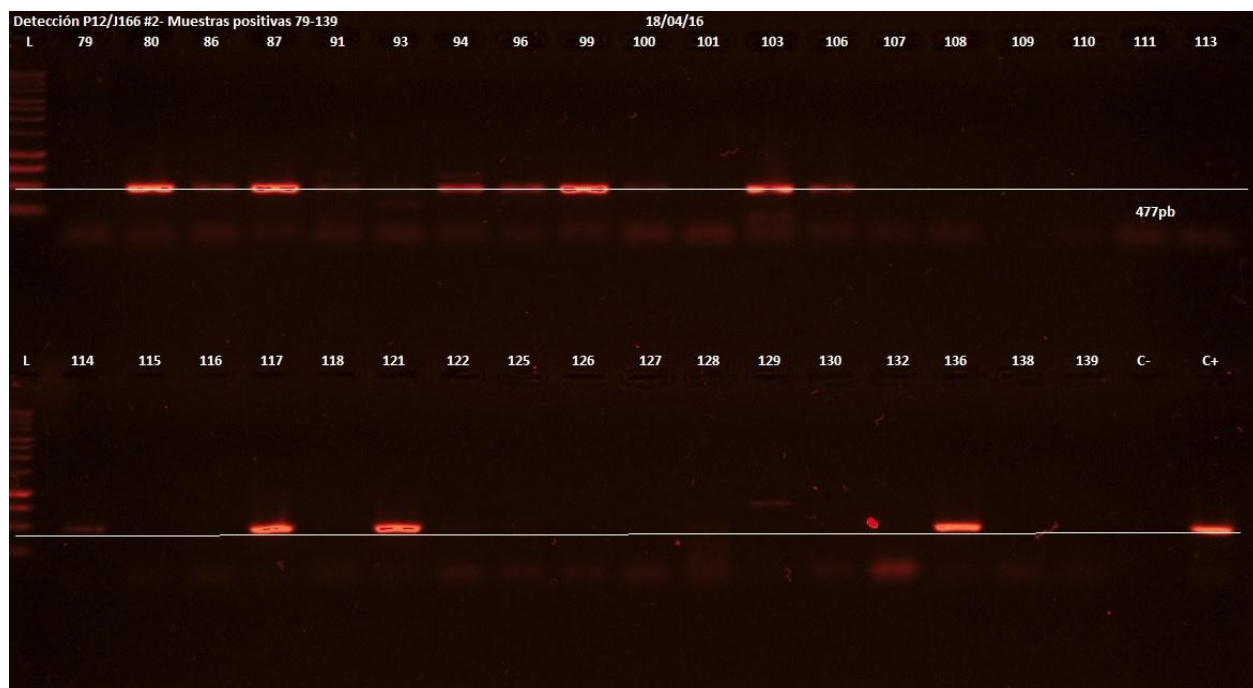
La detección de *H.pylori* por PCR fue realizada en las muestras de ambos muestras de antro y cuerpo detectándose 140 individuos positivos del total de 246 voluntarios. Así la prevalencia fue de 56,9% en la población recolectada de varias ciudades del Ecuador principalmente (Quito, Guayaquil y Cuenca). No se obtuvo una diferencia significativa

en la detección de *H.pylori* en muestras de antro (93%) y de cuerpo (95%). La mayoría de pacientes tuvieron un resultado positivo en ambas muestras gástricas.

### 5.3 Predominancia cepas de riesgo *H.pylori* en muestras positivas

De los 140 pacientes positivos para *Helicobacter pylori* se intentó su clasificación en las cepas patogénicas más referidas en estudios previos (Fischer et al., 2014; You et al., 2012), mediante la detección por PCR de cada cepa de referencia con los respectivos primers diseñados (Ver Tabla No.1). Para esto, se realizó la optimización para cada set de primers la cual necesito de diferentes temperaturas de *annealing* para poder obtener los fragmentos deseados para la detección de las regiones genómicas específicas para cada cepa (Ver Figura No.2) y así poder realizar los ensayos PCR en cada paciente para cada cepa de riesgo. En la Tabla No.3, aparecen las cepas más patogénicas J99, P12, HPAG1, Shi470 y J166 con sus respectivas prevalencias en la población ecuatoriana. También, se constató la presencia de más de una cepa en algunos pacientes positivos para la infección de *Helicobacter pylori*. Como se puede observar en la Tabla No.3, existe una mayor infección de los pacientes con cepas de riesgo pertenecientes a la población hpEurope como es el caso de **P12 (44,3%)** y **HPAG1 (37,1%)** (Tabla No.3). Por otro lado, la cepa de riesgo Shi470 perteneciente a la subpoblación hspAmerind se encuentra en una baja prevalencia en la población ecuatoriana (10,7%).





*Figura No. 2 Detección de la cepa J99 mediante amplificación de región específica en el genoma.*

*Tabla No. 3-Predominancia y clasificación en población de las cepas de riesgo en la población ecuatoriana*

CEPA	POBLACION	PREVALENCIA (%)
J99	hpAfrica	30,7
P12	hpEurope	37,1
HPAG1	hpEurope	44,3
J166	hpEurope	16,4
Shi470	hspAmerind	10,7

#### **5.4 Análisis estadístico para factores demográficos de la población**

El estudio epidemiológico recolectó información para variables demográficas de edad, sexo, región y estado civil con las cuales se realizó un posterior análisis estadístico de la

prevalencia en cada grupo. En la tabla No.4 se pueden observar valores de prevalencia para presencia y ausencia de *Helicobacter pylori* correspondientes para cada variable demográfica. En este análisis, se incorporó el valor p para el análisis de Chi cuadrado y la producción de *Odd Ratios* rudos mediante regresión logística.

En términos demográficos, los resultados demuestran una mayor prevalencia en grupos de edad jóvenes y una menor prevalencia en la población mayor a los 50 años, donde este último dato posee una alta significancia estadística cuando se le compara con la categoría de edad basal (18-29 años). Esta significancia se la puede confirmar con los valores P de la prueba hi cuadrado ( $P < 0,026$ ) con un intervalo de confianza superior al 95%. Igualmente, se verifico una menor prevalencia de *H.pylori* en ciudades de la región central (Portoviejo, Santo Domingo, Guayaquil, Ambato, Riobamba) comparado con otras ciudades del Norte y Sur, presentando así la menor probabilidad 55% y presentando el valor P de la regresión logística de 0.028 con un intervalo de confianza de 95%. Sin embargo, los restantes factores demográficos como el sexo y estado civiles no dieron ningún resultado significativo para la ausencia y presencia de *H.pylori*.

*Tabla No. 4- Análisis de factores demográficos para la prevalencia de H.pylori*

<b>Factores</b>	<b>Ausencia <i>H. pylori</i> N (%)</b>	<b>Presencia <i>H.pylori</i> N (%)</b>	<b>Valor P (Chi cuadrado)</b>	<b>OR CRUDO</b>	<b>Valor P (Regresión logística)</b>
<b>Edad (años)</b>					
18- 29	9 (8.6)	21 (15.4)		1	
30-39	13 (12.4)	24 (17.7)		0.79 (0.28-2.22)	0.657

40-49	11 (10.5)	24 (17.7)		0.93 (0.32- 2.69)	0.901
>50	72 (68.6)	67 (49.3)	0.026	0.39 (0.17- 0.93)	0.084
<b>Sexo</b>					
Femenino	59 (56.2)	71 (52.2)		1	
Masculino	46 (43.8)	65 (47.8)	0.53	1.17 (0.70- 1.95)	0.53
<b>Región</b>					
Norte	69 (65.7)	101 (70.8)		1	
Centro	24 (22.9)	16 (11.9)		0.45 (0.22- 0.92)	0.028
Sur	12 (11.4)	18 (13.3)	0.076	1.02 (0.46- 2.26)	0.95
<b>Estado Civil</b>					
Sin Pareja	41 (39.1)	48 (35.5)		1	
Con Pareja	64 (61.0)	88 (64.7)	0.0549	1.17 (0.69- 1.98)	0.55

## 5.5 Análisis estadístico para factores socio-económicos de la población

Los factores socioeconómicos evaluados fueron la ocupación y el nivel de instrucción de las personas voluntarias. En la Tabla No.5 se puede observar que la ocupación en oficios manuales y servicios es la categoría ocupacional con mayor probabilidad de presentar

infección con *H. pylori*. Esta categoría ocupacional posee un OR de 3.52 cuando se lo compara con la categoría basal de trabajo en casa con un OR de 1, demostrando también un intervalo de confianza superior al 99% (<0.001) El valor P por regresión logística para validar a la categoría de ocupación manual/servicios con la presencia de *Helicobacter pylori* en la población ecuatoriana. Por otro lado, la variable de nivel de instrucción no de demostró ninguna significancia estadística en ninguna de sus categorías aseverar es una menor probabilidad de poseer *H.pylori* en personas con un nivel de educación superior. Sin embargo, las personas de la categoría de instrucción presentan una reducción del 33% de la probabilidad de poseer *H.pylori* (OR 0.77) comparados con la categoría basal de instrucción primaria o ninguna.

*Tabla No. 5-Análisis estadístico de factores socioeconómicos asociados a la prevalencia con H.pylori*

Factores	Ausencia H. pylori N (%)	Presencia H.pylori N (%)	Valor P (Chi Cuadrado)	OR CRUDO	Valor P (Regresión logística)
<b>Ocupación</b>					
Trabajo de hogar	26 (24.8)	33 (24.3)		1	
Manual/Servicios	61 (58.1)	82 (60.3)		3.52 (1.95- 6.33)	<0.0001
Administrativo	8 (7.6)	10 (7.35)		1.93 (0.69- 5.39)	0.209
Profesional	10 (9.5)	11 (8.1)	0.9	1.7 (0.65- 4.44)	0.280
<b>Instrucción</b>					
Primaria	44 (41.9)	62 (45.6)		1	

Secundaria	18 (17.1)	27 (19.9)		1.06 (0.52- 2.16)	0.86
Superior	43 (41.0)	47 (34.6)	0.587	0.77 (0.44- 1.36)	0.38

### 5.6 Análisis estadístico para factores de hábitos personales e historia clínica de la población

En los factores de hábitos personales se encuentran variables de consumo de tabaco, alcohol y condimentos. Adicionalmente, también se incluyó el análisis de variables de historia clínica como presencia de problemas de estómago y el tipo de problema que presenta en el estómago (agudo o crónico). El tabaquismo fue el único factor que presentó una relación significativa con la prevalencia de *H.pylori*, resultando en una mayor probabilidad (OR 2.55) de presencia de la bacteria en la población con un intervalo de confianza de 95%. Además, el valor P por Chi cuadrado confirma que dicha aseveración posee significancia estadística, donde al ajustar con otras variables como sexo y edad, esta no pierde significancia ( $P > 0.04$ ) (ver tabla No.6). Por último, el análisis estadístico para el resto de variables resultó poco significativo ( $P > 0.05$ ) sin diferencias entre población positiva y negativa para *H.pylori*.

*Tabla No. 6- Análisis estadístico de factores de hábitos personales e historia clínica de pacientes.*

<b>Factores</b>	<b>Ausencia <i>H.pylori</i> N (%)</b>	<b>Presencia <i>H.pylori</i> N (%)</b>	<b>Valor P (Chi Cuadrado)</b>	<b>OR CRUDO</b>	<b>Valor P (Regresión logística)</b>
<b>Fumador</b>					
No	98 (93.3)	115 (84.6)		1	

Sí	7 (6.6)	21 (15.4)	0.035	2.55 (1.04- 6.26)	0.040
<b>Alcohol</b>					
No	89 (84.8)	109 (80.2)		1	
Sí	16 (15.2)	27 (19.9)	0.0354	1.38 (0.69- 2.71)	0.355
<b>Condimentos</b>					
No	84 (80.0)	108 (79.4)		1	
Sí	21 (21.0)	28 (20.5)	0.910	1.03(0.55- 1.95)	0.910
<b>Estrés</b>					
No	63 (60.0)	70 (51.5)		1	
Sí	42 (40.0)	66 (48.5)	0.187	1.41 (0.84- 2.37)	0.187
<b>Problemas estomago</b>					
No	28 (26.7)	45 (33.1)		1	
Sí	77 (73.3)	91 (66.9)	0.282	0.73 (0.41- 1.28)	2.283
<b>Tipo de problema</b>					
Agudo	59 (56.1)	88 (64.7)		1	
Crónico	46 (43.8)	48 (35.2)	0.179	0.70 (0.41- 1.17)	0.180

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Detección molecular de *H. pylori* por PCR en muestras gástricas

El método de diagnóstico seleccionado en este estudio epidemiológico fue la detección de la región 16S-rRNA por PCR del patógeno debido a que posee una especificidad y sensibilidad superior a todas las técnicas de detección disponibles para *H.pylori* como son el cultivo, el análisis histológico, el análisis serológico y el análisis de ureasa en ambas biopsias y aliento (Bickley et al., 1993; Chen et al., 2012; Wang, 2015). Como se puede observar en la Tabla No.2 los primers de este estudio superan o igualan a otros primers de estudios anteriores (Germani et al., 1997; Kobayashi et al., 2016; Lawson et al., 2005; Thoreson et al., 1995). Estos primers consiguen detectar un alto número de secuencias 16S-rRNA para *Helicobacter pylori* de interés (227 de un total de 241 cepas) y reducido número de secuencias que no son *Helicobacter pylori* (11 secuencias no blanco de las posibles 25754 secuencias disponibles para el dominio bacteria en RDP II) asegurando una disminución de falsos positivos en la prueba sin reducir la sensibilidad de la técnica.

A pesar de lo mencionado, el test RUT (del inglés, *Rapid Urea Test*) y el UBT (del inglés, *Urea Breath Test*) son las técnicas más extensamente utilizadas en muchos estudios epidemiológicos para esta bacteria (Russo et al., 2001; Santos et al., 2005; Sayed et al., 2011) y aceptada como adecuada para realizar estudios epidemiológicos (Hunt et al. 2004) Sin embargo, este tipo de técnica sigue siendo problemática debido a valores de especificidad y de sensibilidad que no se comparan con PCR (Lage et al., 1995; Sugimoto et al., 2009). Adicionalmente, la técnica también resulta ser problemática debido a que existen estudios

que demuestran la presencia de ureasa en otras especies de *Helicobacter sp.* y en general en otras bacterias que se presentan en el estómago humano (Brandi et al., 2006).

Adicionalmente, otro estudio que analiza la presencia de *Helicobacter pylori* en la boca y en el estómago concluyen que la bacteria puede estar presente en la boca y no resulta ser un buen indicador de infección en el estómago, ya que existen pacientes que no poseen infección y sí una contaminación con la bacteria en la boca (Klein et al., 2012). Debido a estas complicaciones con la técnica de UBT, usualmente se observan prevalencias elevadas de *H.pylori* en estos estudios con relación a otros que utilizan a las técnicas moleculares como base (Kabir, 2001; Oleastro et al., 2003).

En la presente investigación se utilizaron muestras de biopsias gástricas (antro y cuerpo) para la detección de la bacteria, lo cual convierte a la técnica PCR en una técnica invasiva y por tanto una limitación. A pesar de ello, esta técnica resulta ser específica para la detección de solo especies *Helicobacter pylori*, permitiendo un diagnóstico efectivo de la bacteria y su correcta correlación con las patologías asociadas (Brandi et al., 2006). La recolecta de muestras antro y cuerpo de los pacientes resultó de gran ayuda para confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* (Lan et al., 2012). En ellas, se observó que la mayoría de pacientes presentaron *Helicobacter pylori* en ambos tipos de muestra (93% Antro y 95% Cuerpo) y no existió diferencia en presencia del patógeno, estando en concordancia con otros estudios (Yousfi et al., 2001.).

## **6.2 Comparación de la prevalencia en la población ecuatoriana con otros países.**

La prevalencia de *H.pylori* en la población ecuatoriana incluida en este estudio fue de 56,9% (140 de un total de 246 pacientes), demostrando una prevalencia más baja que la esperada según otras investigaciones (70-90%) en países en desarrollo (Khalifa et al., 2010; Rollan,



2014; Sayed et al., 2011). En el caso de Brasil, se ha reportado prevalencias de *H.pylori* entre el 60-85% (Bobek et al., 2010; José et al., 1998; Rodrigues & Queiroz, 2005; Santos et al., 2005). Estudios epidemiológicos en seis países de Latinoamérica (México, Honduras, Costa Rica, Nicaragua, Chile y Colombia) confirman un promedio de 79,3% de prevalencia con la bacteria (Porrás et al., 2014) . Específicamente, en Colombia se observa que la prevalencia se encuentra elevada hasta valores del 73% en niños de 2 a 9 años.

Asimismo, la alta prevalencia de *H.pylori* también ha sido confirmada a tempranas edades en países como Perú, Colombia y Brasil (Dattoli et al., 2010; Goodman et al., 1996). Lo cual afirma que la bacteria normalmente se contrae a tempranas edades y que se encuentra correlacionada a otros factores de riesgo, como se analizará posteriormente en la discusión de los resultados estadísticos.

Esta diferencia entre la prevalencia esperada y la obtenida en este estudio se puede deber a que en la mayoría de los otros estudios epidemiológicos para *Helicobacter pylori* utilizan el test RUT y UBT (Goodman et al., 1996; Porrás et al., 2014; Santos et al., 2005) y técnicas serológicas como ELISA (Camilo et al., 2010; José et al., 1998; Rodrigues & Queiroz, 2005) las cuales presentan un elevado número de falsos positivos descrito en la sección de introducción.

Otra posible explicación para el valor de prevalencia obtenida en este estudio podría ser un reflejo de la mejora de servicios básicos e higiene de las personas, lo cual es expuesto como un factor de riesgo de importancia en países en desarrollo (Goodman et al., 1996; Kelley & Duggan, 2003).

### 6.3 Identificación de cepas de riesgo en el Ecuador

Las diferencias de la prevalencia entre países, desarrollados y en vías de desarrollo, están relacionadas a factores epidemiológicos pero también con el tipo de cepa *Helicobacter pylori* en la población en estudio (Mcclain et al., 2009; You et al., 2012). Diversos trabajos han analizado la genómica y la distribución geográfica de las cepas de *H.pylori* y concluido que su etiología deriva de la región este del continente africano y mediante estudios de relojes moleculares (*del ingles*, molecular clock) concordaron su vinculación con la evolución del ser humano (Falush et al., 2003; Fischer et al., 2010).

A pesar de que etiología ha sido determinada, las cepas de *H.pylori* se pueden dividir en diferentes poblaciones de las cepas diferenciadas por continentes, específicamente HpEurope, hPAsia2, hpAfrica2 y hpNEAfrica, hp Africa1, hpEastAsia (Falush et al., 2003). Cada una de estas poblaciones es caracterizada por diferentes cepas de *H.pylori* y permite a su vez analizar el flujo migratorio a través de los países y continentes.

Así, la epidemiología de *Helicobacter pylori* puede ser explicada en términos de migración del ser humano a lo largo de la historia (Falush et al., 2003). Eventos geofísicos como las formaciones del estrecho de Bering explicarían la posible transferencia de cepas asiáticas a América y eventos sociales importantes como la esclavitud y la colonización pueden explicar la transferencia de cepas africanas y europeas a poblaciones de América respectivamente (Falush et al., 2003; Suerbaum & Achtman, 2004).

De igual manera, en este estudio se analizaron las cepas de diferentes poblaciones mencionadas anteriormente, específicamente las cepas P12, HPAG1, SHi470, J166 y J99.

En el caso de un país como Ecuador, se debe tomar en cuenta la historia evolutiva de la sociedad, la cual ha pasado por varios cambios sociales de importancia como es la colonización de las tribus ancestrales indígenas por europeos. Al mismo tiempo, se debe

tomar en cuenta de que también existen cepas que son específicas para la población indígena ancestral.

Este es el caso de la cepa Shi470, que pertenece a la subpoblación hpAmerind de la población hpAsia (Kersulyte et al., 2010). Esta cepa fue aislada de indígenas ancestrales localizados en Perú (Kersulyte et al., 2010), sin embargo la cepa también posee similitud genómica con otras cepas aisladas de indígenas americanos (Inuit) localizados en Alaska (Mcclain et al., 2009; Peleteiro et al., 2014).

Por tanto, al obtener una población hpEuropa predominante (P12 y HPAG1) en el caso ecuatoriano en comparación a la cepa de supoblacion hspAmerind (Shi470) nos puede confirmar el transcurso de estos eventos migratorios de *Helicobacter pylori*.

Por otro lado, la importancia de la detección de las cepas de riesgo en este estudio, viene dada por sus factores de virulencia que producen las enfermedades gástricas de importancia pudiendo ser ligados al cáncer gástrico (Aziz et al., 2014; Mcclain et al., 2009; Miernyk et al., 2011; You et al., 2012).

Como expresado en la Tabla No.3 (ubicada en Resultados), las cepas de *H.pylori* más dominantes en la población estudiada fueron HPAG1, P12 y J99. Esta esta caracterización preliminar de la población ecuatoriana con respecto a las cepas de predominancia demuestra una alta heterogeneidad de *H.pylori* a nivel nacional y la necesidad de realizar un estudio mucho mas extenso de las cepas de patogenicidad de la población.

Continua siendo necesario realizar una optimización de la identificación de las cepas *H.pylori* por PCR donde se aconsejaría realizar un MLST PCR para validarlos resultados positivos para la cepa identificada en este estudio inicial. Es recomendable realizar un MLST para las demás cepas patogénicas descritas en la literatura científica y que no fueron analizadas en este estudio. Otras cepas de interés podrían ser 26695, G27 y B128 (Fischer et al., 2010). Sin embargo, los resultados preliminares demostraron la posible identificación de

las cepas de riesgo mediante PCR y confirmaron la alta heterogeneidad de cepas *H.pylori* en la población ecuatoriana por flujos migratorios.

#### **6.4 Factores de riesgo para infección con *H.pylori***

El análisis estadístico de los datos epidemiológicos en los pacientes voluntarios permitió evaluar factores demográficos, socioeconómicos y hábitos personales. Esta evaluación estadística es importante para identificar grupos poblacionales con mayor riesgo de contraer infecciones severas con *H. pylori* y al mismo tiempo comparar los datos obtenidos con estudios anteriores en otros países de América del Sur. En la sección de los resultados de las Tablas 4, 5 y 6, aparece que los factores con significancia estadística en nuestra muestra poblacional fueron la edad (factor demográfico), la ocupación de servicios/manual (factor socioeconómico) y hábitos de tabaquismo (factores personales).

Mediante el análisis por regresión logística, se pudieron obtener valores OR crudos y ajustados que apuntaban a una disminución de la probabilidad de poseer *Helicobacter pylori* con el aumento de la edad del paciente, siendo concordante con otros estudios (Goodman et al., 1996; Santos et al., 2005) . En primera instancia, esto puede ser debido a que muchos pacientes a esta edad se someten a un tratamiento por antibióticos. Sin embargo, a pesar de que el estudio fue exclusivo para personas mayores a los 18 años, muchos estudios han encontrado una prevalencia elevada de *Helicobacter pylori* en niños aseverando la conclusión de que *Helicobacter pylori* es una bacteria adquirida a tempranas edades (Aguemon et al., 2005; Khalifa et al., 2010; Zhu, Zhou et al.,2014).

Igualmente, en el 2010, un estudio demuestra una mayor prevalencia de *H. pylori* en la población joven de los suburbios de Quito (Estrella et al., 2010), corroborando así nuestros resultados en la categoría más joven de la población ecuatoriana evaluada.

Si se tiene en cuenta que la infección ocurre a temprana edad, la misma se asocia a factores socioeconómicos como el nivel de higiene, ingresos de la familia, tipo de vivienda y número de personas por vivienda que demostraron aumentar la transmisión del patógeno y que son más comunes en países en desarrollo (Aguemon et al., 2005; Democrática, 2005.; Rodrigues & Queiroz, 2005).

En términos de factores socioeconómicos, la ocupación fue el único factor estadísticamente relacionado con la infección con *H. pylori* mediante OR crudos y ajustados con otras variables determinantes (Sexo, Ciudad y Edad). En el presente estudio se identificaron a las ocupaciones manuales y de servicios como aquellas con mayor riesgo de adquirir infección con la bacteria, estando de acuerdo con hallazgos de otras publicaciones internacionales (Ozaydin et al., 2013; Russo et al., 2001).

En el caso del Ecuador, las ocupaciones manuales son generalmente relacionadas con agricultura, ganadería y otras profesiones relacionadas a sectores poblacionales socioeconómicamente vulnerables (Chavarria, 2014). No obstante, la ocupación puede también estar ligada a otras variables socioeconómicas, por ejemplo, el tipo de agua consumida, la higiene personal y los servicios básicos expuestos.

Así, se propone que futuros estudios deben incluir un mayor número de variables socioeconómicas que posibiliten una comparación de mayor seguridad con otros estudios epidemiológicos (Khalifa et al., 2010).

El valor OR de 3.52 en la ocupación de servicios/manual ( $P < 0.0001$ ) sugiere que los factores socioeconómicos son los principales factores de riesgo de contraer infección de *H. pylori*, estando de acuerdo con otros estudios realizados en países de Latinoamérica (Russo et al., 2001; Syam et al., 2015).

Por último, el presente estudio evaluó factores de hábitos personales que estudios anteriores identificaban como factores de riesgo en las poblaciones estudiadas (Eshraghian, 2014; Ozaydin et al., 2013; Russo et al., 2001), como por ejemplo, hábitos de consumo de alcohol, condimentos, tabaquismo y nivel de estrés.

Los datos obtenidos no demuestran ninguna significancia estadística con los factores de hábitos personales estudiados con excepción al tabaquismo. El tabaquismo y la prevalencia de *H. pylori* presentan un OR crudo de 2.55 (P de 0.035 por la prueba de Chi cuadrado), donde los fumadores presentan una mayor probabilidad de tener *H. pylori* en comparación a voluntarios no fumadores. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en países de Suramérica, como Brasil (Santos et al., 2005) Colombia (Goodman et al., 1996), y otros países europeos, como Italia (Russo et al., 2001).

A pesar de que existen estudios que vinculan al hábito de consumo de tabaco y alcohol como posibles variables de riesgo para la infección con *H.pylori* (Eshraghian, 2014; Ozaydin et al., 2013; Russo et al., 2001). El presente estudio solo refleja una mínima relación entre el consumo de tabaco y la infección, donde personas que respondían a ser fumadores regulares poseían mayor infección con *H.pylori*. Adicionalmente, el valor OR ajustado de 1.2 (P de 0.060 por regresión logística) con variables de edad y sexo demuestra que tal vez no exista una relación directa con el factor de tabaquismo sino más bien con estos factores expuestos en la regresión logística. No obstante, el valor  $P > 0.05$  nos asevera que no posee significancia estadística.

Otros estudios que ha encontrado una relación inversa (Yeh et al., 2009; Zhu et al., 2014) plantean una controversia al considerar al tabaquismo como un factor de riesgo. Es por ello que, en estudios futuros se aconseja considerar la variable de frecuencia de consumo de

tabaco para conseguir más categorías de fumadores y conseguir una comparación más precisa en el análisis estadístico.

,

## 7. CONCLUSIONES

La prevalencia de *Helicobacter pylori* en el Ecuador calculada por este estudio (56,9%) no se asemeja a los altos porcentajes esperados y reportados para países en desarrollo, específicamente Latino América (Brasil, Chile, Colombia, México, Costa Rica, Perú, Nicaragua) cuyas prevalencias superan valores de al menos 60%. Asimismo, la alta prevalencia reportada en estudios epidemiológicos con poblaciones menores de edad (de hasta valores de 90%) también permite concluir que *H.pylori* es un patógeno adquirido a temprana edad y ligado a otros factores de riesgo asociados. Sin embargo, se debe tomar en cuenta la metodología utilizada para la detección de *H.pylori* (UBT, RUT, ELISA, y PCR) de cada estudio epidemiológico para considerar parámetros de especificidad y sensibilidad de las técnicas y consecuentemente producir cálculos de la prevalencia de *H.pylori* confiables y de forma eficiente. Así, en el presente estudio se realizó la detección de *H.pylori* en la población ecuatoriana mediante la estrategia de detección de la región 16S-rRNA por PCR evaluada y validada como una técnica con alta sensibilidad (93,8%) y alta especificidad (100%) para la detección de *H.pylori*.

La identificación de cepas patogénicas de la población ecuatoriana resultaron en una alta predominancia de las cepas P12(44,3%) y HPAG1 (37,1%) las cuales han sido asociadas a la población hpEurope según análisis comparativos de sus genomas con otras cepas. En este análisis preliminar y en términos de migración se puede concluir una posible transferencia de cepas pertenecientes a la población europea. Ambas cepas poseen factores de virulencia como los genes *cagA* y *vacA* los cuales convierten a estas cepas en un posible factor de riesgo que influyere en la alta prevalencia de ciertos países.



Los cálculos de los factores de riesgo demográficos asociados a *H.pylori* concluyen que su infección se presenta en mayor probabilidad en la población de tempranas edades lo que se asemeja a previos estudios en otros países. Igualmente, se encontró una mayor prevalencia en personas con categoría de ocupación manual y de servicios, la cual es una variable socioeconómica. . Finalmente, el factor de riesgo del tabaquismo ha sido extensamente asociado por estudios con la infección de *H. pylori* y a su vez también del cáncer gástrico. El presente trabajo confirma que en efecto existe una relación donde los fumadores representan una población de riesgo. Sin embargo, la variable necesitó ser ajustada con otras variables para demostrar que la variable del tabaquismo no posee relación directa con la presencia de *H. pylori*.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta otros factores socio económicos que se encuentran ligados a esta poblaciones de riesgo y que no se han estudiado en el presente trabajo como es la calidad del agua, acceso a servicios básicos, nivel de higiene y otros factores reportados como posibles vinculantes a la infección con *H.pylori*.

## 8. RECOMENDACIONES

A pesar de haber evaluado y confirmado la especificidad y sensibilidad de la detección de *H.pylori* mediante la técnica PCR de la región 16S-rRNA es necesario aun verificar la presencia del fragmento de interés mediante secuenciación de las muestras amplificadas.

Por otro lado, resulta importante caracterizar la población negativa para *H.pylori* para explorar las diferentes especies que son capaces de colonizar el estómago humano.

Con respecto a la identificación de las cepas de riesgo de la población ecuatoriana mediante PCR, se recomienda realizar el mismo estudio utilizando un análisis MLST para confirmar la predominancia de las cepas de riesgo y su validación por secuenciación de muestras de interés. Sin embargo, los primers diseñados en el presente estudio resultaron ser específicos para la cepa de interés mediante análisis con la herramienta BLAST.

La metodología de extracción de ADN de tejidos animales y vegetales con la presencia de CTAB permite extraer muestras con altas concentraciones y buena calidad lo cual es un excelente indicador de que los resultados son confiables pero los ensayos PCR con los diferentes primers del estudio pueden ser optimizados para realizar PCR multiplex y así mejorar la eficiencia de la técnica.

Por último, futuros análisis epidemiológicos deberían incluir más factores socioeconómicos y un número de población en estudio superior para poder identificar aún más factores vinculados a la prevalencia de *H.pylori* con significancia estadística.

## 9. REFERENCIAS

- Aguemon, B. D., Struelens, M. J., Massougbodji, A., & Ouendo, E. M. (2005). Prevalence and risk-factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations Study design.
- Aziz, F., Chen, X., Yang, X., & Yan, Q. (2014). Prevalence and Correlation with Clinical Diseases of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Genotype among Gastric Patients from Northeast China. *BioMed Research International*, 2014, 1–7.  
<http://doi.org/10.1155/2014/142980>
- Baltrus, D. A., Amieva, M. R., Covacci, A., Lowe, T. M., Merrell, D. S., Ottemann, K. M., ... Guillemin, K. (2009). The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27 □, 191(1), 447–448. <http://doi.org/10.1128/JB.01416-08>
- Bickley, J., Owen, R. J., Fraser, a. G., & Pounder, R. E. (1993). Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *Journal of Medical Microbiology*, 39(March), 338–344.  
<http://doi.org/10.1099/00222615-39-5-338>
- Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Kacprzak, G., Adamiak, J., Kolodziej, J., ... Hoffman, R. M. (2010). A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Research*, 30(12), 4799–4804.  
<http://doi.org/10.1002/jmv>
- Brandi, G., Ph, D., Biavati, B., Ph, D., Calabrese, C., Ph, D., ... Biasco, G. (2006). Urease-Positive Bacteria Other than *Helicobacter pylori* in Human Gastric Juice and Mucosa, (8), 1756–1761. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00698.x>
- Calvet, X., Sa, J., Lario, S., Quesada, M., Casalots, A., Sua, D., ... Brullet, E. (2009).

- Accuracy of Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* : A Reappraisal, *48*, 1385–1391.  
<http://doi.org/10.1086/598198>
- Camilo, V., Dattoli, C., Veiga, R. V., Souza, S., & Pontes-de-, L. C. (2010). Seroprevalence and Potential Risk Factors for *Helicobacter pylori* Infection in Brazilian Children, *273–278*.
- Cao, P. (1995). Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(30), 17771–17777. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17771>
- César, A. C. G., Cury, P. M., Payão, S. L. M., Liberatore, P. R., & Silva, A. E. (2005). Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in benign lesions and gastric adenocarcinoma. *Brazilian Journal of Microbiology*, *36*(1), 12–16.  
<http://doi.org/10.1590/S1517-83822005000100003>
- Chen, T., Meng, X., Zhang, H., Tsang, R. W., & Tsang, T.-K. (2012). Comparing Multiplex PCR and Rapid Urease Test in the Detection of *H. pylori* in Patients on Proton Pump Inhibitors. *Gastroenterology Research and Practice*, *2012*, 898276.  
<http://doi.org/10.1155/2012/898276>
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, *13*(6), 607–615. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)
- Duynhoven, Y. T. H. P. Van, & Jonge, R. De. (2001). Transmission of *Helicobacter pylori* : a role for food ?, *79*(99), 455–460.
- Ecker, J. A., Massire, C., Hall, T. A., Ranken, R., Pennella, T. D., Ivy, C. A., ... Eshoo, M. W. (2006). Identification of *Acinetobacter* Species and Genotyping of *Acinetobacter baumannii* by Multilocus PCR and Mass Spectrometry, *44*(8), 2921–2932.  
<http://doi.org/10.1128/JCM.00619-06>

- Eshraghian, A. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among the healthy population in Iran and countries of the Eastern Mediterranean Region: A systematic review of prevalence and risk factors. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(46), 17618–17625. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i46.17618>
- Estrella, B., Egas, J., Egorov, A. I., Sempe, F., Naumova, E. N., & Griffiths, J. K. (2010). International Journal of Infectious Diseases The effect of *Helicobacter pylori* infection on growth velocity in young children from poor urban communities in Ecuador, 14, 788–791. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.03.013>
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M., ... Suerbaum, S. (2003). Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* Populations, 299(March), 1582–1585.
- Fischer, W., Breithaupt, U., Kern, B., Smith, S. I., Spicher, C., & Haas, R. (2014). A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity, 1–17.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., ... Haas, R. (2010). Strain-specific genes of *Helicobacter pylori* : genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer, 38(18), 6089–6101. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq378>
- Furuta, T., Kaneko, E., Suzuki, M., Arai, H., & Futami, H. (1996). Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2421–2425. Retrieved from <Go to ISI>://A1996VK78700016
- Garza-González, E., Perez-Perez, G. I., Maldonado-Garza, H. J., & Bosques-Padilla, F. J. (2014). A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(6), 1438–49.

<http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1438>

Germani, Y. I., Dauga, C. I. I., Duval, P., & Huerre, M. (1997). Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16s rRNA genes and identification of *H. feZk* in a human gastric biopsy, 315–326.

Goodman, K. J., Correa, P., Tenganá Aux, H. J., Ramírez, H., DeLany, J. P., Guerrero Pepinosa, O., ... Collazos Parra, T. (1996). *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *American Journal of Epidemiology*, 144(3), 290–299.

<http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008924>

Hugo, C. (Ed.). (2014). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas*: (11va edici). Costa Rica: FAO. Retrieved from

<http://www.fao.org/docrep/019/i3702s/i3702s.pdf>

Hunt, R., Fallone, C., Zanten, S. V. Van, & Sherman, P. (2004). Canadian *Helicobacter* Study Group Consensus Conference : Update on the management of *Helicobacter pylori* – An evidence-based evaluation of six topics relevant to clinical outcomes in patients evaluated for *H pylori* infection, 18(9), 547–554.

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>

José, F., Souto, D., Jesus, C., Fontes, F., Aguiar, G., Maria, A., ... Queiroz, D. M. (1998).

Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a Rural Area of the State of Mato Grosso , Brazil, 93(2), 171–174.

Kabir, S. (2001). Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *Journal of Medical Microbiology*, 50(12), 1021–1029. Retrieved from

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=m>

ed4&AN=11761185\http://jmm.sgmjournals.org/content/50/12/1021.full.pdf

- Kelley, J. R., & Duggan, J. M. (2003). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology*, *56*(1), 1–9. [http://doi.org/10.1016/S0895-4356\(02\)00534-6](http://doi.org/10.1016/S0895-4356(02)00534-6)
- Kersulyte, D., Kalia, A., Gilman, R. H., Mendez, M., Herrera, P., Balqui, J., ... Douglas, E. (2010). Helicobacter pylori from Peruvian Amerindians : Traces of Human Migrations in Strains from Remote Amazon , and Genome Sequence of an Amerind Strain, *5*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015076>
- Khalifa, M. M., Sharaf, R. R., & Aziz, R. K. (2010). Helicobacter pylori : a poor man ' s gut pathogen ?, 1–12.
- Klein, P. D. (1991). Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. *The Lancet*, *Vol 337*(337:1506-09), 1503–1506.
- Kobayashi, D., Eishi, Y., Ohkusa, T. Ã., Ishige, I., Suzuki, T., Minami, J., & Yamada, T. (2016). Gastric mucosal density of Helicobacter pylori estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading, *51*(2002), 305–311.
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 449–490. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Lage, A. P., Godfroid, E., Fauconnier, A., Burette, A., Butzler, J. P., Bollen, A., & Glupczynski, Y. (1995). Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*, *33*(10), 2752–2756. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567918>
- Lan, H.-C., Chen, T.-S., Li, A. F.-Y., Chang, F.-Y., & Lin, H.-C. (2012). Additional corpus biopsy enhances the detection of Helicobacter pylori infection in a background of gastritis with atrophy. *BMC Gastroenterology*, *12*, 182. <http://doi.org/10.1186/1471->

230X-12-182

- Lawson, A. J., Elviss, N. C., & Owen, R. J. (2005). Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales, (June), 282–286.  
<http://doi.org/10.1093/jac/dki199>
- Lopes, A. I., Vale, F. F., & Oleastro, M. (2014). *Helicobacter pylori* infection - recent developments in diagnosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(28), 9299–313. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9299>
- Lt, R., Rw, D. L., Ac, N., Lc, S., Vf, Q., Mac, S., & Slm, P. (2012). Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies , saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília , São Paulo , Brazil : presence of *vacA* and *cagA* genes, 18(2), 180–187.
- Malnick, S. D. H., Melzer, E., Attali, M., Duek, G., & Yahav, J. (2014). *Helicobacter pylori*: Friend or foe? *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(27), 8979–8985.  
<http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8979>
- Matsunari, O., Shiota, S., Suzuki, R., Watada, M., Kinjo, N., Murakami, K., & Fujioka, T. (2012). Association between *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Gastroduodenal Diseases in Okinawa , Japan, 876–883. <http://doi.org/10.1128/JCM.05562-11>
- Mcclain, M. S., Shaffer, C. L., Israel, D. A., Jr, R. M. P., & Cover, T. L. (2009). with gastric ulceration and gastric cancer, 14, 1–14. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-3>
- Miernyk, K., Morris, J., Bruden, D., McMahan, B., Hurlburt, D., Sacco, F., ... Bruce, M. (2011). Characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes among Alaskans and their correlation with clinical disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3114–21. <http://doi.org/10.1128/JCM.00469-11>
- Newell, D. G. (1991). Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 187(17), 31–38.



- Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P., & Mégraud, F. (2003). Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 397–402. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.1.397>
- Ozaydin, N., Turkyilmaz, S. A., & Cali, S. (2013). Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the <sup>13</sup>C-Urea breath test. *BMC Public Health*, *13*, 1215. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1215>
- Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A., & Lunet, N. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: A systematic review of studies with national coverage. *Digestive Diseases and Sciences*, *59*(8), 1698–1709. <http://doi.org/10.1007/s10620-014-3063-0>
- Porras, C., Guanacaste, P. E., Inciensa, F., Sabana, T. La, Norte, S., Jose, S., ... Anderson, G. (2014). NIH Public Access, *24*(2), 209–215. <http://doi.org/10.1007/s10552-012-0117-5>.Epidemiology
- Rimbara, E., Sasatsu, M., & Graham, D. Y. (2013). PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *943*, 279–87. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4\\_19](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_19)
- Rodrigues, M. N., & Queiroz, D. M. M. (2005). *Helicobacter pylori* Infection in Adults from a Poor Urban Community in Northeastern Brazil : Demographic , Lifestyle and Environmental Factors, *9*, 405–410.
- Rollan, A. (2014). Management of *Helicobacter pylori* infection in Latin America: A Delphi technique-based consensus. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(31), 10969. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i31.10969>
- Russo, a, Maconi, G., Spinelli, P., Felice, G. D., Eboli, M., Andreola, S., ... Bertario, L. (2001). Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in

- H. pylori-positive subjects. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(5), 1402–1408.
- Santos, I. S., Boccio, J., Santos, A. S., Valle, N. C. J., Halal, C. S., Bachilli, M. C., & Lopes, R. D. (2005). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. *BMC Public Health*, 5, 118. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-5-118>
- Sayed, M. M., Ibrahim, W. A., Abdel-bary, S. A., Abdelhakam, S. M., El-Masry, S. A., & Ghoraba, D. (2011). Salivary PCR detection of *Helicobacter pylori* DNA in Egyptian patients with dyspepsia. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 12(2), 211–216. <http://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2011.08.003>
- Suerbaum, S., & Achtman, M. (2004). *Helicobacter pylori* : recombination , population structure and human migrations, 294, 133–139. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.014>
- Sugimoto, M., Wu, J.-Y., Abudayyeh, S., Hoffman, J., Brahem, H., Al-Khatib, K., ... Graham, D. Y. (2009). Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 738–42. <http://doi.org/10.1128/JCM.01563-08>
- Syam, A. F., Miftahussurur, M., Makmun, D., Nusi, I. A., Zain, L. H., Zulkhairi, ... Yamaoka, Y. (2015). Risk Factors and Prevalence of *Helicobacter pylori* in Five Largest Islands of Indonesia: A Preliminary Study. *Plos One*, 10(11), e0140186. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140186>
- Thoreson, A. E., Borre, M. B., & Andersen, L. P. (1995). Developme : nt of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*, 10.
- Wang, Y.-K. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11221.

<http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>

Worku, M. L., Sidebotham, R. L., Walker, M. M., Keshavarz, T., & Karim, Q. N. (1999). The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: Implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*, *145*(10), 2803–2811.

Yamaoka, Y. (2011). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Review Gastroenterology Hepatology*, *7*(11), 629–641.

<http://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.154>.Mechanisms

Yeh, J. M., Goldie, S. J., Kuntz, K. M., & Ezzati, M. (2009). Effects of *Helicobacter pylori* infection and smoking on gastric cancer incidence in China: a population-level analysis of trends and projections. *Cancer Causes & Control*, *20*(10), 2021–9.

<http://doi.org/10.1007/s10552-009-9397-9>

You, Y., He, L., Zhang, M., Fu, J., Gu, Y., Zhang, B., & Tao, X. (2012). Comparative Genomics of *Helicobacter pylori* Strains of China Associated with Different Clinical Outcome, *7*(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0038528>

Yousfi, M. M., Reddy, R., Osato, M. S., & Graham, D. Y. (n.d.). Is Antrum or Corpus the Best Site for Culture of, *I*(2), 88–91.

Zhu, Y., Zhou, X., Wu, J., Su, J., & Zhang, G. (2014). Risk Factors and Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Persistent High Incidence Area of Gastric Carcinoma in Yangzhong City, 2014.