

ARTÍCULO ESPECIAL

CENTRO DE INVESTIGACIONES ODONTOLÓGICAS, MÉRIDA-VENEZUELA

Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Dra. Gloria Premoli,¹ Lic. Anajulia González,² Lic. Beatriz Millán-Mendoza,³ Dra. Tiziana Percoco⁴ y Dr. Amilcar Vielma⁵

RESUMEN

Se hizo una revisión con el objetivo de dar a conocer la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*, difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área. La reacción en cadena de la polimerasa es una herramienta biotecnológica muy útil para el diagnóstico de bacterias o virus de difícil cultivo *in vitro*. *Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa de difícil cultivo *in vitro* que coloniza la parte superior del tracto gastrointestinal y cuyo diagnóstico es de suma importancia, porque su presencia por largos períodos está asociada con gastritis crónicas, úlceras pépticas y carcinomas gástricos. Ha sido utilizada para detectar la presencia de *H. pylori* en muestras de biopsias gástricas, jugos gástricos, heces, saliva, placa subgingival, mediante fragmentos de genes de *H. pylori* que amplifican determinadas regiones de ADN.

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, *Helicobacter pylori*, diagnóstico microbiológico.

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) es una técnica biotecnológica que tiene como fin el amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica de ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación. Esta técnica es de gran aplicabilidad en una variedad de campos, incluidas la biología molecular, la biotecnología, la genética, la epidemiología, las ciencias forestales, las ciencias forenses, la microbiología, el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras. A su alta especificidad y sensibilidad la PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo; porque ofrece un

diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos. Otra de sus ventajas radica en que la secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma, pero una vez completada su reproducción, esta puede ser separada del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa. Además, la cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le ofrece una alta sensibilidad a la prueba.

La PCR es una reacción llevada completamente *in vitro* y requiere para su desarrollo de los elementos siguientes: 2 oligonucleótidos

¹ Máster en Ciencias en Biología Oral, Odontóloga.

² Licenciada en Bioanálisis.

³ Máster en Biotecnología. Licenciada en Bioanálisis.

⁴ Bachiller en Medicina.

⁵ Médico Cirujano.

sintéticos o cebadores (*primers*), que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, lo que proporciona la alta especificidad; una enzima termoestable, *Taq* polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* y 4 desoxyribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Este procedimiento permite obtener una duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico; es decir, cada ciclo consta de un proceso de desnaturalización (95 °C) que permite la apertura de las dobles cadenas; luego viene seguido por un proceso de anillamiento (40-65 °C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o cebadores que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia específica del ADN, formando una unión ayudada por enlaces iónicos (*primers* y hebra de ADN); en donde la enzima *Taq* polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72 °C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniendo por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de ADN de interés.¹

Dada la gran especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR se ha abierto una nueva etapa de diagnóstico, denominado diagnóstico molecular; de gran utilidad en los microorganismos de difícil cultivo como es el caso del *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), que es un bacilo espiralado gramnegativo, mótil, cuyo cultivo requiere de condiciones microaerobias a 37 °C y a pH fisiológico.²

Esta bacteria es el agente etiológico reconocido de varias alteraciones gastrointestinales en el hombre, como la gastritis crónica, úlceras gástricas, úlceras duodenales, adenocarcinoma de la parte distal del estómago (antro y fundus) y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT).³⁻⁶ De hecho ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como carcinógeno tipo I y en los últimos años se ha propuesto su participación en los procesos aterotrombóticos.⁷ En los países desarrollados, la seroprevalencia de *H. pylori* se incrementa con la edad: 10 % en adultos jóvenes y 70 % en mayores de 55 años; el rango de infección por este

microorganismo se estima entre 10-40 % en adultos sanos, en comparación con 80-100 % de los pacientes con gastritis o úlcera gástrica y duodenal.⁸ Pero en los países en vías de desarrollo, donde en términos generales las condiciones sanitarias son dudosas, más de 50 % de los niños están infectados antes de los 5 años, desempeñando un papel importante en la patogénesis de los síndromes diarreicos, la malnutrición y el retardo del crecimiento.⁹

El modo de acción del *H. pylori* está dado por los factores de virulencia que benefician en su penetración a la mucosa gástrica como es su forma espiralada, la presencia de flagelos, la actividad de la enzima ureasa; además de los productos de los genes *vacA* (*vacuolating toxin A*), *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) e *iceA* (*induced by contact with epithelium*).¹⁰ El gen *cagA* forma parte de la isla de patogenicidad (*PAIcag*); estructura genética que contiene múltiples genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de las cepas de *H. pylori*. El otro factor es la citotoxina vacuolizante, *vacA*, responsable de la creación de vacuolas en las células epiteliales, la cual presenta una gran variabilidad que confiere una mayor o menor patogenicidad a la bacteria. En general, *H. pylori* se puede clasificar en 2 grupos, basándose en los productos de los genes *cagA* y *vacA*: cepas tipo I, que son *cagA* positivas y expresan la citotoxina, y las cepas tipo II que son *cagA* negativas y pueden o no expresar la citotoxina.¹¹

La forma de transmisión de *H. pylori* no está clara y se habla de las vías bucal-bucal y bucal-fecal como las más importantes. Una de las evidencias que confirman este tipo de transmisión es su detección en placa dental, saliva y heces,^{5,12,13} sin embargo, hay controversias sobre si la cavidad bucal es o no un reservorio permanente o si por el contrario es una fuente de reinfección, porque el reservorio natural es aún desconocido.^{14,15}

Para diagnosticar la infección por *H. pylori* se han empleado cultivos microbiológicos, estudios histopatológicos, *test* del aliento, *test* rápido de la ureasa, *test* serológicos, *test* de antígeno en heces y más recientemente pruebas moleculares de ADN y ARN.¹⁶⁻²² Hoy día, el diagnóstico definitivo de la infección por *H. pylori* ha estado basado principalmente en el aislamiento de la bacteria en

cultivos microbiológicos o la detección del microorganismo en preparados histológicos, ambos métodos provenientes de muestras de biopsias gástricas obtenidas por procesos invasivos como la endoscopia. Sin embargo, existen otros métodos cuya determinación se correlaciona con la infección por este microorganismo pero con la diferencia que la obtención de la muestra no es de forma invasiva, es así el caso de los exámenes serológicos, el *test* del aliento o el *test* de la ureasa.

Los cultivos microbiológicos y los exámenes histológicos requieren de condiciones especiales y períodos de incubación largos (3-7 d), ambos con buena sensibilidad (90-98 %) y especificidad (98-100 %) antes del tratamiento; pero su principal desventaja está en que los niveles de confiabilidad y eficiencia decrecen inmediatamente después de la terapia antibiótica, por la disminución del número de bacterias y la aparición de formas cocoides.²³ Otra de las técnicas empleadas es el *test* del aliento, basada en la detección del dióxido de carbono proveniente de la actividad de la ureasa en el aire expirado; existe una buena especificidad y sensibilidad (95-98 %) en esta técnica y ha sido útil para monitorear a corto plazo la antibiótico-terapia, pero estas pruebas están limitadas al número de organismos presentes y a la ingesta de antiácidos; por otro lado los exámenes serológicos se basan en la detección de un anticuerpo específico (anti-*H. pylori*) como resultado de la respuesta inmune, marcada por la aparición de anticuerpos IgG en el suero del paciente; pero al igual que en el *test* del aliento, el diagnóstico inicial de la presencia de la bacteria debe siempre ir acompañado de otros sistemas más confiables que corroboren su existencia.^{3,23}

Con la aparición de las pruebas moleculares se ha podido detectar *H. pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas y que era muy difícil obtener resultados positivos para esta bacteria por metodología convencional; es así como se ha podido determinar su presencia en muestras de placa dental, aftas bucales, saliva, jugos gástricos, heces y placa ateromatosa, ofreciendo una mejor alternativa para el diagnóstico clínico y para estudios de investigación relacionados con su modo de transmisión; como por ejemplo la transmisión de reservorios en agua de consumo no potable o por la contaminación de los acueductos.^{7,24}

El diagnóstico por PCR de *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad de 95 % y su principal ventaja es que se puede detectar el microorganismo sin importar la viabilidad de la bacteria en las muestras.¹⁵ La especificidad de esta técnica viene dada por el uso de oligonucleótidos sintéticos, específicos para determinado gen y que facilitan la amplificación de una secuencia nucleotídica, que a su vez es específica para el *H. pylori* (tabla); es por esta razón que en los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria por medio de PCR basándose en:

Oligonucleótidos provenientes del gen de la ureasa A (*ureA*).

Oligonucleótidos provenientes de los genes que codifican el 16s ARN ribosomal (*16s rRNA*).²⁵

Oligonucleótidos provenientes de los genes codificadores de los antígenos especie-específicos (*SSA*, *cagA*).

Oligonucleótidos provenientes de secuencias al azar (*ramdon sequence*).

Oligonucleótidos provenientes del gen de la fosfoglucoamin mutasa (*glmM*).²²

Oligonucleótidos que determinan variantes alélicas del gen *vacA*.²⁴

Recientemente altos niveles de anti-CagA en sueros de pacientes con cáncer gástrico han sido reportados,²⁶ es por eso que el gen del *H. pylori* *cagA*, el cual codifica a una proteína asociada con la producción de citotoxinas, está siendo utilizado como marcador de virulencia y puede ser fácilmente detectable por medio de reacciones de PCR, por lo que ofrece así otra ventaja a favor de las determinaciones moleculares.²⁷ Además, con el incremento de las cepas resistentes a los antibióticos (claritomicina, metronidazol, tetraciclina)^{28,29} la PCR se convierte en una técnica molecular fácil de ejecutar y que ofrece la ventaja de un estudio profundo y confiable sobre susceptibilidad bacteriana. Reporta datos más confiables de la presencia de variantes bacterianas en un cultivo, especialmente cuando varias cepas están presentes.

La prueba de PCR ha demostrado que el *H. pylori* puede estar presente en la cavidad bucal.^{13,30,31} Su determinación en este tipo de muestras no pudiera ser evaluada por el método

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

Secuencia amplificada localizada en el gen	Tamaño del producto de PCR	Secuencia del oligonucleótido sintético	Referencia
Gen ureasa A	411 pb	5'GCC AAT GGT AAA TTA GTT3' 5'CTC CTT AAT TGT TTT TAC3'	40
Gen ureasa C	294 pb	5'AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T3' 5'AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC3'	41
Gen proteína 26 kDa	588 pb	5'ATG TTA GTT ACA AAA CTT3' 5'AAT TTA ATT TTC TTT AAG3'	40
Gen proteína 26 kDa	298 pb	5'TGG CGT GTC TAT TGA CAG CGA GC3' 5'CCT GCT GGG CAT ACT TCA CCA TG3'	42,43
Gen 16S rRNA	446 pb	5'CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC3' 5'AGG ATG AAG GTT TAA GGA TT3'	12
Gen 16S rRNA	500pb	5'TGG CAA TCA GCG TCA GGT AAT G3' 5'GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C3'	44
Secuencia Random	207 pb	5'TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC3' 5'CAT CTT GTT AGA GGG ATT GG3'	2
Fragmento de ADN 0,86 Kb	417 pb	5'CCC TCA CGC CAT CAG TCC CAA AAA3' 5'AAG AAG TCA AAA ACG CCC CAA AAC3'	13
vacA s1a	190 pb	5'GTC AGC ATC ACA CCG CAA C3' 5'CTG CTG GAA TGC GCC AAA C3'	24
vacA s1b	187 pb	5'AGC GCC ATA CCG CAA GAG3' 5'CTG CTG GAA TGC GCC AAA C3'	24
vacA s2	199 pb	5'GCT AAC ACG GGA AAT GAT CC3' 5'CTG CTG GAA TGC GCC AAA C3'	24
vacA m1	290 pb	5'GGT CAA AAT GCG GTC ATG G3' 5'CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC3'	24
vacA m2	352 pb	5'GGA GCC CCA GGA AAC ATT G3' 5'CAT AAC TAG CGC CTT GCA C3'	24

de la ureasa porque la cavidad bucal contiene otras bacterias productoras de esta enzima. Su presencia en esta cavidad puede ser como consecuencia del reflujo gástrico, lo que ha llevado a pensar que este microorganismo se encuentra de forma transitoria en la cavidad oral más que como parte de la microflora; sin embargo, esto puede estar asociado a una constante reinfección gástrica del individuo o reincidencia de las úlceras gástricas después de la antibiótico-terapia. La demostración de ser portador de *H. pylori* en muestras bucales tiene aplicaciones inmediatas, con las recomendaciones de prevenir transmisiones en el grupo familiar vía bucal-bucal.

Existen metodologías que se basan o se combinan con el PCR para obtener mejores resultados y ofrecer ventajas adicionales en el diagnóstico de *H. pylori*, es así como el PCR puede ser utilizado junto con otras técnicas permitiendo desarrollar las virtudes de cada método. Este es el caso de la técnica conocida como PCR-ELISA que ofrece la reproducción de una secuencia determinada de ADN combinada con la detección del ELISA en formato de placa que puede ser

ejecutado en corto tiempo e incluso ser automatizado, lo que aporta un beneficio adicional al grado de sensibilidad y especificidad del método.^{32,33} La técnica de RAPD's (siglas del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) que se ha utilizado para realizar estudios epidemiológicos y reconocimiento de diferentes cepas de *H. pylori*, en este caso se utilizan oligonucleótidos al azar para comenzar con la síntesis de ADN de sitios genómicos que son fortuitamente iguales.^{34,35} Esta técnica ha sido muy útil para estudiar la diversidad de la secuencia de ADN dentro de las especies de microorganismos y también de las plantas.³⁶ Otro ejemplo, es la técnica de RFLP-PCR en la cual el producto del amplificado es digerido con enzimas de restricción, y permite tipificar e identificar cepas resistentes a antimicrobianos.³⁷

Una de las nuevas aplicaciones es la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, para la cuantificación de pequeñas cantidades de una secuencia específica utilizando una reacción competitiva de PCR. Esta técnica ha sido muy útil para la cuantificación de ARNm y ADN de microorganismos, coamplificando 2 diferentes

templados en el mismo tubo pero teniendo en cuenta que los *primers* tienen los mismos sitios de reconocimiento; por lo tanto cualquier variable que altere la reacción de amplificación deberá afectar a los 2 templados sin diferencia y el aumento del producto de amplificación se mantendrá constante incluso bajo diferentes condiciones de eficiencia de amplificación. La tasa de los productos de PCR está relacionada con la concentración inicial del templado. Dentro de los 2 templados, uno es un estándar interno competitivo de concentración conocida y el otro es la secuencia de interés de cantidad desconocida; así por lo tanto la cantidad inicial de la secuencia de interés puede ser determinada a partir de la cantidad del estándar interno.³⁸ Dentro de estos en los últimos avances de la biotecnología se encuentran los ensayos o análisis de *microarrays* y biochips donde se definen como una matriz bidimensional de material genético, que permite la automatización simultánea de miles de ensayos encaminados a conocer en profundidad la estructura y el funcionamiento de la dotación genética, tanto en los distintos estados de desarrollo como patológicos del paciente relacionados con el *H. pylori*.³⁹

Tomando en cuenta lo antes dicho, la principal ventaja de esta novedosa tecnología frente a los métodos tradicionales reside en detectar de una manera confiable, rápida y efectiva el ADN de *H. pylori* en muestras bucales, fecales y gástricas; indicando que esta técnica puede ser más ampliamente utilizada en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* y en el monitoreo de la antibiótico-terapia de los pacientes con úlceras. Además, la existente incidencia epidemiológica de la asociación entre *H. pylori* y cáncer gástrico ocasiona que todo tipo de esfuerzo para mejorar y facilitar el diagnóstico de esta bacteria sea valioso y efectivo para el beneficio de la población; es por eso que las técnicas moleculares están saliendo del área de la investigación y cada día se ve más popularizado su uso en el diagnóstico rutinario.⁴⁰⁻⁴⁴

AGRADECIMIENTOS

Al CDCHT de la Universidad de los Andes por su continuo apoyo a las labores de investigación. Proyectos financiados por CDCHT: N° O-062-99-D07; O-046-96-07-A; O-40-95-B-07; O-047-96-

07-C; O-052-97-07-C; Proyectos de CONICIT: S1-2000000475; F12001001203.

SUMMARY

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a biotechnological useful tool for the diagnosis of bacteria or viruses with high *in vitro* growth requirements. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium that colonizes the upper part of the gastrointestinal tract and its diagnosis is very important since it is associated with chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric carcinomas. Because of the difficult growth requirements of the *H. pylori*, the PCR is being used for its diagnosis in samples of gastric biopsy, gastric juices, feces, saliva and subgingival plaque using specific *H. pylori* DNA fragments. This paper is a literature review that outlines the use of PCR in the diagnosis of *H. pylori*, the benefits and future applications of this technique in this area.

Key words: Polymerase chain reaction, PCR, *Helicobacter pylori*, microbiological diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- Valentine J, Arthur R, Mobley H, Dick J. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:689-95.
- Marshall B. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994;89:S116-28.
- Graham D. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* 1997;113:1983-91.
- Vaira D, Holton J, Menegatti M, Gatta L. Routes of *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:S279-85.
- Covacci A, Telford J, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999;284:1328-33.
- Martinez A, Martinez M. *Helicobacter pylori*: ¿un nuevo factor de riesgo cardiovascular?. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:652-6.
- Megraud F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:73-88.
- Weaver LT. Aspects of *Helicobacter pylori* infection in the developing and developed world. *Helicobacter pylori* infection, nutrition and growth of West African infants. *Trans Roy Trop Med Hyg* 1995;89:347-50.
- Akopyants N, Fradkor A, Diatchenko L, Hill J, Subert P, Lukyanov S, et al. PCR-based subtractive hybridization and difference in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 1998;13108-13.
- Han S, Schneider T, Loos M, Bhakdi S, Maeurer M. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Helicobacter pylori vacA* gene: association with gastric histopathology. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1999;188:131-8.
- Mapstone NP, Lewis FA, Tompkins DS, Lynch D. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 1993;341:47.
- Li C, Ha T, Ferguson D Jr, Chi D. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and heces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996;41:2142-9.

14. Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielanski W. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. *J Physiol Pharmacol* 1996;47:121-9.
15. Madinier I, Fosse T, Monteil R. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *J Periodontol* 1997;68:2-6.
16. Dent J, McNulty C. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pyloridis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:555-8.
17. Goodwin C, Blincow , Warren J, Waters T, Sanderson C, Canton L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1985;38:1127-31.
18. Debongnie J, Pauwels S, Raat A, de Meius Y, Haot J, Mainguet P. Quantification of *Helicobacter pylori* infection in gastritis and ulcer disease with a simple and rapid carbon-14-urea breath test. *J Nucl Med* 1991;32:1192-8.
19. Marshall B. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987;82:200-10.
20. Kosunen T, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992;339:893-5.
21. Ni Y, Lin J, Huang S, Yang J, Chang M. Accurate diagnostic of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen test and other currently available test in children. *J Pediatr* 2000;136:823-7.
22. Lu J, Perng C, Shyu R, Chen C. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37:772-4.
23. Lage A, Fauconnier A, Burette A, Glupczynski Y. Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:530-3.
24. Lu, Y, Redlinger T, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated Municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:1436-9.
25. van Doorn L, Debets-Ossenkopp Y, Marais A, Sanna R, Megraud F, Kusters J, et al. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1779-82.
26. Crabtree J, Wyatt J, Sobala G, Miller D, Tomkins D, Primrose J, et al. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 1993;34:1339-43.
27. Lage A, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler J, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2752-6.
28. Alarcon T, Vega A, Domingo D, Martinez M, Lopez-Brea M. Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults *Rev Esp Quimioter* 2003;16:53-7.
29. Dailidiene D, Bertoli M, Miciuleviciene J, Mukhopadhyay A, Dailide G, Pascasio M, et al. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother*.2002;46:3940-6.
30. Banatwala N, Romerolopez C, Owen R. Use of Polymerase chain reaction to detect *Helicobacter pylori* in the dental plaque of healthy and symptomatic individuals. *Microbiol Ecol Health Dis* 1994;7:1-8.
31. Riggio M, Lennon A. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. *J Med Microbiol* 1999;48:317-22.
32. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Megraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut* 1999;44:463-7.
33. Monteiro L, Cabrita J, Megraud F. Evaluation of performances of three DNA-Enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2931-6.
34. Akopians N, Buckanov N, Ulf Westblom T, Kresovich S, Berg D. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acid Res* 1992;20:5137-42.
35. Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 1996;147:661-9.
36. Navaglia F, Basso D, Plebani M. Touchdown PCR : a rapid method to genotype *Helicobacter pylori* infection. *Clin Chem Acta* 1997;262:157-60.
37. Senyüz I, Menevse S, Iffet F. PCR and RFLP analysis for identification and typing of *Helicobacter pylori* strain isolated from gastric biopsy specimens. *Tohoku J Exp Med*. 2000;190:213-22.
38. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 2000;53:218-22.
39. Sepulveda A, Tao H, Carloni E, Sepulveda J, Graham D, Peterson L. Screening of gene expression profiles in gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* using microarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;(16 Suppl 2):145-57.
40. Clayton C, Kleanthous P, Coates D, Morgan D, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:192-200.
41. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993;31:1420-5.
42. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, O'Toole P. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:54-8.
43. Wadstrom T, Tyszkiewicz T, Bergenzaun P, Olsson K. *H. pylori* in gastric juices aspirates and dental plaque. *Ir J Med Sci* 1992;16:27-8.
44. Nguyen A, Engstrand L, Genta R, Graham D, El-Zaatari F. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription- polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:783-7.

Recibido: 4 de febrero de 2003. Aprobado: 30 de agosto de 2003.
 Dra. Gloria Premoli. Centro de Investigaciones Odontológicas.
 Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Edificio EL
 Rectorado. Calle 23 entre avenidas 2 y 3. Mérida, 5101.
 Venezuela. Teléfono: 58-0274-2402388. Fax: 58-0274-2402418
 Correo electrónico: premoli@ula.ve