
DETECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* POR PCR DEL GEN 16S EN BIOPSIAS GÁSTRICAS COLECTADAS EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ: ESTUDIO PRELIMINAR

Sebastián Rojas-Lara¹, Carlos Eduardo Barragán²,
Martín Alonso Bayona-Rojas³, Ricardo Oliveros⁴,
Andrés Julián Gutiérrez-Escobar⁵

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria relacionada con diferentes enfermedades digestivas que afecta a un número significativo de individuos en la población Colombiana. Si bien se dispone de diferentes técnicas de diagnóstico para este patógeno, los procedimientos microbiológicos e histológicos utilizados rutinariamente requieren de varios días para generar resultados. Actualmente las técnicas de biología molecular muestran resultados favorables para la identificación de patógenos debido a que cada vez son menos costosas y los resultados se obtienen en menor tiempo en comparación con los procedimientos convencionales. En el presente estudio evaluamos la técnica de PCR de un fragmento del gen DNAr 16S para determinar la presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas de pacientes que asistieron a consulta en dos Instituciones de salud en Bogotá. En 23 de 69 muestras evaluadas se identificó la presencia de *H. pylori*. La metodología evaluada mostró ser pertinente y sencilla como protocolo de referencia para la detección rápida de este microorganismo en biopsias gástricas.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, biopsias, PCR, 16S.

¹ Estudiante Medicina, Joven investigador, Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas y Genética Humana Aplicada GIBGA. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A., Bogotá.

² Microbiólogo, M.Sc. Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas y Genética Humana Aplicada GIBGA. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

³ Bacteriólogo, Esp., M.Sc. Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas y Genética Humana Aplicada GIBGA. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

⁴ Médico, Gastroenterólogo. Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas y Genética Humana Aplicada GIBGA. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

⁵ Lic. Biología, M.Sc. Líder Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas y Genética Humana Aplicada GIBGA. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A Bogotá, Colombia.

DETECTION OF HELICOBACTER PYLORI BY 16S RDNA PCR IN GASTRIC BIOPSIES COLLECTED IN BOGOTA: A PRELIMINARY STUDY

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium related to different digestive diseases that affects a significant number of individuals in the Colombian population. Although it has different diagnostic techniques for this pathogen, frequently used microbiological and histological procedures require several days to generate results. Currently the techniques of molecular biology show favorable results for the identification of pathogens because fewer costly and results are obtained in less time compared to conventional methods. In the present study we evaluated PCR of 16S rDNA gene fragment for the presence of *H. pylori* in gastric biopsies of patients attending consultation on two health institutions in Bogotá. In 23 of 69 samples tested *H. pylori* was identified. The methodology proved to be evaluated as a easy and relevant protocol for the fast detection of this organism in gastric biopsies.

Key words: *Helicobacter pylori*, biopsies, PCR, 16S.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo flagelado, microaerófilo, con forma de espiral, que ha colonizado en forma natural a los seres humanos desde hace aproximadamente 10.000 años. La infección por *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, siendo así la infección más común del mundo (1,2). En 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a este patógeno como agente carcinógeno tipo 1 (3,4). Esta bacteria se ha asociado con diferentes enfermedades digestivas. Es conocida la implicación fisiopatológica de esta bacteria en la gastritis crónica activa; además, es uno de los factores que intervienen en la etiología multifactorial de la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma tipo MALT (Mucosa Linfoide Asociada a Tejido) de bajo grado de malignidad (5).

Se adquiere mayoritariamente en la infancia y presenta una baja frecuencia relativa (20 - 40%) en países desarrollados y una alta frecuencia (hasta 90%) en países en desarrollo (6,7).

En Colombia se ha investigado su presencia en muestras de biopsias gástricas y se ha estimado una prevalencia cercana al 70% (8). En un estudio que incluyó 203 pacientes, la prevalencia por *H. pylori* alcanzó un 94% (9). El diagnóstico histopatológico más frecuente fue gastritis atrófica crónica en 36,4%. Sólo en el 1,4% de los casos, la mucosa gástrica era normal. La prevalencia de cáncer fue de 9,3% y la de úlcera gástrica 5,1%. El 96,9% de los tumores malignos fueron carcinomas y linfomas sólo 3,1% (10).

Un estudio realizado en Bogotá evidenció gastritis crónica corporal en el 91% de los casos, de los cuales el 70% presentaban infección por esta bacteria (11). Un estudio mediante endoscopia a

1.022 participantes reportó que el 17,2% recibió diagnóstico de úlcera péptica, y de este grupo, un 92% presentó infección por este microorganismo (12).

Para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se han desarrollado diversas pruebas invasivas y no invasivas que permiten establecer la presencia de esta bacteria en los pacientes. Actualmente pueden emplearse pruebas microbiológicas, serológicas y bioquímicas. Sin embargo, son dispendiosas y de sensibilidad variable (13). Por este motivo la prueba de PCR para amplificar el gen ARNr16S de *H. pylori* ha despertado el interés en los últimos años (14,15).

La amplificación de segmentos del gen 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección de los genes codificantes del ARNr 16S de bacterias, debido a que se encuentran altamente conservados en todos los microorganismos, los cuales tienen la particularidad de presentar variaciones concentradas en zonas específicas (14).

Las variaciones se encuentran en los oligonucleótidos firm11, secuencias específicas cortas que aparecen en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, estos oligonucleótidos firm pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo, facilitando la identificación de especies (14). De igual manera, varios estudios demuestran la alta sensibilidad y especificidad de esta técnica para la identificación de *H. pylori* frente a las pruebas microbiológicas e histopatológicas (16).

El propósito del estudio fue identificar *H. pylori* mediante el empleo de la PCR de un segmento del gen 16S ARNr en ADN extraído a partir de biopsias gástricas de pacientes colombianos. Se contem-

plaron las diferentes connotaciones clínicas como el diagnóstico endoscópico e histológico de las entidades patológicas con respecto a los resultados obtenidos por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios para la obtención de muestras.

Los criterios endoscópicos fueron: mucosa enrojecida con imágenes endoscópicas eritematosas compatible con gastritis, lesión tipo úlcera péptica compatible con úlcera, lesión tipo tumoral, coliflor o lisa, herniación de la mucosa sangrante o no sangrante compatible con cáncer gástrico. Cada caso tuvo un registro del diagnóstico endoscópico por parte del especialista.

Toma y transporte de muestras. Se realizaron endoscopias de vías digestivas altas en consulta privada con el Gastroenterólogo, en dos instituciones de salud en Bogotá (Colombia), a pacientes quienes recibieron diagnóstico de gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y mucosa sana durante el periodo de Noviembre 2012 a Diciembre 2012. Se empleó un equipo Olympus Evis Exera CLE-145 Score, CV-145, y Endoscopio GIF Olympus Tips V, y las biopsias fueron tomadas con pinzas Olympus FB-21K.

Al cumplir con los criterios de inclusión-exclusión y de haber firmado el consentimiento informado y la autorización para la toma de la endoscopia, se procedió con la toma de biopsias según el protocolo de Sídney del 2009 (17). Se asistió a 117 procedimientos endoscópicos. En total 69 pacientes realizaron donación de biopsias gástricas. Los 48 pacientes restantes no autorizaron su participación o presentaron criterios de exclusión. La distribución de las muestras por género fue: 36 hombres y 33 mujeres; el promedio de edad fue 56 años (17 y 83 años). La procedencia correspondió a 49

pacientes de Bogotá y 20 pacientes procedentes de poblaciones aledañas. Se tomaron de una a siete biopsias en dos tubos con 15 ml de medio líquido *Campylobacter* con sangre de caballo al 7%, isovitalax al 2%, y antibióticos selectivos: trimetropin-sulfamatozazol al 0.1%, anfotericina al 0,1%, penicilina al y 0,1%, vancomicina 0,1%, en un tubo estéril de 15 ml y transportadas a 4° C a las instalaciones de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) dentro de las primeras 6 horas (18). Una vez en el laboratorio, las biopsias se homogenizaron vigorosamente en vórtex y se tomaron 150 µL del medio para las prueba de ureasa.

Aislamiento y obtención de biomasa para extracción de ADN

Las cepas aisladas a partir de las biopsias depositadas en medio de cultivo líquido descrito anteriormente, se obtuvieron al sembrarlas en agar Columbia, adicionado con 7% de sangre desfibrinada de cordero, suplemento selectivo DENT (vancomicina, trimetoprim, anfotericina B y cefsulodin) e Isovitalax al 1%. Se incubaron en microaerofilia entre 2 a 7 días hasta observar colonias características en un ambiente: 5-10% O₂; 5-10% CO₂; 80-90% N₂, humedad de 95% y temperatura de 37 °C.

A las colonias crecidas en el medio se le practicaron las pruebas básicas de identificación, consistentes en coloración de Gram, producción de ureasa, citocromo-oxidasa y catalasa.

Después de realizadas las pruebas bioquímicas, las muestras se cubrieron con un tapón de gasa y algodón para permitir el intercambio gaseoso; posteriormente se depositaron en bolsas especiales (Gaspak® pouch BBL) más el dispositivo de microaerofilia. Se llevaron a incubación durante 4 días a 37°C. El dispositivo mantuvo las siguientes

condiciones: CO₂ 5-10%; O₂ 5-10%; N₂ 80-90%, humedad de 95% (18).

Extracción de ADN. A partir de las muestras sembradas en medio líquido y tras 3-4 días de incubación, se tomaron 5 ml del cultivo y se realizó extracción del ADN genómico empleando el kit de extracción Ultra Clean microbial DNA isolation de MoBio®. El ADN obtenido fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE y cuantificado en el equipo Qubit®.

PCR. Para la amplificación del gen DNAr16S de *H. pylori* se utilizaron un par de cebadores previamente reportados en la literatura, derecho (5'- TCGTGTCGTGAGATGTTGGG -3') y reverso (5'- CCGTGGGCAGTAGCCAATTT-3'). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en tubos de 100 µL utilizando volúmenes finales de 20 µL con las siguientes concentraciones: Iniciadores (Sintetizados por BIONEER® 0,5 µM c/uno; Taq polimerasa (Biolase®, Bioline®) 0,07 U/µL; MgCl₂, 2.0 mM; dNTPs 250 µM c/uno, buffer de reacción 1X; DNA cromosomal ~30ng. Las condiciones de amplificación son las siguientes una denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturación, anillaje y elongación a 94°, 56°C y 72°C respectivamente; un tiempo final de extensión de 10 minutos a 72°C. Se amplifica un segmentó del gen DNAr 16s de aproximadamente 395 pb.

En cada ensayo de PCR se utilizó ADN de la cepa de *H. pylori* NCTC 11638 donada por el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana como control positivo, además de ADN extraído a partir de *E. coli* DH5α. La calidad del ADN extraído fue verificada mediante la amplificación del gen 16S procariota con el par de iniciadores 8UA: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3' y 1485B: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-3'.

Aspectos Éticos. El presente estudio se clasificó como un estudio de Investigación con riesgo mínimo dado por la clasificación de proyectos de investigación de la Comisión de Ética e Investigación (CEI).

RESULTADOS

Las muestras obtenidas en las dos instituciones de salud se clasificaron según el diagnóstico endoscópico, según se muestra en la Figura 1.

Se obtuvieron resultados bioquímicos consistentes con la presencia de *H. pylori* en 50 de las muestras procesadas, correspondientes al 72,46%, las 19 muestras restantes se interpretaron como biopsias negativas para la bacteria.

Se logró aislar ADN genómico de las 69 muestras gástricas en buena concentración y pureza, se obtuvieron ampliaciones del tamaño esperado para *H. pylori* en 23 de las 69 muestras (33.33%), frente a las 50 biopsias (72,46%) que mostraron positividad en las pruebas bioquímicas.

cas de *H. pylori* (Figura 2). Todas las muestras positivas por PCR fueron positivas en los test bioquímicos.

En ninguna de las pruebas realizadas se obtuvo amplificación con el ADN de *Escherichia coli* y se verificó la calidad del ADN extraído al obtener amplificación del gen 16S procariótico en todas las biopsias con resultado negativo para *H. pylori*.

DISCUSIÓN

La presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas fue evaluada por PCR de un fragmento del gen 16S, con la cual se obtuvo un índice de detección de 33,33%, inferior frente al índice de detección estimado con las pruebas bioquímicas que correspondió a 72,46%. Esta diferencia puede ser debida al aislamiento de otros microorganismos, entre otros relacionados con especies diferentes a *pylori* que se encuentran en el estómago y pueden arrojar resultados similares a *H. pylori*, mediante las pruebas bioquímicas evaluadas.



Figura 1. Frecuencia *H. pylori* por PCR según la patología endoscópica. En cada recuadro se describe la entidad endoscópica (número casos positivos por PCR/ número de casos totales) Porcentaje %. Fotos tomadas por Oliveros, R.

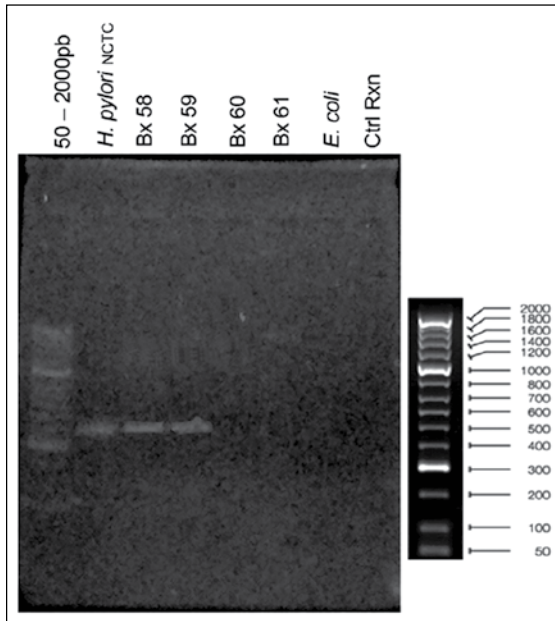


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa TAE al 2%. Muestras 058 a la 061. Marcador de tamaño molecular Hiperladder II®. CtrlRxn agua ultrapura. Se identifican como positivas muestras Bx 58 y Bx 59, en las cuales se observa amplicón de aproximadamente 400 pb.

El diagnóstico microbiológico puede llegar a ser dispendioso ya que se necesitan alrededor de 6 a 10 días para crecimiento e identificación de la bacteria, tiempo que en muchos casos no se dispone para iniciar un tratamiento eficaz y precoz contra el patógeno (19); además, algunas de estas pruebas identifican características bioquímicas del microorganismo, las cuales pueden ser positivas para otras bacterias con características similares inicialmente, como lo observamos en la práctica y en las cuales se encontraron microorganismos como *Bacteroides* spp, especies de *Helicobacter* cepa “flexispira” y *Arcobacter* spp aumentando la probabilidad de falsos positivos.

Las técnicas moleculares como la PCR son de gran utilidad y eficacia en el análisis de la presencia

específica de la infección. La sensibilidad de la reacción para la detección de *H. pylori* puede alcanzar el 100%, y su especificidad podría ser mayor que las pruebas serológicas (20). Por esta razón en algunos laboratorios es la forma de diagnóstico rápida de infección de la bacteria.

En Colombia y algunos países de Latinoamérica existen diversos métodos de diagnóstico del microorganismo. En su mayoría toman como principio la actividad microbiológica, lo cual puede conllevar a una identificación incorrecta. De igual manera, se ha visto limitada la identificación mediante pruebas microbiológicas como es cáncer tipo maltoma (MALT) y úlcera péptica donde existen cambios a nivel de la mucosa gástrica que falsean las pruebas dando una positividad errónea (19).

Existen estudios que soportan la función diagnóstica de la PCR 16s ADNr frente a pruebas de referencia para la detección específica de *H. pylori*, reflejando que representa una prueba robusta y rápida que abre puertas y posibilidades diagnósticas (20,21). Otros estudios corroboran las ventajas de las técnicas moleculares, como en el caso de la detección utilizando PCR multiplex (25) o por Q-PCR (16,22,23,27).

Existen varios genes blanco de amplificación por PCR que pueden evaluarse, dentro de los que están los genes de ureasa *ureA*, *ureB* y *ureC*; también diferentes regiones del gen ARNr 16S y 23S, que también muestran una alta sensibilidad en comparación con las pruebas de referencia (24).

En el presente estudio se obtuvieron resultados positivos en un tiempo promedio de 36 horas, teniendo en cuenta que en la metodología propuesta, las biopsias fueron incubadas para la obtención de una buena concentración de ADN que permitiera una adecuada amplificación por PCR.

Sin embargo, también pueden evaluarse protocolos de detección directamente a partir del ADN de biopsias maceradas (28). De esta forma la PCR podría llevar a resultados concluyentes en menos tiempo. De igual manera, este resultado se obtiene en un tiempo menor al que se emplearía realizando el diagnóstico microbiológico (18).

Los resultados obtenidos por PCR para la detección de *H. pylori* muestran la practicidad y rapidez en la detección de este microorganismo (29), y representan una opción primaria para la detección temprana de la infección ya que de acuerdo con los resultados obtenidos, el diagnóstico coincide con los resultados arrojados en el examen histológico. Como estudio preliminar se ha demostrado la practicidad que ofrece para la detección rápida de *H. pylori*, pero se deben realizar otros estudios comparativos frente a las pruebas comúnmente utilizadas con el fin de estimar valores predictivos para esta prueba.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la PCR 16S ADNr es un método de identificación de *H. pylori* que se puede contemplar como técnica más eficiente y rápida para la detección de la bacteria, con respecto a las pruebas microbiológicas. La PCR 16S ADNr es un método diagnóstico alternativo, se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad. Tiene como ventaja que es un método rápido, fácil, sencillo y relativamente económico, el cual debe utilizarse en laboratorios y centros hospitalarios para la detección de infecciones por *H. pylori*.

REFERENCIAS

1. Marshall B.; Warren, J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*.1984; 1: 1311-5.
2. Ishihara, S.; Fukuda, R.; Fukumoto, S. Cytokine gene expression in gastric mucosa: its role in chronic gastritis. *J Gastroenterol*.1996; 31:485-90.
3. WHO, International Agency for research on cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. In: WHO, International Agency for research on cancer. Infection with *Helicobacter pylori*. Lyon: International Agency for Research on cancer; 1994. p. 177-241.
4. International Agency for research on Cancer. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 61. Lyon: IARC 1994.
5. Arismendi, G.; Hernández, I.; Mengual, E.; Abreu, N.; Molero, N.; Fuenmayor, A.; Lizarzábal, M. Estimación de riesgo de cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica asociada a la infección por *Helicobacter pylori* en un escenario clínico. *Rev Gastroenterol Mex*. 2013; 78(03): 135-43.
6. Ortega, J.; Espinosa, A.; Calvo, A.; Verdugo, P.; Pruyas, M.; Nilsen, E.; Villarroel, L.; Pandilla, O.; Riquelme, A.; Rollan, A. *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients with benign gastroduodenal diseases. Analysis of 5.664 cases. *Rev Med Chile*: 2010; 138: 529-535.
7. Coelho, L.; Leon, R.; Quigley, E. Latin-American consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterology*. 2000; 95:2688-91.
8. Cisneros, S. Mecanismos de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol. [Trabajo de grado]. Bogotá D.C: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
9. Figueroa, M.; Cortés, A.; Pazos, Á. & Bravo, L. Susceptibilidad in vitro de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*.2012; 32(1) Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322454004>
10. Bravo, L.; Cortés, A.; Carrascal, E.; Jaramillo, R., García, L.; Bravo, P.; Badel, A.; Bravo, P. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Corporación Editora Médica del Valle: *Revista Colombia Médica*.2003; 34(3).
11. Martínez, J.; Henao, S.; Granados, C. (2007). La gastritis crónica atrófica corporal y la edad. *Rev Col Gastroenterol* [serial on the Internet]. [Ci-

- ted 2014 Oct 06]; 22(1): 17-22. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572007000100005&lng=en.
12. Li, Z.; Zou, D.; Ma, X.; Chen, J.; Shi, X.; He, J. et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China. *The American Journal of Gastroenterology* [serial on the Internet]. (2010, Dec), [cited August 20, 2012]; 105(12): 2570-2577. Available from: MEDLINE Complete.
 13. McColl, Kenneth EL. "*Helicobacter pylori* infection." *New England Journal of Medicine* 362.17 (2010): 1597-1604.
 14. Rodicio, M.; Mendoza, M. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España, *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22(4):238-45.
 15. Chen, T., Meng, X., Zhang, H., Tsang, R. W., & Tsang, T. K. Comparing multiplex PCR and rapid urease test in the detection of *H. pylori* in patients on proton pump inhibitors. *Gastroenterology research and practice*, 2012.
 16. He, Q.; Wang, J.; Osato, M.; Lachman, L. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10): 3720-3728.
 17. Yantiss, R.; Odze, R. Optimal Approach to Obtaining Mucosal Biopsies for Assessment of Inflammatory Disorders of the Gastrointestinal Tract. *AJG.* 2009; 104:774-783.
 18. Bayona, M. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol.* 2013; 28 (2).
 19. Duś, I.; Dobosz, T.; Manzin, A.; Loi, G.; Serra, C., & Radwan-Oczko, M. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013; 67: 261-268.
 20. Vinette, K.; Gibney, K.; Proujansky, R.; Fawcett P. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiology*, 2004; 4:5. Published online Jan 27, 2004. doi: 10.1186/1471-2180-4-5
 21. Monstein, H.; Nikpour, B.; Jonasson, J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *FEMS Microbiology Letters*. 2001; 199: 103-107. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10658.x
 22. Scaletsky, I.; Aranda, K.; García, G.; Goncalves, M.; Cardoso, S.; Iriya, K. & Silva, N. Application of Real-Time PCR Stool Assay for *Helicobacter pylori* Detection and Clarithromycin Susceptibility Testing in Brazilian Children. *Helicobacter*. 2011; 16(4):311-315.
 23. Ramírez, M.; Lario, S.; Casalots, A.; Sanfeliu, E.; Boix, L., Garcia, P.; Sánchez, J.; Monserrat, A. et al. Real-time PCR improves *Helicobacter pylori* detection in patients with peptic ulcer bleeding. *PLoS One*. 2011; 6(5):1-7.
 24. Moncayo, J.; Santacruz, J.; Álvarez, A.; Franco, B.; López, M.; Ángel, A., & Serrano, H. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. 2013.
 25. Lehours, P.; Siffré, E.; Mégraud, F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin. *BMC Gastroenterology*. 2011; 11(112).
 26. Chattopadhyay, S.; Patra, R.; Ramamurthy, T.; Chowdhury, A.; Santra, A.; Dahli, G.; Bhattacharya, S.; Berg, D.; Nair, G.; Mukhopadhyay AK. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(6):2821- 2824.
 27. Belda, S.; Sáez, J.; Santibáñez, M.; Rodríguez, J.; Galiana, A.; Sola-Vera, G. J.; Montserrat Ruiz-García, M. et al. Quantification of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by real-time polymerase chain reaction: comparison with traditional diagnostic methods." *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012; 74(3): 248-252.
 28. Smith, S.; Fowora, M.; Otegbayo, J.; Abdulkareem, F.; Omonigbehin, E.; Adegboyega, A.; Contreras, M.; Haas, R. Comparison of PCR with other diagnostic techniques for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients presenting with gastroduodenal symptoms in Nigeria. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; 2(2):178-184.
 29. Patel, S. K., Pratap, C. B., Jain, A. K., Gulati, A. K., & Nath, G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World journal of gastroenterology: WJG* 2014, 20(36), 12847.

Recibido: mayo 28, 2015

Aceptado: julio 23, 2015

Correspondencia:

Andrés Gutiérrez

andresgutierrez@colombia.com