

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**



**ESTUDIO MOLECULAR DE *Helicobacter pylori***  
**EN "CEBOLLA CHINA" (Allium fistulosum L.)**  
**REGADA CON AGUAS SERVIDAS**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO DE ALIMENTOS

**POR: FRANCISCO CORILLOCLA VALLADOLID**

**CALLAO - PERÚ**

**2005**

**ESTUDIO MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*  
EN "CEBOLLA CHINA" (Allium fistulosum L.)  
REGADA CON AGUAS SERVIDAS**

**DEDICATORIA**

**A DIOS Y A MI MADRE.**

## AGRADECIMIENTOS

- A la Ing. DÁNIZA GUERRERO ALVA, por concederme el honor de ser Patrocinadora de la investigación realizada, por su tiempo, sus conocimientos y orientación constante.
- Es un placer reconocer a la Dra. IVONNE GUERRERO ALVA, por su excelente e invaluable apoyo científico, revisión minuciosa y los sabios consejos vertidos a futuro.
- A la Ing. MELINA SALDARRIAGA LLERENA, por la ayuda técnica proporcionada en la preparación de la monografía. Asimismo por brindar alegría, dulzura y optimismo durante la transcripción de la misma.
- A mi querido hermano JUAN DANIEL, por el estímulo, preocupación y apoyo en la culminación de la monografía.
- Igualmente se desea hacer patente el reconocimiento al Biólogo JAIME BURNEO, por la orientación técnica en el laboratorio, paciencia y amistad brindada.

- Se debe hacer una mención especial a la Lic. YOLANDA VALLADOLID CÁRDENAS, por ser mi punto de apoyo, equilibrio e inspiración en la superación constante como hijo y como profesional.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ABREVIATURAS	xxi
RESUMEN	xxiii
I. INTRODUCCIÓN	25
II. REVISIÓN DE LITERATURA	28
2.1 GENERALIDADES SOBRE CEBOLLA CHINA ( <u>Allium</u> <u>fistulosum</u> L.)	28
2.1.1 ORIGEN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEBOLLA CHINA	28
2.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	32

2.1.2.1	REQUERIMIENTOS DE CULTIVO	34
2.1.3	PRODUCCIÓN NACIONAL	38
2.1.4	UTILIZACIÓN DE LA CEBOLLA CHINA	39
2.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA	39
2.2.1	CONTENIDO DE ELEMENTOS NUTRITIVOS	39
2.3	<i>Helicobacter pylori</i>	42
2.3.1	MICROBIOLOGÍA DEL AGENTE	42
2.3.2	EPIDEMIOLOGÍA DEL <i>Helicobacter pylori</i>	43
2.3.3	EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	47
2.3.3.1	GASTRITIS	47
2.3.3.2	ROL DEL <i>Helicobacter pylori</i> EN LA GASTRITIS CRÓNICA	49
2.3.3.3	<i>Helicobacter pylori</i> Y LA ENFERMEDAD	

	ULCEROPÉPTICA	50
	2.3.3.4 <i>Helicobacter pylori</i> Y EL CÁNCER	
	GÁSTRICO	59
	2.3.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS EN LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	62
2.4	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	63
	2.4.1 DEFINICIÓN	63
	2.4.2 ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	64
	2.4.2.1 DESNATURALIZACIÓN POR CALOR	64
	2.4.2.2. ALIENACIÓN	64
	2.4.2.3. EXTENSIÓN	65



2.4.3	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN ALIMENTOS	70
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.1.	POBLACIÓN Y MUESTRA	72
3.2.	DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO	73
3.3.	MATERIALES	77
3.3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	77
3.3.2.	MATERIAL DE LABORATORIO	87
3.3.3.	EQUIPOS DE LABORATORIO	88
3.3.4.	MATERIAL QUÍMICO	88
3.4.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO MOLECULAR	92
3.4.1.	MANIPULACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	92

3.4.2.	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	92
3.4.3.	EXTRACCIÓN ORGÁNICA	93
3.4.4.	PURIFICACIÓN DEL ADN	93
3.5	AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA MEDIANTE LA PCR	93
3.5.1.	CONDICIONES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN ESTÁNDAR	93
3.5.2.	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA	94
3.5.3.	ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	95
3.6	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	97
3.6.1.	CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AMPLICIONES	97

3.6.2.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	97
3.6.3.	IDENTIDAD GENÉTICA ADN-Hp DE LA MUESTRA Y EL CONTROL DE REFERENCIA	98
3.6.4.	COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ADN – Hp EN LAS PARCELAS EN BASE AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98
3.6.5.	FACTORES DE RIESGO QUE INTERVIENEN PARA LA PRESENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	100
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	102
4.1.	CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AMPLICONES	102
4.2.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	102
4.2.1.	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS ADN-Hp NEGATIVO	102

4.2.2	MUESTRAS QUE PRESENTAN AMPLIFICACIÓN GÉNICA POSITIVA	105
4.3.	IDENTIDAD GENÉTICA DEL ADN-Hp PRESENTE EN EL ( <i>Allium fistulosum</i> L.) Y EL CONTROL DE REFERENCIA	105
4.4.	COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL ADN-Hp OBTENIDO EN LAS PARCELAS EN BASE AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
4.5.	FACTORES DE RIESGO QUE POSIBILITAN LA CONTAMINACIÓN CON <i>Helicobacter pylori</i>	110
4.5.1.	ASOCIACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> CON LA PRESENCIA DE ESTABLECIMIENTOS DE CRIANZA DE ANIMALES	110
4.5.2.	ASOCIACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> EN LAS PARCELAS Y EL ESTABLECIMIENTO DE	

ASENTAMIENTOS HUMANOS COLINDANTES	113
4.5.3. ASOCIACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> CON LAS AGUAS DE USO AGRÍCOLA	115
4.5.4. ASOCIACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> CON LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS IN SITU	116
V. CONCLUSIONES	121
VI. RECOMENDACIONES	124
VII. BIBLIOGRAFÍA	126

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	TITULO	PÁGINA
1	REQUERIMIENTO DE CULTIVO DE LA CEBOLLA CHINA ( <u>Allium fistulosum</u> L.)	37
2	PRODUCCIÓN NACIONAL DE CEBOLLA ( <u>Allium</u> <u>cepa</u> )	38
3	TABLA PERUANA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS	41
4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS EN LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	62
5	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 1	80

6	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 2	81
7	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 3	82
8	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 4	83
9	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 5	84
10	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 6	85
11	FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON CEBOLLA CHINA PARCELA N° 7	86
12	FICHA DE CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO EN ESTUDIO.	90

13	DATOS DEL MUESTREO	91
14	IDENTIFICACIÓN ADN-Hp EN EL PUNTO DE INGRESO Y SALIDA DEL CANAL DE RIEGO A LAS PARCELAS.	103
15	FRECUENCIA DEL ADN-Hp DETECTADO.	112
16	FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON <i>Helicobacter pylori</i> .	118



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	TITULO	PÁGINA
1	<u>Allium fistulosum</u> L.	29
2	CENTRO DE ORIGEN DE PLANTAS CULTIVADAS	31
3	FLORACIÓN DEL <u>Allium fistulosum</u> L.	33
4	MICROBIOLOGÍA DEL <i>Helicobacter pylori</i> .	45
5	MECANISMO DE VIRULENCIA DEL <i>Helicobacter</i> <i>pylori</i> .	46
6	EPIDEMIOLOGIA DEL <i>Helicobacter pylori</i> .	48
7	PRESENTACIONES CLÍNICAS RELACIONADAS CON <i>Helicobacter pylori</i> .	52

8	TRANSTORNO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE LA MUCOSA GÁSTRICA.	53
9	FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ULCERACIÓN.	55
10	RELACIÓN DEL <i>Helicobacter pylori</i> CON PATOLOGÍA GASTRODUODENAL.	58
11	CARCINOGENÉISIS GÁSTRICA	60
12	CÁNCER GÁSTRICO, ENFERMEDAD MULTIFACTORIAL.	61
13	ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	67
14	EXTENSION DE LA CADENA DE POLIMERIZACIÓN.	68

15	ESQUEMA DE LA AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL.	69
16	DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.	75
17	CRITERIO DE SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN CADA PARCELA.	76
18	DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROTOCOLO MOLECULAR DE PURIFICACIÓN Y GÉNICA.	96
19	ESQUEMA DE AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA POR PCR.	101
20	VISUALIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL <i>Helicobacter pylori</i> POST PCR.	109

**ABREVIATURAS**

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADN-Hp	ácido desoxirribonucleico del <i>Helicobacter pylori</i> .
bp	pares de base.
CEPIS	Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencia
del	Ambiente.
CT	coliformes totales.
CF	coliformes fecales.
dATP	desoxiadenina trifosfato.
dCTP	desoxicitosina trifosfato.
dGTP	desoxiguanina trifosfato.
dTTP	desoxitimina trifosfato.
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra acético.

ICR	Ingreso del canal de riego.
NMP	número más probable.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PK	proteínasa K.
rpm	revoluciones por minuto.
SCR	Salida del canal de riego
SDS	duodecil sulfato de sodio.
TNE	Buffer Tris-CINa-EDTA.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en Cebolla China (Allium fistulosum L.) regada con aguas servidas, para lo cual se empleó un método de diagnóstico molecular como lo es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) , con una sensibilidad del 99.9 por ciento en los resultados.

En una etapa previa se delimitó la zona de estudio, ubicada en el ex fundo San Agustín, situada en la vereda posterior del aeropuerto Jorge Chávez en la Provincia Constitucional del Callao, en cuyas tierras han dado en las últimas décadas una serie de desarrollos agrícolas y pecuarios, utilizando aguas servidas para dicho fin.

En tal sentido se analizaron muestras de cebolla china (Allium fistulosum) y luego de una digestión, extracción y purificación del ADN del *Helicobacter pylori* presente en la superficie de las células

exfoliadas de la cebolla china, se procedió a su amplificación enzimática, observándose un amplicón de 349 pares de bases equivalente al control positivo de *Helicobacter pylori*, bacteria de interés por ser la causante de gastritis superficial crónica la cual se detectó en el 64.29 por ciento de las muestras.

Los resultados también indican que dicha contaminación por *Helicobacter pylori* en las parcelas con cultivos de cebolla china listas para el consumo humano, están asociados a inadecuadas prácticas agrícolas y a vertimientos de residuos sólidos y líquidos, procedentes de avícolas, establos y de asentamientos humanos dispersos.

## I. INTRODUCCIÓN

Nuestra gastronomía peruana demanda grandes cantidades de vegetales en su mayoría para su consumo en crudo o saltado, siendo la cebolla china (*Allium fistulosum*) uno de los vegetales que se utilizan como condimento en la preparación de sopas, tortillas, salsas y destinado principalmente al consumo en crudo en ensaladas, ajíes molidos y cocina oriental.

Sin embargo el uso de aguas de dudosa calidad para el riego entre ellas las aguas servidas, sin ningún tipo de tratamiento previo, vienen siendo utilizadas actualmente en el riego de cultivos de productos hortícolas que suelen consumirse crudos; constituyendo una fuente de transmisión de enfermedades entéricas asociadas a una serie de bacterias.

De igual modo se suma una nueva bacteria para el ámbito de la industria de los alimentos pero muy estudiada por el campo de la medicina debido a estar asociada con la aparición de la gastritis



superficial crónica, que en el peor de los casos podría desembocar coadyuvado con otros factores en un adenocarcinoma de estómago.

La bacteria denominada *Helicobacter pylori* se asocia a los cultivos de vegetales con sistema de riego superficial mediante surcos con aguas servidas como así lo demostró la presente investigación en cultivos de Cebolla China (Allium fistulosum L.) en el ex fundo San Agustín en la Provincia Constitucional de Callao; brindando un importante aporte a la comunidad científica.

En la costa peruana existen 4 300 ha agrícolas regadas con aguas servidas, 86% de ellas sin ningún tratamiento. Así mismo en el Perú la cobertura de tratamiento de aguas servidas sólo llega al 17.6% de las aguas residuales generadas, contaminándose por consecuencia ríos, valles y el océano.

La aplicación oportuna de medidas fitosanitarias a nivel post cosecha, así como una desinfección adecuada de materiales y equipos coadyuvado con una importante campaña de educación

higiénica será la única forma de poder conseguir alimentos que no constituyan un riesgo para la salud de la población, hasta que las Naciones del Mundo logren solucionar sus problemas de crisis económica que han limitado las inversiones y la importancia en el tratamiento y reuso de las aguas servidas y puedan esperemos en un futuro no muy lejano expendirse en los mercados de abasto alimentos seguros, previa certificación de calidad por lote.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- Determinar la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* en cebolla china (Allium fistulosum L.) procedente de la zona de cultivo del ex fundo San Agustín del Callao, y regada con aguas servidas.
- Analizar molecularmente la presencia del segmento génico Cag A del ADN del *Helicobacter pylori*, en las muestras de cebolla china.
- Relacionar los factores de riesgo asociados a las parcelas en cuestión con la presencia de *Helicobacter pylori*.

## II. REVISIÓN LITERARIA

### 2.1. GENERALIDADES SOBRE LA CEBOLLA CHINA (Allium fistulosum L.)

#### 2.1.1 ORIGEN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEBOLLA CHINA:

El género Allium al que pertenece la cebolla china (Allium fistulosum L.) se clasifica de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliophyta
Clase:	Monocotiledóneas.
Subclase:	Lilidae
Orden:	Liliaes
Familia:	Liliáceas
Género:	<u>Allium</u>
Especie:	<u>Allium fistulosum</u> L.

(Citado en [http://plants.usda.gov/cgi\\_bin/plant\\_profile.cgi%3fsymbol](http://plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi%3fsymbol))

FIGURA N° 1



(Allium fistulosum L.)

Históricamente, esta especie fue el principal producto de las liliáceas en China y Japón, la figura N° 2 ubica su origen y su cultivo por más de 2000 años; siendo en la actualidad un cultivo relevante en países de Asia.

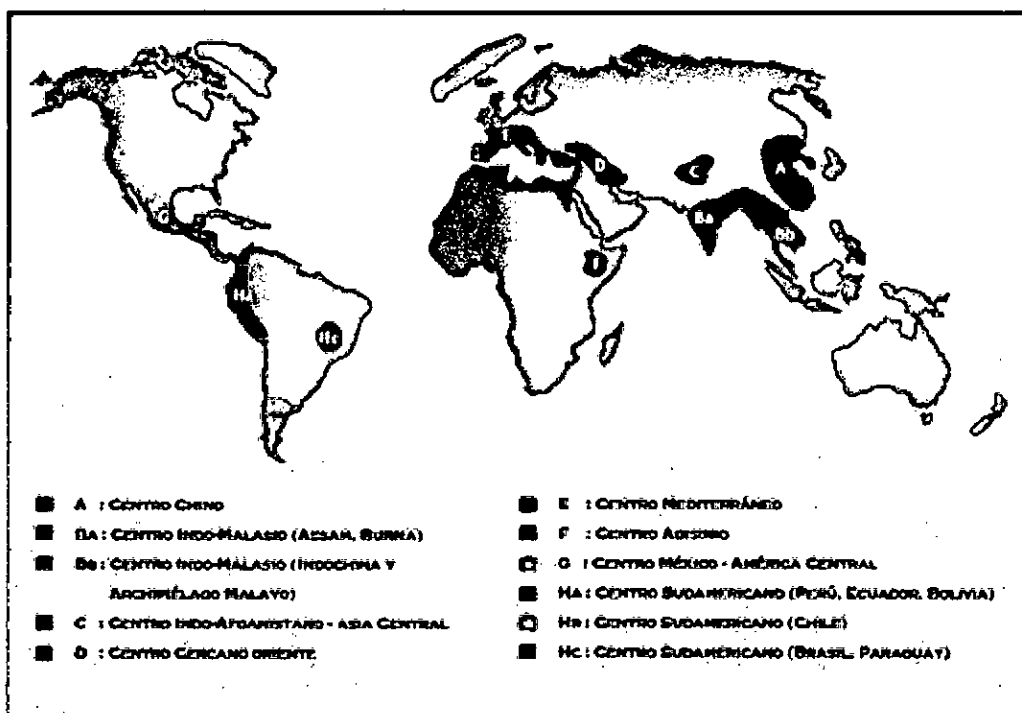
(Citado en [http://www.uc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p028.html](http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p028.html))

La cebolla china (*Allium fistulosum* L.), es originaria de Liberia. En la Edad Media era totalmente desconocida en Europa mientras que los chinos la cultivaban desde hacía más de 2 000 años. Fue introducida en Europa desde Rusia en el siglo XVI.

(Citado en [http://www.losdeconstructores.com/zona\\_verde/lista\\_plantas\\_aromaticas](http://www.losdeconstructores.com/zona_verde/lista_plantas_aromaticas)).

Stein, 1943, citado por Jones (1963), afirmó que la cebolla común al igual que la cebolla china (*Allium fistulosum* L.) ha sido la principal especie de cebolla del Suroeste de Asia y Europa. El nombre de "Welsh onion" como se le conoce en Europa se originó cuando el *Allium fistulosum* se introdujo en tierras germanas.

FIGURA N° 2: CENTRO DE ORIGEN DE PLANTAS CULTIVADAS



A. CENTRO CHINO: Poroto Soya (*Glycine max*) Rábano (*Raphanus sativus*) Nabo (*Brassica campestris*) Pak-Choi (*Brassica rapa* var. *chinensis*) Repollo Chino (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) Cebollín (*Allium fistulosum*) Rakkyo (*Allium chinense*) Pepino (*Cucumis sativus*) Yam (*Dioscorea batatas*).

B. CENTRO INDO-AFGANISTANO – ASIA CENTRAL Arveja (*Pisum sativum*) Haba (*Vicia faba*) Poroto mung (*Phaseolus aureus*) Mostaza (*Brassica juncea*) Cebolla (*Allium cepa*) Ajo (*Allium sativum*) Espinaca (*Spinacia oleracea*) Zanahoria (*Daucus carota*).

Fuente: <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota63-3.htm>

### 2.1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Brewster, J. (1994), describe que las características botánicas de esta especie ( $2n=16$  cromosomas) son parecidas a las de la cebolla común. La diferencia más clara es el hecho que, como su nombre específico *fistulosum* (fístula o tubo) lo indica, esta especie desarrolla 2 a 6 brotes o ramificaciones de tamaño parecido y que se cosechan al estado verde y constituyen el órgano de consumo de la especie. La altura de las plantas y del escapo floral son menores que las de cebolla. La figura N° 3 muestra las flores, de color amarillo-blanquecinas las que, mediante polinización entomófila, generan semillas de forma piramidal irregular, de color negro, muy parecidas a las de cebolla.

Jones, H. (1963), mencionó que el nombre *fistulosum* describe apropiadamente las hojas ahuecadas tubulares y firmes asimismo los bulbos son pequeños, finos y ligeramente alargados. La forma casi circular de las hojas en corte transversal es probablemente la forma más común de diferenciarla de otras especies.

FIGURA N° 3



Floración de la cebolla china (Allium fistulosum L.)



### 2.1.2.1. REQUERIMIENTO DE CULTIVO

El cuadro N° 1 indica los requerimientos de cultivo para la cebolla china (Allium fistulosum L.) detallándose a continuación:

#### A) Ciclo del cultivo:

Desarrollo de la plantación: 7 meses aprox.

Inicio de la cosecha: 7 meses.

#### B) Manejo del cultivo:

##### B.1. Sistema de propagación por semillero y transplante.-

Se prepara previamente el semillero mezclando 4 partes de tierra negra con 2 partes de abono orgánico bien descompuesto y pulverizado y una parte de arena, con esta mezcla se preparan platabandas de 15 cm de alto por 120 de ancho y el largo adecuado, para una Ha se necesitan aproximadamente 2 kg de semilla y una superficie de 700 a 1000 m<sup>2</sup> de semillero (30 platabandas de 20 m de largo por 1.2 m de ancho y 20 cm de alto. Luego es necesario hacer la desinfección del semillero para destruir hongos, insectos y nematodos para lo cual se puede utilizar Basamid (30-40 g de producto granulado por m<sup>2</sup>) introduciéndolo a 20 cm de profundidad,

se tapa el semillero con plástico y se retira éste a los 20 días, se remueve el suelo y 3 días después se procede a la siembra. La siembra se puede realizar al voleo (distribuir las semillas manualmente) o en líneas (se distribuye la semilla en pequeños surcos trazados previamente), aunque este segundo es más aconsejable.

El semillero debe ser regado, limpiado y se efectúa un control de plagas y enfermedades.

Una vez que las plantas del semillero alcancen 12 – 15 cm de altura (luego de 45 días de la siembra) se está en condiciones de realizar el trasplante al suelo definitivo donde se desarrollarán las plantas, este suelo debe estar húmedo, abonado y fertilizado.

#### B.2. Sistema de propagación por división de plantas.-

Cada uno de los tallos hinchados en la base puede ser rápidamente origen a una nueva planta mediante el enraizamiento directo en el sitio definitivo. Este sistema consiste en arrancar con precaución las plantas de cebolleta maduras (1 a 2 años) utilizando el azadón, después son divididos en dos o tres fragmentos o ramilletes que comparten 1 ó 2 pequeños brotes, mediante la separación o

seccionamiento hecho con la mano. Muchas veces cada uno de los tallos hinchados puede dar nacimiento a una planta, luego de esto se arreglan las plantas, de acuerdo con este sistema, se utilizan 7 brotes por cada metro de arriete, o 60 brotes por m<sup>2</sup> de cultivos en platabandas.

La plantación se hace con el transplante cada 15 cm entre hileras y 8 cm en la hilera, se riega copiosamente para que la tierra y las raíces se compacten. Sin embargo este método origina plantas propensas al engrane o producción de semillas, en cuyo caso son inutilizables, por lo que solo se aplica a variedades estériles de cebolleta.

(Citado en: [http://www.proexant.org.ec/HT\\_Cebolleta.html](http://www.proexant.org.ec/HT_Cebolleta.html)).

CUADRO N° 1: REQUERIMIENTO DE CULTIVO DE LA CEBOLLA

CHINA

(Allium fistulosum L.)

<b>Agroecológicos:</b>	
<b>Clima:</b>	Templado y fresco, aunque admite clima cálido
<b>Temperatura:</b>	5-22°C
<b>Humedad:</b>	Se debe evitar que el agua se encharque
<b>Altitud:</b>	Más de 500 m.s.n.m.
<b>Vientos:</b>	Evitar presencia de vientos
<b>Acidez:</b>	6.0-6.8
<b>Formación Ecológica:</b>	Bosque interandino
<b>Requerimientos Edáficos:</b>	
<b>Textura:</b>	Franca, franco-arenosa, arcillo-arenosa
<b>Tipo de suelo:</b>	Arenosos, fértiles, frescos y gumíferos, los suelos arcillosos dispuestos en arriates o bancales sobreelevados no excesivamente compactos, pueden dar buenas producciones.

Fuente: [http://www.proexant.org.ec/HT\\_Cebolleta.html](http://www.proexant.org.ec/HT_Cebolleta.html)

### 2.1.3. PRODUCCIÓN NACIONAL

CUADRO N°2: PRODUCCIÓN NACIONAL DE CEBOLLA (*Allium cepa*)

PRODUCCIÓN NACIONAL DE CEBOLLA ( <i>Allium cepa</i> )				
AÑO	PRODUCCIÓN NACIONAL (T.M.)	SUPERFICIE COSECHADA (Ha)	RENDIMIENTO (T.M./Ha)	PRECIO PROMEDIO CHACRA (S./Kg)
1990	151 050	7460	20 248	20,760 (l./Kg)
1991	131 648	5833	22 570	0.17
1992	149 732	6405	23 377	0.24
1993	150 820	6601	22 848	0.33
1994	187 108	8309	22 519	0.28
1995	184 727	8445	21 874	0.49
1996	236 116	10 523	22 438	0.31
1997	287 656	13 950	20 621	0.57
1998	315 622	14 317	22 025	0.52
1999	366 140	14 369	25 481	0.29
2000	379 742	16 014	23 710	0.50

Fuente: OFICINA DE INFORMACIÓN AGRARIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA.

#### 2.1.4. UTILIZACIÓN DE LA CEBOLLA CHINA (Allium fistulosum L.)

Las hojas de la cebolla china (Allium fistulosum L.) forman las “finas hierbas” que entran como condimento en la preparación de platos muy variados y sirven para sazonar los quesos blancos y preparar sopas, tortillas y salsas.

(PRINT, F. 1980).

Igualmente la cebolla china (Allium fistulosum L.) en el Perú, se destina principalmente al consumo en crudo, en ensalada, ajíes molidos, y sopas, de ahí la importancia de la presente investigación.

Actualmente la producción de cebolla china continúa creciendo lo cual hace aún más competitivo la comercialización de este producto en mercados asiáticos para países como Holanda y Nueva Zelanda.

(Citado en [www.ecuadorexporta.org/productos\\_down/pdf](http://www.ecuadorexporta.org/productos_down/pdf))

## 2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

### 2.2.1. CONTENIDO DE ELEMENTOS NUTRITIVOS

La cebolla china (Allium fistulosum L.) es rica en beta-carotenos (pro vitamina A) en potasio y en B<sub>9</sub> y reconocida por sus virtudes antioxidantes. La decocción del bulbo machacado es ocitócico para tratar males estomacales.

(AGAPITO, T. Y SUNG, I., S/F)

La cebolla china se desarrolla bastante bien en condiciones donde la temperatura ambiental es cálida, lo que permite conformar plantas bien estructuradas y que posee varias características importantes destacando entre estas el contenido de calcio, 141 mg, ácido ascórbico reducido 10.5 mg, fósforo 61 mg. (véase Cuadro N°3 página 41).

CUADRO N°3: TABLA PERUANA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Alimento	Composición por 100 gramos de Porción Comestible														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	15	16	17
Cebolla	Energía	Agua	Proteínas	Grasa	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Calcio	Fósforo	Hierro	Retinol	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Ácido Ascórbico Reducido
	Kcal	g	g	g	g	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
china	39	88.7	2.3	0.4	7.5	1.3	1.1	141	61	1.1	0	0.02	0.01	0.4	10.5

FUENTE: COLLAZOS, CH. C. et al. (1996)



### 2.3. *Helicobacter pylori*.

#### 2.3.1. MICROBIOLOGÍA DEL AGENTE:

Hasta fines del siglo XX los científicos consideraron al estómago como un ambiente hostil para el crecimiento bacteriano. Por primera vez en 1975, la gastritis se asoció con la presencia en la mucosa gástrica, de una bacteria gramnegativa. El 1983 *B.J. Marshall* y *J.R. Warren* cultivaron de la mucosa gástrica humana un microorganismo gramnegativo, microaerofílico y de forma espiralada (véase Figura N° 4 página 45). Se estudió su asociación con la inflamación del aparato gastrointestinal. El microorganismo cultivado fue previamente incluido en el género *Campylobacter*, con el nombre de *Campylobacter pylori*, pero más tarde se insertó en el nuevo género *Helicobacter*. Después de este resultado se produjo su aislamiento, caracterización y cultivo.

(Citado en [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15\\_1\\_01/ali07101.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15_1_01/ali07101.htm))

La figura N°5 muestra el mecanismo de virulencia en la cual el *Helicobacter pylori* tiene la capacidad de segregar diversas enzimas dentro de las cuales se cuenta, la ureasa que le permitiría el

desdoblamiento de la urea en dióxido de carbono y amonio. Este último volvería mucho más alcalino el medio gástrico haciéndolo propicio para el desarrollo del agente en cuestión.

(Citado en <http://www.argenet.com.ar/~hernan/docs/patologa.html>)

### 2.3.2. EPIDEMIOLOGIA DEL *Helicobacter pylori*.

El *Helicobacter pylori* sería el responsable de la mayoría de las úlceras pépticas. Se calcula que la mitad de la población posee esta bacteria en su organismo.


No está totalmente aclarado cómo se transmite este germen, pero se piensa que es por el agua o alimentos. Ha sido encontrado en la saliva de algunas personas, por lo que es posible su contagio a través del beso. El contacto estrecho con un infectado por *Helicobacter pylori* y la exposición a su vómito con otras formas de contagio. Es conveniente lavarse las manos siempre después de ir al baño y antes de comer.

(Citado en <http://www.roemmers.com.ar/infovida/gastritis.asp#aguda>)

En la epidemiología del *Helicobacter pylori* existen dos patrones claramente diferenciados. Uno que se presenta en los países

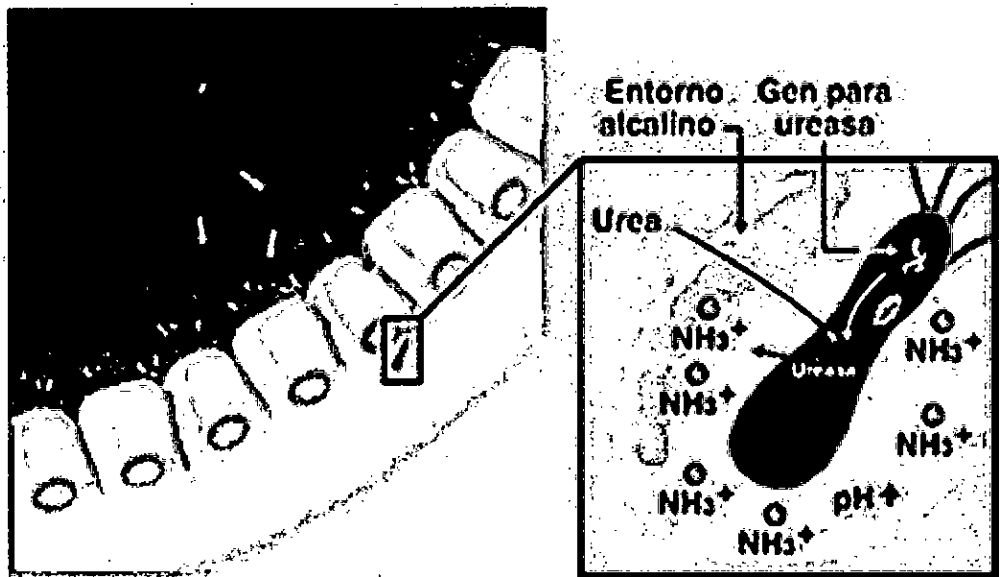
subdesarrollados que se caracteriza por una elevada prevalencia junto con una rápida adquisición en la infancia y otro patrón característico de los países desarrollados (véase Figura N° 6 página 48). En que la prevalencia es media y la infección se adquiere más tardíamente en la vida.

FIGURA N° 4: MICROBIOLOGÍA DEL *Helicobacter pylori*

<p><b>MICROBIOLOGÍA:</b></p> <p>Bacilo curvo, Gram (-), microaerófilo</p> <p>Ureasa (-)</p> <p>Reservorio: mucosa gástrica antral</p>          <p><b>EPIDEMIOLOGIA:</b></p> <p>Distribución mundial</p> <p>Transmisión por vía oral</p> <p>Contacto persona a persona</p> <p>Relación inversa con nivel socio-económico</p>	
---	---

FUENTE: <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2009/02/21/113252>

FIGURA N° 5: MECANISMO DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori*.



FUENTE: <http://www.iladiba.com.co/upr/1997No41997/htm/Helic.asp>

En el primero parece predominar la transmisión oral-fecal y en el segundo el mecanismo fundamental parece ser el oral-oral.

([http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas\\_de\\_gastroenterologia.htm](http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas_de_gastroenterologia.htm))

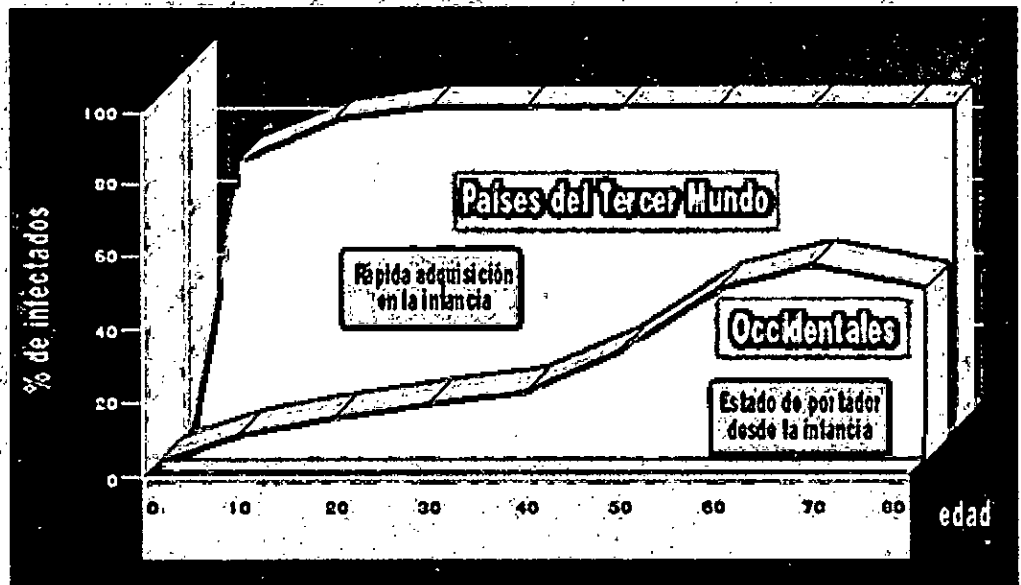
### 2.3.3. EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*.

#### 2.3.3.1. GASTRITIS

La gastritis que se origina después de la infección por *Helicobacter pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda causada por la bacteria es un diagnóstico poco frecuente y cuando se ha descrito ha sido tras ingestión accidental o en voluntarios. Su curso es de 7 a 10 días y puede evolucionar a la eliminación espontánea del microorganismo o, más frecuentemente, a su cronicidad.

(Citado en <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap17.htm>)

FIGURA N° 6: EPIDEMIOLOGÍA DEL H. PYLORI



FUENTE: [http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas\\_de\\_gastroenterologia](http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas_de_gastroenterologia)

.htm

### 2.3.3.2. ROL DEL *Helicobacter pylori* EN LA GASTRITIS CRÓNICA

En este aspecto algunos autores consideran la existencia de dos formas de gastritis crónicas:

- 1) Tipo A: que se localizaría fundamentalmente a nivel del cuerpo gástrico y suele acompañar a la anemia perniciosa. Esta respondería en su génesis a mecanismos autoinmunes.
- 2) Tipo B: de localización antral (antritis), que suele asociarse a úlcera duodenal y presentaría una fuerte asociación con la infección con *Helicobacter pylori* (véase Figura N° 7 página 52).

La figura N° 8 indica el trastorno de los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, donde el fenómeno inflamatorio crónico se explicaría si consideramos al *Helicobacter pylori* como responsable, ya que el sistema inmunológico que actuaría normalmente erradicando el germen patógeno en cualquier proceso infeccioso es totalmente incompetente en este caso para eliminar el microorganismo y se convierte en un proceso inflamatorio crónico, teniéndose escasa evidencia de que en algún caso mejore espontáneamente.



Con el correr del tiempo este proceso evolucionaría, hacia una atrofia de la mucosa gástrica (no en la misma magnitud en todos los casos) lo que implicaría la pérdida de glándulas normales, seguida de la alteración en la secreción gástrica de ácido, pepsinógeno y factor intrínseco.

(Citado en <http://www.argenet.com.ar/~hernan/docs/patologa.html>)

Las enzimas de adaptación de *Helicobacter pylori* trastornan los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica. La ureasa proporciona un entorno alcalino apropiado para que el germen pueda crecer y reproducirse, mientras que otras enzimas (mucinasasa, lipasa y fosfolipasa) ejercen un efecto quimiotáctico que mantiene una respuesta inflamatoria persistente.

(Citado en <http://www.iladiba.com.co/upr/1997/No41997/hm/Helic.asp>)

#### 2.3.3.3. *Helicobacter pylori* y la enfermedad ulceropéptica

En el origen de la úlcera duodenal es muy importante la ya mencionada interferencia de *H. pylori* con los mecanismos que controlan la producción de ácido clorhídrico. Los pacientes infectados

por el microorganismo sufren marcada hiperproducción de gastrina, ya que el amonio generado por la bacteria interfiere con la señal acida que, en condiciones normales, sirve como mensaje de retroalimentación negativa sobre las células G del antro, creando un falso ambiente de alcalinidad. Así, aumenta la liberación de gastrina y es mayor el estímulo sobre las células parietales, de manera que éstas liberan altas cantidades de ácido clorhídrico (véase Figura N° 8 página 53).

FIGURA N° 7

## Presentaciones clínicas relacionadas con *H. pylori*

- **Gastritis** →  
*H. pylori* está presente en el 90% de las gastritis

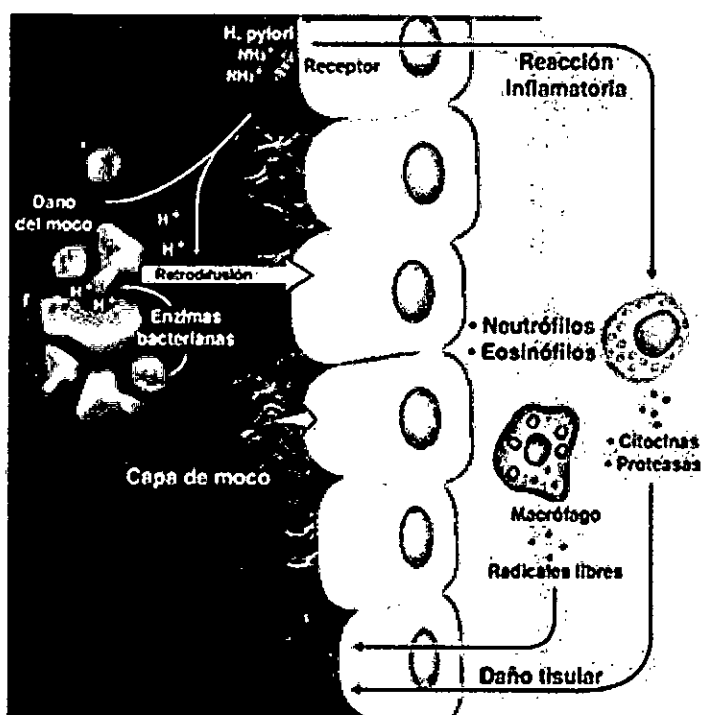


- **Úlcera duodenal y gástrica** →  
*H. pylori* está presente en el 95% de los pacientes con úlcera duodenal y en el 50-70%% de pacientes con úlcera gástrica.



FUENTE: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf)

FIGURA N° 8: TRANSTORNO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA  
DE LA MUCOSA GÁSTRICA



FUENTE: <http://www.iladiba.com.co/upr/1997/No41997/htm/Helic.asp>

La colonización de *Helicobacter pylori* conduce a gastritis y ulceración.

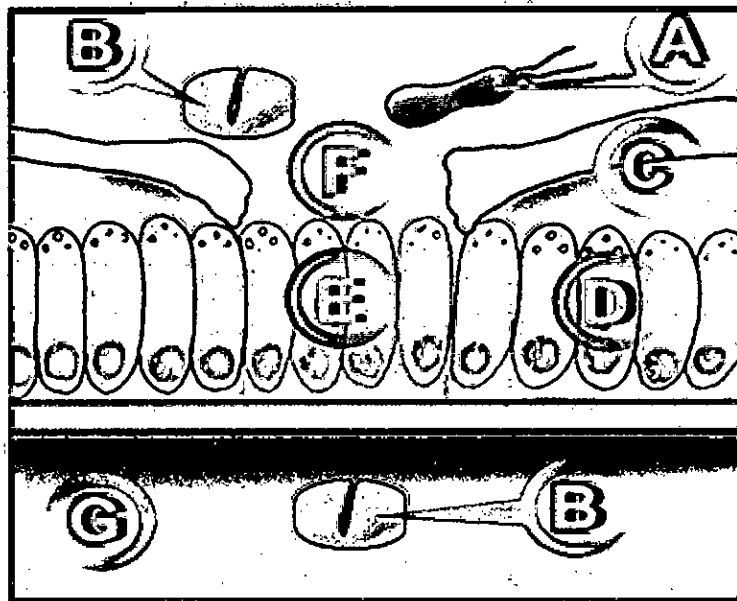
Aunque se requiere la presencia de otros factores, la bacteria es el principal agente etiológico de la úlcera duodenal al alterar los mecanismos que controlan la producción de ácido clorhídrico.

(Citado en <http://www.iladiba.com.co/upr/1997/No41997/htm/Helic.asp>)

La figura N° 10 detalla la relación del *Helicobacter pylori* con patología Gastroduodenal en la que raramente se encuentra una mucosa gástrica normal en pacientes con infección asociada por *Helicobacter pylori* lo que sucede a lo sumo en el 4% de los casos. lo más habitual es que presenten una gastritis crónica activa asintomática. La prevalencia en úlcera duodenal es muy elevada del orden del 95% de los casos y en la úlcera gástrica alrededor del 70%. En la dispepsia funcional no ulcerosa, la prevalencia de infección por *Helicobacter* es similar a la de la producción general y se sitúa alrededor del 50% de los casos.

(Citado en: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf) )

FIGURA N° 9: FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA  
ULCERACIÓN.



- (A) La infección por la bacteria *Helicobacter pylori*.
- (B) Los medicamentos antiinflamatorios.
- (C) Recubrimientos exteriores de protección.
- (D) Fenómeno de cohesión intercelular.
- (E) Lesiones en la mucosa.
- (F) Úlcera duodenal.
- (G) Inhibición de síntesis de prostglandinas.

FUENTE: [http://www.tuotromedico.com/temas/ulcera\\_gastroduodenal.htm#0](http://www.tuotromedico.com/temas/ulcera_gastroduodenal.htm#0)

La etiología de la úlcera duodenal está íntimamente relacionada con la infección crónica por *Helicobacter pylori*, adquirida tempranamente en la vida, lo que ocurre en el 95% de los casos aproximadamente. El mecanismo condicionante es a través de una inflamación crónica gastroduodenal, con gastritis crónica activa, duodenitis congestiva y erosivas frecuentemente asociadas e hipergastrinemia asociada, todo lo cual favorece la reactivación del proceso ulceroso, bien de forma espontánea o agravada por factores exógenos. Todo ello lleva a la conclusión de que el *Helicobacter pylori* es el principal agente responsable de la aparición y mantenimiento de la úlcera duodenal, que debe ser considerada fundamentalmente como una enfermedad infecciosa (véase Figura N° 7 página 52).

Los carcinógenos se clasifican en 5 categorías según la Organización Mundial (OMS). Después de una exhaustiva revisión de la documentación publicada, expertos de la OMS concluyeron que el *Helicobacter pylori* debe ser clasificado como carcinógeno 1, o demostrado, en su relación causal con el cáncer gástrico. Como el *Helicobacter pylori* no es el único agente responsable de la aparición del cáncer gástrico (véase Figura N° 12 página 61). Los expertos llegaron a la conclusión de que "este germen juega un papel causal en

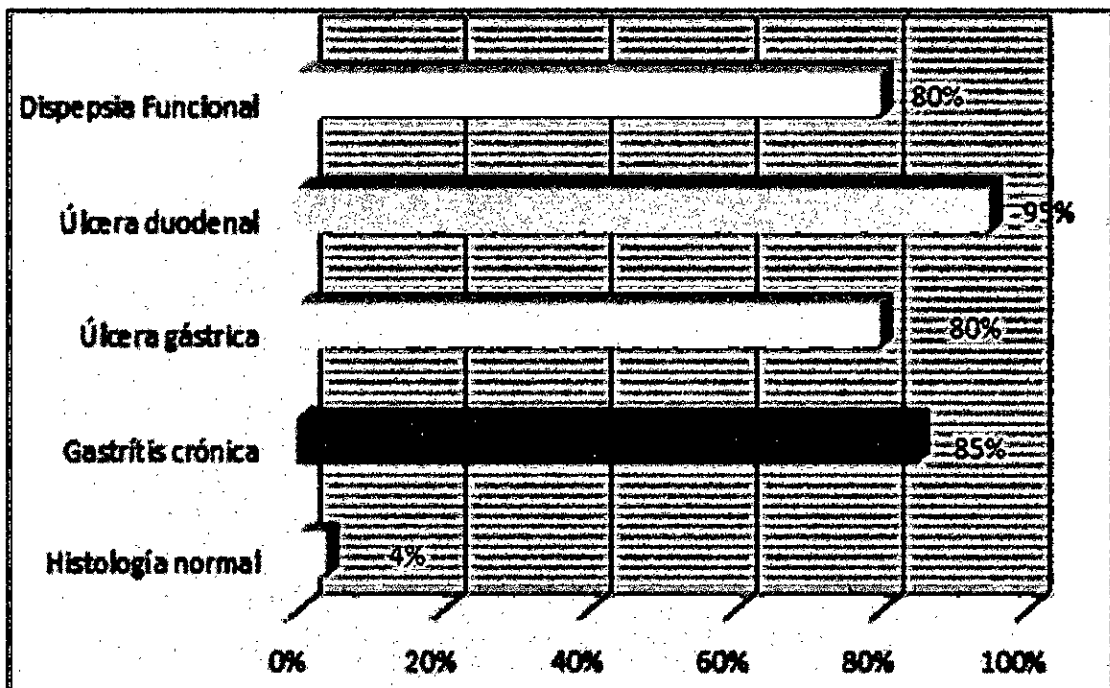
la cadena de acontecimientos que conducen a la aparición y desarrollo del cáncer gástrico”.

([http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas\\_de\\_gastroenterologia.htm](http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas_de_gastroenterologia.htm))



FIGURA N° 10

RELACIÓN DEL *Helicobacter pylori* CON PATOLOGÍA  
GASTRODUODENAL.



FUENTE: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf)

#### 2.3.3.4. *Helicobacter pylori* Y CÁNCER GÁSTRICO

Desde el punto de vista histopatológico el carcinoma gástrico puede clasificarse en dos tipos:

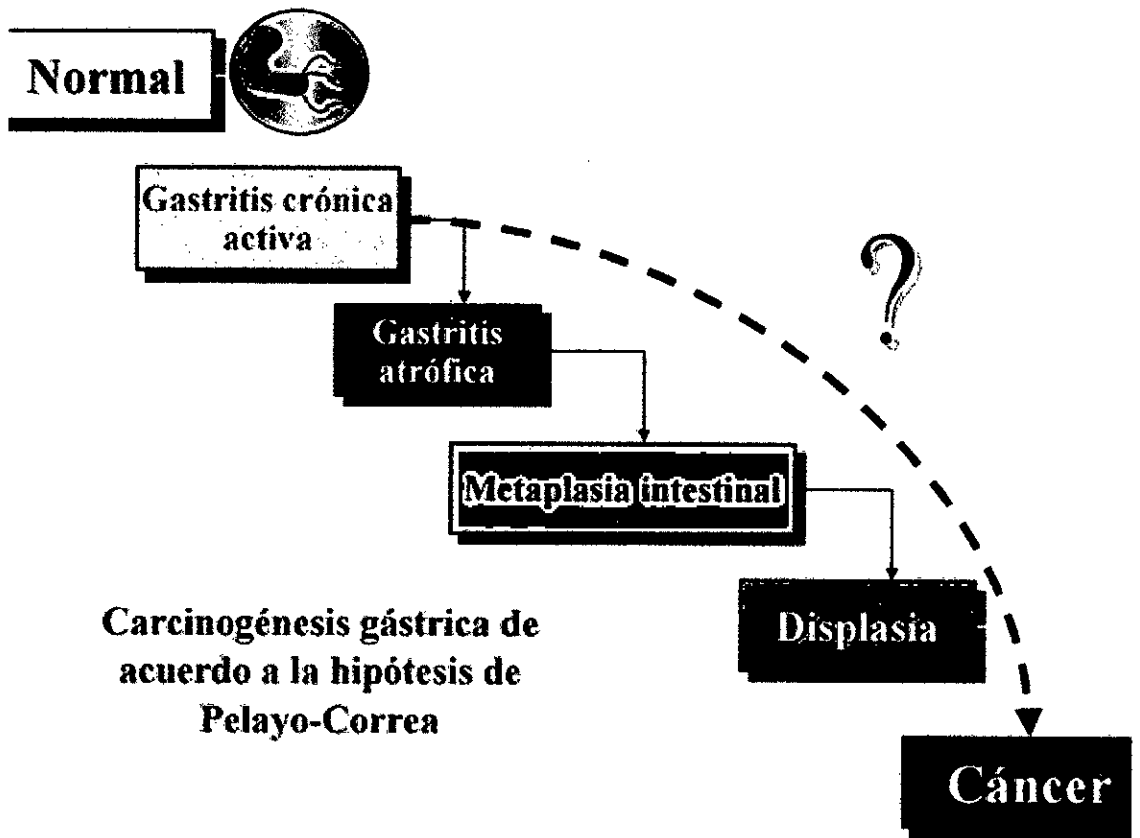
1) El intestinal cuya etiopatogenia está relacionada con *Helicobacter pylori*.

2) El difuso (menos frecuente) cuya etiopatogenia es desconocida.

La infección con *Helicobacter pylori* resulta ser un determinante en la aparición de gastritis crónica que evoluciona hacia la atrofia y eventualmente hacia la metaplasia intestinal y si consideramos a esta como lesión preneoplásica (sobre la que podrían acentuar distintos grados de neoplasias) podríamos asumir que la presencia del microorganismo estaría más o menos relacionada con la mayor probabilidad de desarrollar una neoplasia gástrica de tipo intestinal.

(Citado en <http://www.argenet.com.ar/~hernan/docs/patologa.html>)

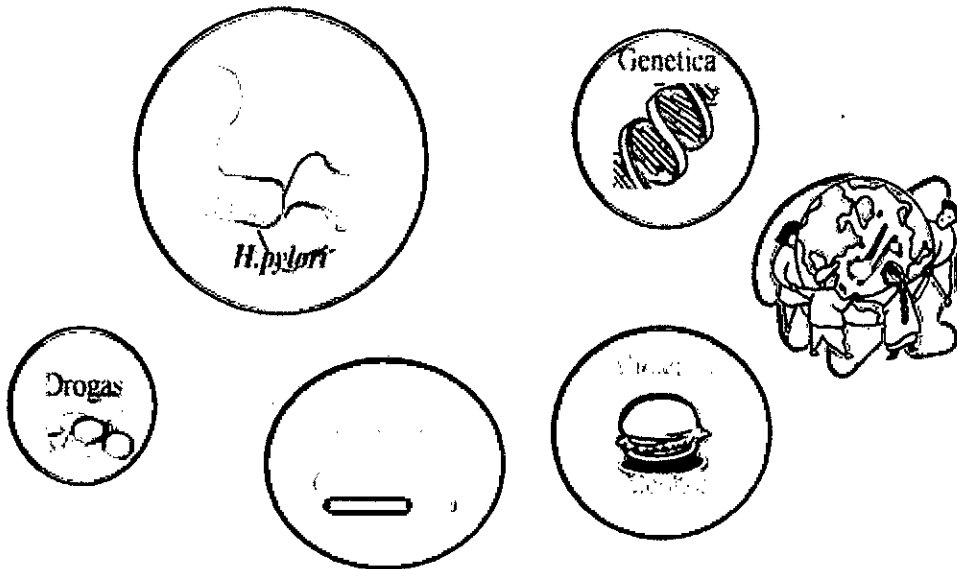
FIGURA N° 11



FUENTE: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf)

FIGURA N° 12

## El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial




FUENTE: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf)

2.3.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS EN LA  
INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*.

CUADRO N° 4

Principales métodos de diagnóstico utilizados  
en la infección por *H. pylori*

	<i>Invasivos</i> ( <i>biopsia gástrica</i> ) 	<i>No invasivos</i>
<i>Directos</i>	Cultivo Histología Técnicas moleculares: detección del DNA	Antígenos en heces Técnicas moleculares: detección del DNA
<i>Indirectos</i>	Prueba rápida de ureasa	Prueba del aliento Detección de anticuerpos

FUENTE: [http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias\\_pdf](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-2004/conferencias_pdf)

## 2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 2.4.1. DEFINICIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una metodología desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con la que se puede producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre lo indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

(Citado en [http://www.biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak\\_biotec](http://www.biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak_biotec))

El ADN puede proceder de una muestra de tejido, de una gota de sangre o semen en la escena de un delito, o de un cerebro momificado.

(Citado en <http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigpcr.html>)

## 2.4.2. ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR es un proceso que consta de tres pasos que forman un ciclo, el que se repite en un número determinado de veces. Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos:

### 2.4.2.1. Desnaturalización por calor:

La Figura N° 13 detalla la desnaturalización por calor (usualmente mayor o igual a 90°C) separa la doble hebra de DNA en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desorribosa y los grupos fosfato permanecen intactos.

### 2.4.2.2. Alienación – Hibridación del Iniciador al Blanco.

Los iniciadores son secuencias sintéticas cortas de DNA de una sola hebra que consisten de 20-30 bases. Son específicos y delimitan la región del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos iniciadores en la reacción de la PCR, cada uno complementario de

una de las hebras de DNA que se separaron durante la desnaturalización.

Usualmente, este proceso se lleva a cabo entre 40 °C y 65 °C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los iniciadores. Esto permite la unión específica de ellos a su hebra complementaria.

#### 2.4.2.3. Extensión.

Una vez que los iniciadores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72°C y la enzima *Taq* DNA polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA (véase Figura N° 14 página 68). La *Taq* polimerasa comienza el proceso de extensión agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA. Al final del primer ciclo de la PCR, hay dos dobles hebras de DNA idénticas a la original, cada nueva hebra producida se denomina AMPLICÓN.

Este ciclo de tres pasos (desnaturalización, alineamiento y extensión) puede ahora repetirse muchas veces tal como lo representa la Figura N° 15. Conforme la PCR continúa, se crean primero dos, cuatro, ocho,...  $2^n$  copias ( $n$ =número de ciclos), obteniéndose después de 30

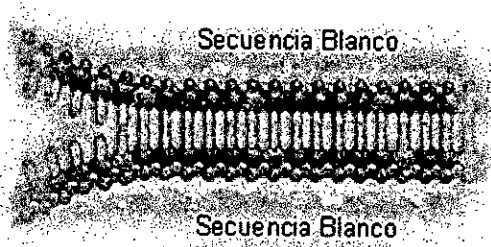


ciclos 1.073.741.824 copias. Este proceso de la PCR también es llamado **AMPLIFICACIÓN** debido a que la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objetivo de hacer millones de copias. Ahora ya hay suficiente material genético para detectar la presencia y la cantidad del patógeno.

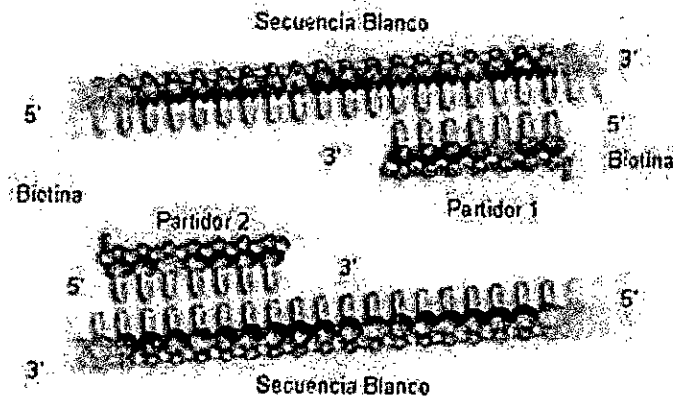
(Citado en <http://us.labsystems.roche.com/pcr/microwel.htm>)

FIGURA N° 13

ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



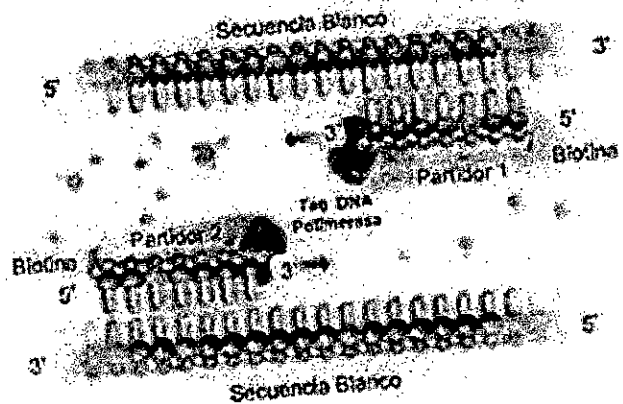
Desnaturalización por calor



Alineación – Unión del Partidor al Objetivo

FUENTE: <http://us.labsystems.roche.com/pcr/microwel.htm>

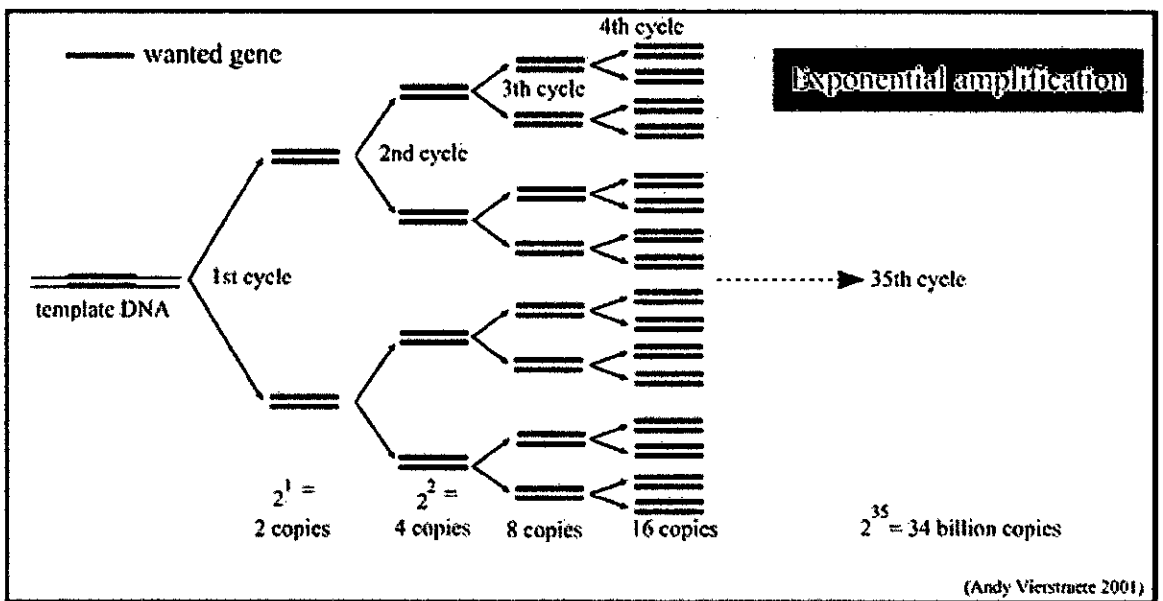
FIGURA N° 14



Extensión

FUENTE: <http://us.labsystems.roche.com/pcr/microwel.htm>

FIGURA N° 15 ESQUEMA DE A AMPLIFICACIÓN  
EXPONENCIAL



FUENTE: <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>

#### 2.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN ALIMENTOS

La Biología Molecular es una disciplina con personalidad propia, sus conceptos y tecnologías han contribuido notablemente al desarrollo de todas las restantes ramas de la biología moderna. Sin embargo en la industria de Alimentos en Perú ha sido algo lenta en la incorporación de las posibilidades que brinda la Biología Molecular, esto puede en parte explicarse por el grado de fragmentación o especialización que presenta en paralelo a la poca importancia e inversión que se le brinda en investigaciones científicas con respecto a esta área.

Sin embargo ante el inminente interés comercial a nivel mundial y del enfoque con u se abordan los estudios a nivel de seguridad alimentaria y salud pública se brinda el siguiente enfoque aplicativo.

-Desarrollo de métodos rápidos para la identificación y detección de bacterias patógenas y contaminantes de alimentos, basados en la utilización de técnicas moleculares y su adaptación al análisis rutinario de los alimentos frescos y procesados.

-Identificación de especies de interés comercial (túnicos, gádidos, vacunos, porcinos, etc...) en alimentos (conservas, platos precocinados, etc...) mediante el uso de marcadores genéticos

específicos de especie. De este modo se pueden caracterizar fraudes en la industria alimentaria.

(Citado en <http://www.azti.es/castellano/genético.asp>)

-Estudios de trazabilidad genética en alimentos.

-Diseño de nuevos alimentos para la presentación comercial, mediante la explotación de datos de la secuencia génica de microorganismos mediante el diseño y uso de micromatrices de DNA.

(Citado en <http://www.iata.csic.es/iata/dbio/poli/pacti.htf?pyi>)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron catorce muestras de cebolla china (Allium fistulosum L.) en la que se determinó la presencia de *Helicobacter pylori* en función a la amplificación del ADN en estudio, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Investigación que se llevó a cabo de acuerdo a las normas de bioseguridad pertinentes al nivel de riesgo correspondiente al material biológico y carga genética que se manipuló. Dicho estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Oncológico MAMLAB.

#### 3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población en estudio constituida por la cebolla china (Allium fistulosum L.) proveniente de siete áreas agrícolas de la zona del Ex fundo San Agustín en el Callao, cuya característica común fue el riego con aguas servidas.

Se tomaron dos muestras de cada parcela. La primera muestra fue recolectada al ingreso del canal de riego y la segunda del punto más alejado al ingreso del agua y cuyo objeto fue de investigar las

propiedades de la población o conjunto de procedencia; con el fin de detectar la presencia de *Helicobacter pylori*.

### 3.2. DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La zona de recolección de muestras biológicas estuvo comprometida entre las avenidas: Morales Duarez, Av. Coronel Néstor Gambeta, Ovalo Cantolao y la vereda posterior al Aeropuerto Internacional Jorge Chávez paralela a la avenida Eimer Faucett (ex fundo San Agustín), zonas pertenecientes a la Provincia Constitucional del Callao. (véase Figura N° 16 página 75).

La zona en mención fue delimitada de acuerdo al uso del suelo; preestablecido como zonas de cultivo, establecimientos ganaderos y asentamientos humanos y, en función al impacto generado por el recurso hídrico que comprendió aguas residuales sin tratar, que a través de él discurre y que directamente incidió sobre las parcelas con cultivos agrícolas que utilizaron dichas aguas residuales como fuente de riego.

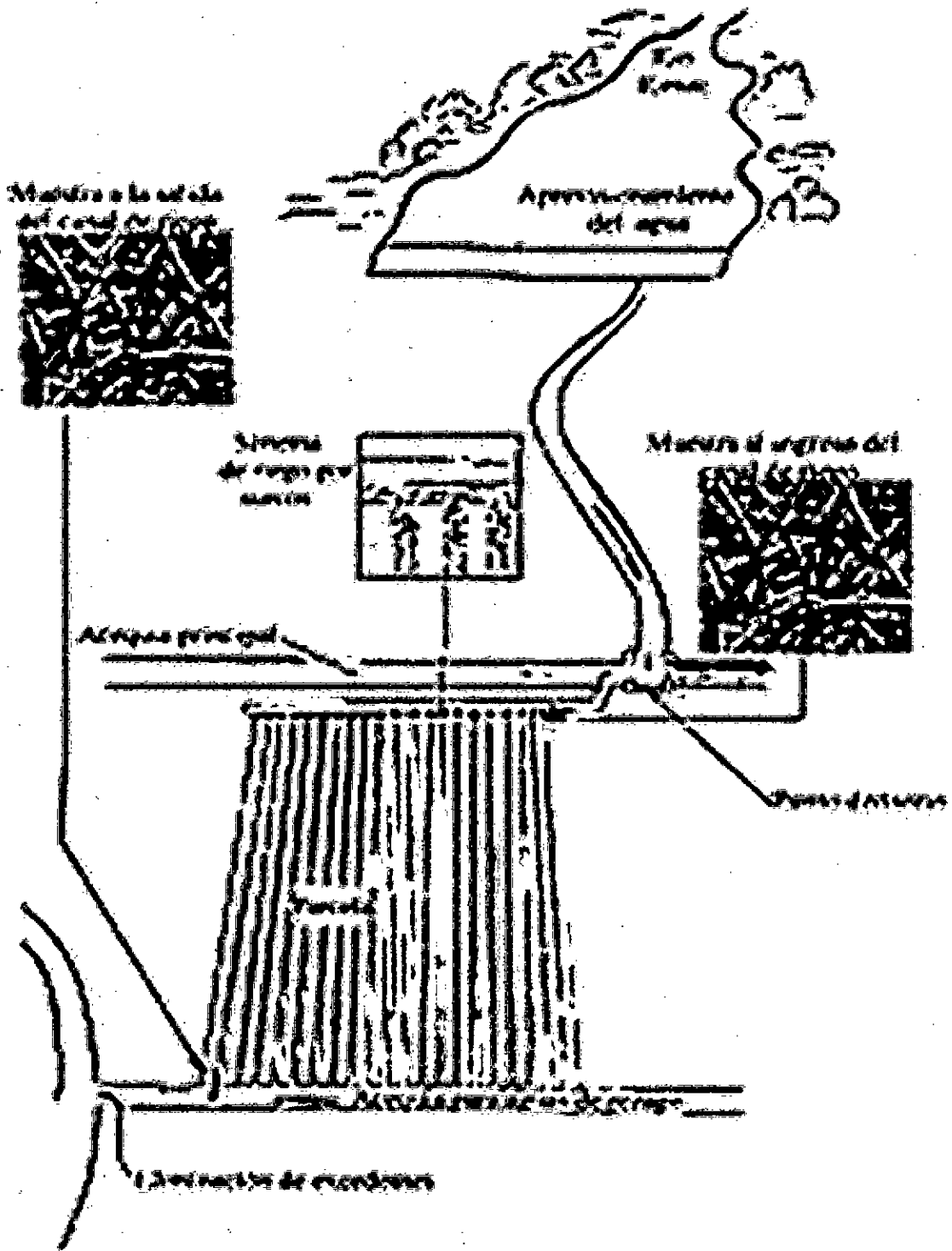


Consecuentemente se seleccionaron siete parcelas con cultivos de cebolla china (Allium fistulosum L.). Dichas parcelas fueron elegidas de tal modo que trató de enfocar toda la zona agrícola delimitada anteriormente, fue considerado como criterio de inclusión aquellas parcelas que tuvieron un sistema de riego por surcos que consiste en pequeños canales con una pendiente continua casi uniforme que sigue la misma dirección del riego.

FIGURA N° 16: DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO



FIGURA N° 17 CRITERIO DE LA SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN CADA PARCELA



Internacional Jorge Chávez y cuya fuente de abastecimiento en todos los casos fue el río Rímac en la zona de Playa Rímac en el Callao.

### 3.3. MATERIALES

#### 3.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las clases de muestras fueron de juicio, es decir, que la selección de las muestras se hizo sobre la base de un criterio preformado a cerca del universo. Pero las unidades de las muestras en cada toma será aleatoria, es decir que cada unidad de población tuvo las mismas posibilidades de ser extraídas y formar parte de la muestra.

Para tal fin fueron analizadas catorce muestras provenientes de siete parcelas con cultivos de cebolla china (Allium fistulosum L.), por cada parcela se referenciaron dos puntos de los cuales se tomaron las respectivas muestras, con el fin de relacionar el aporte de contaminación bacteriológica del riego a la muestra biológica, que fue posteriormente analizada por el protocolo investigativo y la estrategia debidamente seleccionada y llevada a cabo mediante la PCR. (véase Cuadro N° 5 al N° 11).

Se tomaron como criterios de inclusión en el primer punto de recolección de la muestra, aquellas cebollas que se encontraron en el ingreso de la parcela por donde inició el discurrir de las aguas de riego a través de los surcos de la parcela.

El segundo punto de recolección incluyó aquellas muestras que se encontraron más alejadas del punto de ingreso de las aguas de riego a la parcela. Considerándose además que por dicho punto de recolección el agua de riego excedente salió de la parcela (véase Figura N° 17 página 76).

Fueron motivo de exclusión aquellas muestras que presentaron signos de inmadurez, malformación, dañadas y con pigmentación y consistencia no características al de la cebolla china (Allium fistulosum L.) o aquellas que no se encontraron en los puntos de recolección estipulados anteriormente. Con el propósito de estandarizar las muestras para el adecuado análisis en el laboratorio. ( véase Cuadro N° 12 página 90).

Cada muestra tomada tuvo como puntos de referencia la raíz, el bulbo y la parte para foliar más próxima al bulbo.

La técnica de recolección de datos fueron de campo, donde la información obtenida durante el proceso de investigación se resumen en los Cuadros N° 5 al N° 13.

Las muestras fueron depositadas en tubos de Falcón con capacidad para 50 ml, estériles y se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta el momento del análisis (aproximadamente cuatro horas después de la toma de muestra).

CUADRO N° 5

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 1

NOMBRE DEL PROPIETARIO	P. S. R.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	500 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	28 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	21 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	3 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	53 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	48 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Rabanito
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Apio

CUADRO N° 6

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON

CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 2

NOMBRE DEL PROPIETARIO	A. R. C.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	540 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	30 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	24 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	2 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	42 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	50 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Apio
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Rabanito y berros



CUADRO N° 7

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 3

NOMBRE DEL PROPIETARIO	J. A. M.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	1000 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	29 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	23 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	3 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	59 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	41 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Porro
MONOCULTIVO	Si
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	No

CUADRO N° 8

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 4

NOMBRE DEL PROPIETARIO	C. C. G.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	285 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	27 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	21 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	2 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	54 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	61 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Berros
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Apio y Poro

CUADRO N° 9

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 5

NOMBRE DEL PROPIETARIO	H. A. R.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	1200 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	31 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	24 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	3 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	51 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	56 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Rabanitos
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Nabo y cebolla común

CUADRO N° 10

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 6

NOMBRE DEL PROPIETARIO	P. T. A.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	980 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	30 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	23 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	2 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	49 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	72 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Porro
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Porro y rábano

CUADRO N° 11

FICHA DE EVALUACIÓN DE PARCELAS CULTIVADAS CON  
CEBOLLA CHINA

PARCELA N° 7

NOMBRE DEL PROPIETARIO	M. C. V.
ÁREA DE LA PARCELA CON CULTIVO DE CEBOLLA CHINA	646 m <sup>2</sup>
SEPARACIÓN ENTRE SURCOS	28 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE PLANTAS	21 cm
FRECUENCIA ENTRE RIEGO	2 veces por semana
ANCHO DEL CANAL DE REGADÍO	62 cm
DISTANCIAMIENTO ENTRE EL CANAL DE REGADÍO A LA PARCELA	60 cm
CULTIVO ANTERIOR A LA CEBOLLA CHINA	Rabanito
MONOCULTIVO	No
OTROS CULTIVOS ADICIONALES A LA CEBOLLA CHINA	Cebolla común y poro

La secuencia de muestreo estuvo en función al día de riego, muestreándose aquellas parcelas cuyo riego se realizó en las últimas horas de la tarde o primeras horas de la mañana.

La toma de muestras se realizó durante el mes de Enero del año 2005. (Véase Cuadro N° 13 página 91).

### 3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Micropipetas de rango variable.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos Falcón 50 ml.
- Microtubos de ensayo 1.5 y 0.2 ml
- Hisopos descartables.
- Pizetas.
- Gradillas.
- Tips Low Retention de diferente rango.
- Papel parafilm.
- Placas Petri descartables.
- Hojas de bisturí.
- Agujas descartables.
- Protectores bucales.
- Gorro.

- Criobox.
- Cooler.
- Papel toalla.

### 3.3.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Microcentrífuga. CLINICA'S, velocidad 10 000 rpm.
- Baño María. CLINICA'S, rango 30 °C a 110 °C.
- Termociclador. APPLIED BIOSYSTEMS GEN CAMP. USA, modelo PCR System 9700.
- Microondas. MIRAY, modelo WP 700P17.
- Cámara de Electroforesis con Fuente de Poder. E.C. APPARATUS CORPORATION USA, modelo Minicell Ec 370 M.
- Transiluminador de Rayos Ultravioleta. UVP UPLAND, CA. USA.
- Esterilizador, MELAG.
- Refrigeradora MIRAY.
- Ultra congeladora F.B. FERROBRAS. BRASIL.

### 3.3.4. MATERIAL QUÍMICO.

- PBS pH 7.3
- TNE pH 8.0
- SDS 10%
- PK 20%
- Fenol pH 7.5
- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.
- Acetato de sodio pH 5.2 3M.
- Etanol helado.
- Agua desionizada libre de nucleasas.
- Hielo.
- Taq DNA polimerasa.
- Cebadores.
- d NTPs
- Cloruro de magnesio.
- Agarosa 4%
- Bromuro de etidio.
- Marcador de peso molecular 100 pb.



CUADRO N°12 : FICHA DE CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO EN ESTUDIO

	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 4	Muestra N° 5	Muestra N° 6	Muestra N° 7	Muestra N° 8	Muestra N° 9	Muestra N° 10	Muestra N° 11	Muestra N° 12	Muestra N° 13	Muestra N° 14
Características														
Altura del Bulbo	28 mm	27 mm	32 mm	32 mm	31 mm	30 mm	28 mm	31 mm	28 mm	30 mm	32 mm	27 mm	26 mm	31 mm
Altura Foliar	37cm	32 cm	38 cm	37 cm	43 cm	37 cm	41 cm	38 cm	34 cm	37 cm	42cm	31 cm	35 cm	33 cm
Díámetro del Bulbo	17 mm	15 mm	17 mm	19 mm	15 mm	16 mm	14 mm	18 mm	16 mm	18 mm	18 mm	15 mm	15 mm	18 mm
Peso del Bulbo más Follaje	78 g	72 g	81 g	90 g	79 g	84 g	72 g	82 g	77 g	93 g	89 g	78 g	87 g	77 g
Consistencia del Bulbo (*1)	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro	Duro
Color Externo del Bulbo (*2)	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma del Bulbo (*3)	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Pungencia (*4)	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Tiempo de Desarrollo Vegetativo	58 días	63 días	57 días	55 días	69 días	62 días	57 días	64 días	69 días	63 días	61 días	76 días	69 días	64 días

(\*1) Consistencia del Bulbo: Bulbo duro, medio o blando.

(\*2) Color externo del Bulbo: Blanco, amarillo, rosado, rojo, morado y rojo oscuro.

(\*3) Forma del Bulbo: Pequeño, partido, característico compacto, derecho sin cuello.

(\*4) Pungencia: Alta, media y baja.

**CUADRO N° 13 DATOS DEL MUESTREO**

<b>N° de Muestra</b>	<b>Fecha de la Toma de muestra</b>	<b>Hora de la Toma</b>	<b>Ubicación de la Toma en la Parcela (*)</b>	<b>Condición de la Muestra</b>
1	17/01/2005	10:40 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
2	19/01/2005	10:00 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
3	19/01/2005	10:30 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
4	19/01/2005	10:55 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
5	20/01/2005	10:30 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
6	20/01/2005	10:55 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
7	20/01/2005	11:23 hr	Ingreso del canal de riego	BUENA
8	25/01/2005	10:12 hr	Salida del canal de riego	BUENA
9	25/01/2005	10:36 hr	Salida del canal de riego	BUENA
10	25/01/2005	11:14 hr	Salida del canal de riego	BUENA
11	25/01/2005	11:46 hr	Salida del canal de riego	BUENA
12	27/01/2005	10:15 hr	Salida del canal de riego	BUENA
13	27/01/2005	10:38 hr	Salida del canal de riego	BUENA
14	27/01/2005	11:09 hr	Salida del canal de riego	BUENA

ICR: Ingreso del canal de riego.

SCR: Salida del canal de riego.

(\*) Criterio de selección de las muestras detallado en la Figura N° 17

### 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO MOLECULAR

La figura N° 18 muestra el Diagrama de Flujo de purificación y amplificación del gen Cag A del *Helicobacter pylori* basado en protocolo molecular del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Oncológico MAMLAB (2004).

#### 3.4.1. MANIPULACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La muestra refrigerada en un tubo Falcón de 50 ml se procedió a rehidratación, lavado y raspado de las células exfoliadas con solución de PBS (pH 7.4) y colocadas en placas Petri.

El líquido y células exfoliadas se depositaron en tubos de 1.5 ul y llevadas a centrifugación a 3500 rpm por quince minutos.

#### 3.4.2. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

El botón celular obtenido fue sometido a digestión enzimática en 167 ul de buffer Tris Sodio EDTA (TNE), 16.70 ul de duodecil sulfato de sodio (SDS) y 8.0 ul de la enzima proteinasa k, incubándolo durante 1 hora a 65°C.

### 3.4.3. EXTRACCIÓN ORGÁNICA

La extracción orgánica se realizó mediante la adición de 167  $\mu$ l de fenol pH 7.5 y una solución de 160  $\mu$ l de cloroformo y alcohol isoamílico y una posterior centrifugación a 10 000 rpm por cinco minutos.

### 3.4.4. PURIFICACIÓN DEL ADN

Se fundamenta en la precipitación a bajas temperaturas por efecto del acetato de sodio y el etanol helado, para tal operación el sobrenadante obtenido fue transvasado a otro tubo de ensayo ayudado de una pipeta Pasteur, se le añadió 50  $\mu$ l de acetato de sodio pH 5.2 y 500  $\mu$ l de etanol helado y se precipitó a  $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, posteriormente se procedió al secado por 15 minutos a temperatura ambiente y a la suspensión con agua desionizada para su posterior amplificación enzimática.

## 3.5 AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA MEDIANTE PCR

### 3.5.1. CONDICIONES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN ESTÁNDAR.

Para iniciar el proceso de replicación del ADN, se requirió dos secuencias denominadas iniciadores, las cuales promueven el inicio de la reacción de la Taq DNA polimerasa en lugares particulares del genoma que en nuestro caso fue el gen Cag A

Las amplificaciones del gen Cag A fue realizada en 50 ul de mezcla que contenía 10 ul de ADN muestra, 0.5 ul de Taq DNA polimerasa, 30 ul de mezcla de reacción (dNTPs e iniciadores sentido y antisentido) y 9.5 ul de agua estéril libre de nucleasas.

### 3.5.2. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA.

La amplificación de las muestras fueron llevadas a cabo en un termociclador Applied Biosystems, mediante el programa de PCR que consiste en una secuencia de ciclos con variaciones de temperatura y tiempo (véase Figura N° 15 página 69).

El primer evento consiste de un ciclo que permite una desnaturalización previa del ADN a 96°C. Los posteriores 35 ciclos comprenden 3 temperaturas de 94 °C por 1 min. Para la desnaturalización, 58 °C por 1 min para la alineación (véase Figura N°

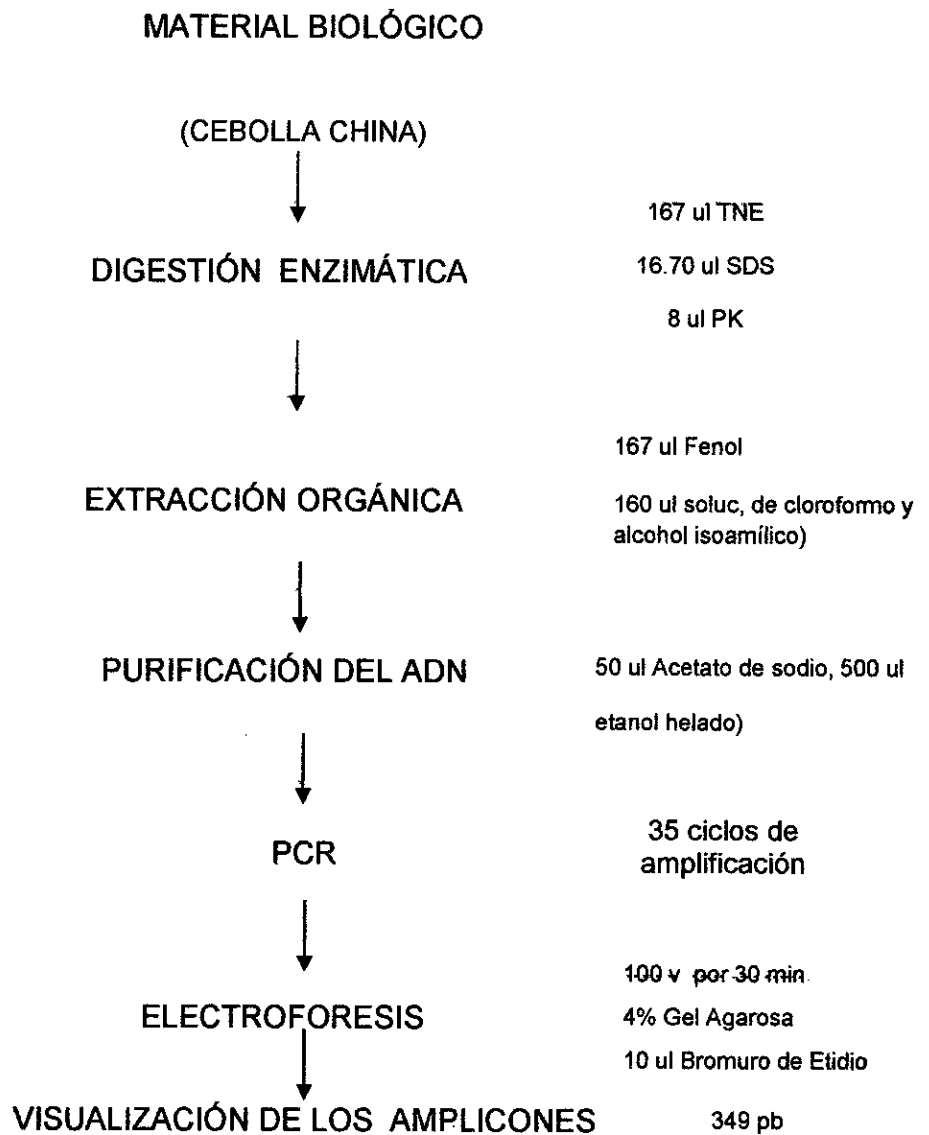
13 página 67) y 72 °C por 1 min para la extensión (véase Figura N° 14 página 68). Finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 10 minutos que corresponde al ciclo de extensión que asegura el mantenimiento de la última hebra formada.

### 3.5.3. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

El producto de amplificación fue corrido en un gel de agarosa al 4%, coloreado con 10 ul de bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó.

FIGURA N° 18

DIAGRAMA DE FLUJO DE PROTOCOLO MOLECULAR DE  
PURIFICACIÓN Y AMPLIFICACIÓN GÉNICA.



FUENTE: Laboratorio de Investigación Molecular MAMLAB

a 100v por 30 minutos, utilizándose un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

### 3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.6.1. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AMPLICONES

La caracterización genómica de los amplicones se determinó registrando el peso molecular del control positivo de referencia en base a la banda generada en la corrida electroforética y visualizada mediante el transiluminador de luz ultravioleta UVP.UPLAND después de una amplificación enzimática equivalente a 35 ciclos (véase Figura N° 19 página 101).

#### 3.6.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Una vez caracterizado los patrones de amplificación génica para cada muestra de Allium fistulosum L. de las siete parcelas se agruparon las muestras positivas a la presencia de *Helicobacter pylori*, aquellas que obtuvieron un producto de amplificación equivalente a 349 pb y comparadas con el control positivo de referencia y el marcador de peso molecular empleado.



### 3.6.3. IDENTIDAD GENÉTICA DEL ADN-Hp DE LA MUESTRA Y EL CONTROL POSITIVO.

El grado de identidad genética del ADN-Hp del Allium fistulosum L. y el control positivo se determinó en función del producto de amplificación de la expresión del gen Cag A y fueron característicos por el número de secuencias idénticas repetidas obtenidas. Este procedimiento se realizó en base a la comparación de frecuencia de bandas de la corrida electroforética.

### 3.6.4. COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA ADN-Hp OBTENIDA EN LAS PARCELAS EN BASE AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias del ADN-Hp fueron calculadas determinando la presencia positiva del gen Cag A para cada banda donde las frecuencias observadas fueron observadas y analizadas estadísticamente mediante la prueba de Ji cuadrado.

La prueba de ji-cuadrado es aplicable a una serie de situaciones en donde se hacen conteos y en donde los datos no obedecen a la

distribución normal, que constituyen lo que se conoce como estadística paramétrica.

Las pruebas de ji-cuadrado son, por lo tanto, conocidas como una modalidad no paramétrica. (Reyes, C. 1980)

La distribución ji-cuadrado es la técnica estadística utilizada con mayor frecuencia para el análisis de conteo o datos de frecuencias. Por ejemplo, es posible saber para una muestra de pacientes hospitalizadas cuántos son varones y cuántos son mujeres. (Wayne, W. 2002)

Esta etapa no contó con repeticiones por la alta sensibilidad de la prueba, que es del orden del 99.9%. Para evaluar si la población proviene de una población normal se realizó la prueba de ji-cuadrado.

$$X^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$

Donde:  $O_i$  = Observados

$e_i$  = Esperados

### 3.6.5. FACTORES DE RIESGO QUE INTERVIENEN EN LA PRESENCIA DE *Helicobacter pylori*.

Se asociaron diversos factores como la presencia de avícolas, establecimientos ganaderos aledaños, asentamientos humanos, el agua de riego y las prácticas agrícolas; analizados en base a los resultados proporcionados por la PCR y las características de ubicación de cada parcela con los lotes de producción aledaños.

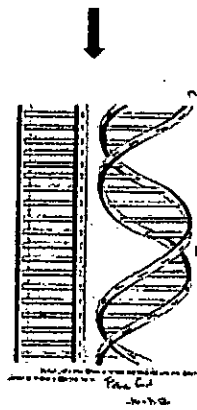
FIGURA N°19 ESQUEMA DE LA AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA POR PCR.



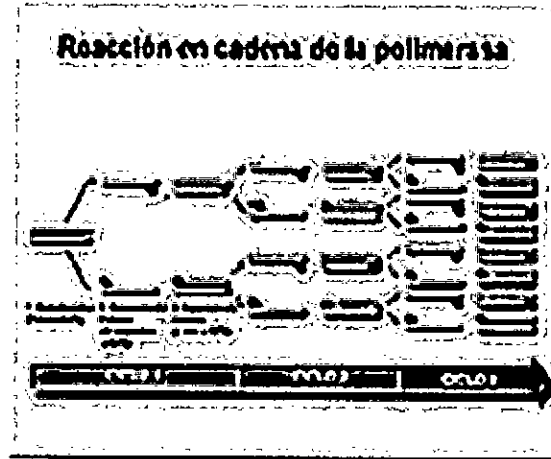
*Helicobacter pylori*



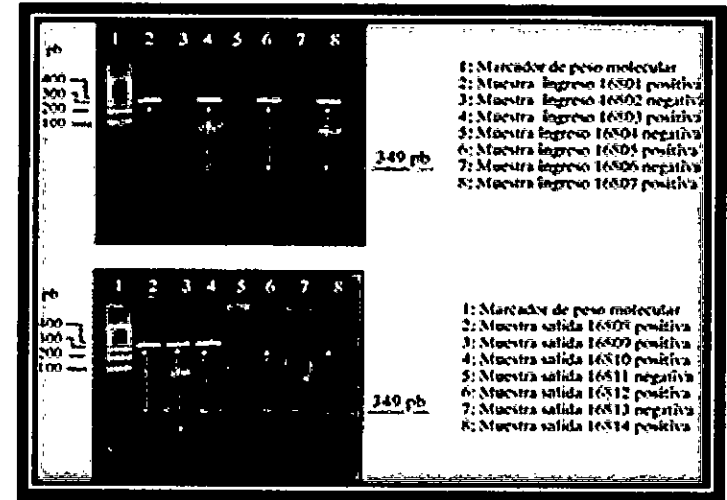
(*Allium fistulosum* L.)



ADN



PCR



VISUALIZACIÓN ELECTROFORÉTICA

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LOS AMPLICONES

Las catorce muestras analizadas mostraron bandas de buena calidad y alta resolución, por lo que la determinación del peso molecular del ADN del *Helicobacter pylori* pudo detectarse sin inconvenientes de acuerdo al control de referencia y al marcador de peso molecular de 100 pb utilizado.

### 4.2 DIAGNOSTICO MOLECULAR

#### 4.2.1. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS POR ADN Hp NEGATIVO

Cinco muestras de Allium fistulosum L. de las catorce analizadas en la investigación desarrollada reportaron negativo (véase Cuadro N° 14 páginas 103 y 104). Tres muestras (168.02, 168.04 y 168.06) pertenecieron a los puntos de recolección en el ingreso del canal de riego a la parcela, mientras que dos muestras (168.11 y 168.13) provenían de los puntos de recolección a la salida de las aguas excedentes de riego de la parcela.

La ausencia de bandas de las cinco muestras indicadas en la visualización con ultravioleta para el valor de 349 pb se debió al hecho de que los iniciadores no encontraron el segmento génico específico, no dándose la amplificación. (Montaldo, 1998).

#### CUADRO N° 14

#### IDENTIFICACIÓN ADN-Hp EN EL PUNTO DE INGRESO DEL CANAL DE RIEGO A LA PARCELA

N° De Parcela	Código Molecular de la Muestra en el ICR	Estudio Molecular		RESULTADO
1	168.01	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
2	168.02	PCR	ADN-Hp	NEGATIVO
3	168.03	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
4	168.04	PCR	ADN-Hp	NEGATIVO
5	168.05	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
6	168.06	PCR	ADN-Hp	NEGATIVO
7	168.07	PCR	ADN-Hp	POSITIVO

**ADN-Hp EN EL PUNTO DE SALIDA DEL CANAL DE RIEGO DE LA  
PARCELA**

<b>N° De Parcela</b>	<b>Código Molecular de la Muestra en la SCR</b>	<b>Estudio Molecular</b>		<b>RESULTADO</b>
1	168.08	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
2	168.09	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
3	168.10	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
4	168.11	PCR	ADN-Hp	NEGATIVO
5	168.12	PCR	ADN-Hp	POSITIVO
6	168.13	PCR	ADN-Hp	NEGATIVO
7	168.14	PCR	ADN-Hp	POSITIVO

**FUENTE:** Elaboración Propia.

#### 4.2.2 MUESTRAS QUE PRESENTAN AMPLIFICACIÓN GÉNICA POSITIVA

De las catorce muestras analizadas se encontraron nueve, que reportaron positivo a la presencia del ADN Hp de las cuales cuatro muestras (168.01, 168.03, 168.05, 168.07) corresponden a los puntos de recolección en el ingreso del canal de riego a la parcela, mientras que cinco (168.08, 168.09, 168.10, 168.12, 168.14) pertenecían a los puntos de recolección a la salida de las aguas excedentes de riego de la parcela. (véase Figura N° 20 página 109).

Esta amplificación positiva del gen Cag A correspondió al 64.29% del total de muestras, resultado que representa un peligro potencial para la salud por la evolución crónica que desencadena la infección por esta bacteria (véase Figura N° 7 y 8). Resultado que nos lleva a inferir el alto porcentaje de relación que guarda ésta bacteria en 85 por ciento de casos con gastritis crónica y de 95 por ciento de casos con gastritis duodenal (véase Figura N° 10 página 58).

#### 4.3. IDENTIDAD GENÉTICA DEL ADN Hp PRESENTE EN EL Allium fistulosum L. Y EL CONTROL DE REFERENCIA



La identidad genética del ADN Hp presente en el Allium fistulosum L. y el control de referencia positivo fue de 99.9% y presente en el 64.29% del total de muestras analizadas, lo cual significa que la probabilidad de tener el mismo reporte positivo para las muestras que se encuentran dentro de este 64.29% y el control positivo comercial es significativamente alta en relación con otros métodos de diagnóstico utilizados (véase Cuadro N° 4 página 62).

Por lo tanto la colección del ADN de las nueve muestras positivas logran representar el 99.9% de la estructura genética del control positivo de referencia que para la investigación desarrollada estuvo representada por la isla de patogenicidad Cag A, segmento génico específico del genoma bacteriano que contiene los factores de virulencia de la bacteria (véase Figura N° 5 página 46.)

Cabe recordar que para el análisis del grado de identidad genética se emplearon las frecuencias de bandas observadas con ultravioleta, en función del peso molecular en pares de bases, teniendo en consideración su migración electroforética que fue de 349 pb (Paisboll, 1999).

4.4. COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL ADN Hp OBTENIDO  
EN LAS PARCELAS EN BASE AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis de Ji-cuadrado para las muestras obtenidas de la PCR:

$H_0$  = La población de la cual fueron extraídas las muestras es normal.

$H_1$  = La población de la cual fueron extraídas las muestras no es normal.

Muestras de Cebolla China ( <i>Allium fistulosum</i> L.)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
Observados ( $o_i$ )	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
Esperados ( $e_i$ )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

De la fórmula:

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

$$X^2 = \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} +$$

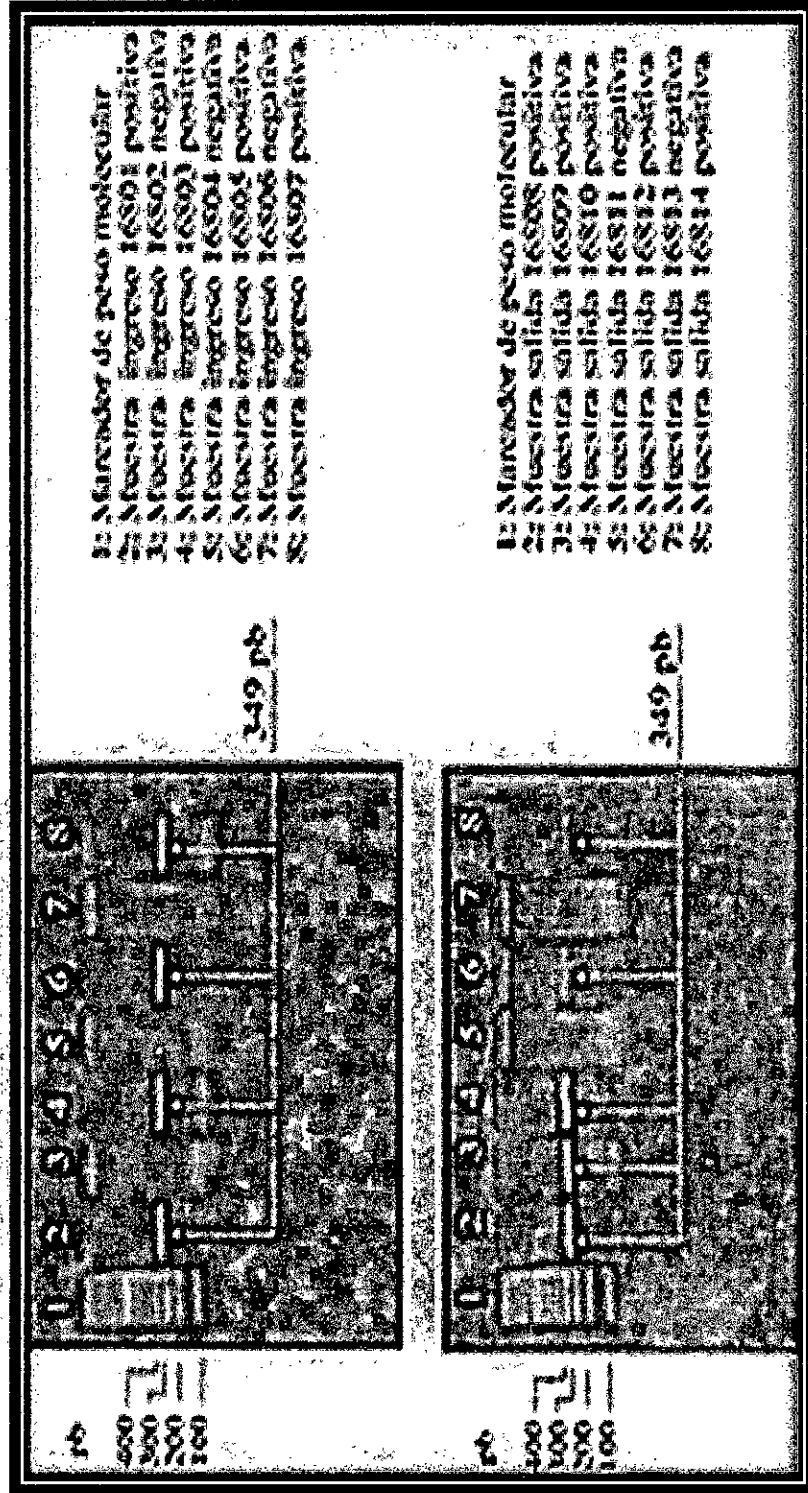
$$\frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(1-1)^2}{1} = 5$$

El valor de  $X^2_{(13)(0.05)}$  de tabla es 22.36

Conclusión: Se concluye que las muestras provienen de una población normal; esto quiere decir que la probabilidad de obtener un valor de ji-cuadrado de tamaño de 13 cuando la hipótesis nula es verdadera es mayor que 5 en 1000.

FIGURA N° 20

VISUALIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL *Helicobacter pylori* POST PCR.



#### 4.5. FACTORES DE RIESGOS QUE POSIBILITAN LA CONTAMINACIÓN CON *Helicobacter pylori*.

##### 4.5.1. ASOCIACIÓN DE *Helicobacter pylori* CON LA PRESENCIA DE ESTABLECIMIENTOS DE CRIANZA DE ANIMALES.

La parcela N° 3 reportó positivo a *Helicobacter pylori*, en ambos puntos de la toma de muestra 168.03 y 168.10, es interesante indicar que dicha parcela fue colindante con un establecimiento ganadero y avícola donde el hacinamiento entre personas, animales y presencia de moscas fueron fácilmente percibibles, siendo la tierra y las aguas de riego empleadas por la parcela directamente afectadas por la descarga de residuos de dicho establecimiento. (véase Figura N° 16 página 75).

El estudio molecular del ADN Hp para la parcela N° 2 (véase Cuadro N° 15 página 112) reportó positivo a la salida de la parcela (muestra 168.09).

Fue además este punto geográficamente más cercano a la zona de crianza de animales, que afectó anteriormente a la parcela N° 3, donde se evidenció además desechos orgánicos propios del establecimiento de crianza de animales que por defecto de arrastre de

agua de riego afectó las parcelas aguas abajo como es el caso de la parcela N° 2.

Drumm (1990) mencionó, que la aglomeración intrafamiliar y la convivencia entre personas y animales en espacios reducidos y bajo condiciones de poca higiene demostraron el riesgo de infección por *Helicobacter pylori*.

**CUADRO N° 15: FRECUENCIA DEL ADN – Hp DETECTADO**

	TOTAL	Muestra al Ingreso	Muestra a la Salida
N° de Casos	14	7	7
ADN-Hp Positivo	9/14	4/7	5/7
%Positivos	64.29	57.14	71.43
ADN-Hp Negativo	5/14	3/7	2/7
%Negativos	35.71	42.86	28.57
% TOTAL	100	100	100

FUENTE: Elaboración Propia.

Trejos y colaboradores (2003) reportaron valores de  $10^7$  NMP/100 ml de Coliformes fecales para muestras líquidas de aguas residuales de porquerizas y de  $10^5$  NMP/100 ml en muestras de suelo con residuos de gallinaza y pollinaza fresca.

Referente a este mismo punto de muestreo (muestra 168.09) de la parcela N° 2 el drenaje para la eliminación del excedente de agua no fue óptimo por la presencia excesiva de pastizales así como la inclinación de la acequia para recoger el agua de cada surco no fue el óptimo.

El departamento de Agricultura de la FAO menciona que los drenajes en las parcelas deberán ser adecuados para evitar el establecimiento de microclimas de alta humedad, los cuales promueven la proliferación de microorganismos patógenos (FAO, 1997). Asimismo Huamán y colaboradores (2005) mencionaron que el tiempo de vida del *Helicobacter pylori* es de 48 horas en condiciones de alta humedad.

#### 4.5.2. ASOCIACIÓN DE *Helicobacter pylori* EN LAS PARCELAS Y EL ESTABLECIMIENTO DE ASENTAMIENTOS HUMANOS COLINDANTES.



Se determinó la presencia de *Helicobacter pylori* en las parcelas 1, 5 y 7 (ver Figura N° 16 página 75) en ambos puntos de la toma de muestra para cada parcela, (muestras 168.01, 168.05, 168.07, 168.08, 168.12, 168.14) equivalente al 42.86 por ciento del total de muestras analizadas y equivalente al 66.67 por ciento del total de muestras positivas (ver Cuadro N° 16 página 118).

Las parcelas 1, 5 y 7 geográficamente son las más cercanas a la zona urbana de playa Rímac y al Asentamiento Humano El Ayllu en el Callao.

Las aguas que se usan para el riego de mencionadas parcelas, fueron afectadas anteriormente por residuos domésticos de estos centros poblados que desaguan en su cauce.

En forma análoga en un estudio sobre el incremento de cargas contaminantes sobre el río Otún e la ciudad de Pereira, el año 2003 para Coliformes fecales fue de  $1.7 \times 10^{13}$  NMP/ml antes del centro poblado de la Florida y de  $4.08 \times 10^{14}$  NMP/100ml después del centro poblado (Trejos y colaboradores, 2003).

La Organización Panamericana de la Salud (1996) brindó los valores promedio modificado para las aguas residuales sin tratar de diversas comunidades, que fueron de  $10^6$  NMP/100 ml Coliformes fecales.

#### 4.5.3. ASOCIACIÓN DE *Helicobacter pylori* CON LAS AGUAS DE USO AGRÍCOLA.

El Cuadro N° 15 indica que las parcelas N° 4 y 6 presentaron resultados negativos a la presencia de *Helicobacter pylori*, equivalente al 28.57 por ciento del total de muestras. Igualmente se identifican como las parcelas con mayor distanciamiento a centros poblados y zonas de crianza de animales, que incidan inmediatamente sobre el recurso hídrico que se utiliza para el riego de éstas parcelas.

Muller, G. (1981) menciona que la contaminación del agua es variable y puede ser muy alta en su curso y en la medida que no reciba nuevos embalses contaminantes, el número de gérmenes disminuye debido a la acción efectiva de varios factores como son la sedimentación, limitadas condiciones nutritivas, productos metabólicos tóxicos, la temperatura, actividad de otros microorganismos así como la radiación solar.

Sin embargo se obtuvo un 64.29 por ciento de muestras positivo al ADN-Hp donde la ruta de contaminación común fue el agua empleada, constituyéndose como un importante factor de riesgo para los cultivos de Allium fistulosum L. (véase Cuadro N° 16 página 100).

Ramírez y colaboradores (1999) demostraron en un estudio de aguas para consumo humano proveniente de diferentes fuentes en Lima Metropolitana que en un 50 por ciento de las muestras se halló *Helicobacter pylori*; de las cuales el 83.33 por ciento provenían de la Atarjea. Relación que demuestra el riesgo de infección de fuente de origen en una población peruana (Klein, 1999).

El informe N° 208-2005-DESB/DIGESA (2005) señaló que las 175 muestras de agua para consumo humano en la ciudad de Huancayo presentaron diatomeas no móviles y protozoarios en el agua potable, organismos que según el monitoreo no deben estar presentes.

#### 4.5.4. ASOCIACIÓN DE *Helicobacter pylori* CON LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS IN SITU.

La investigación desarrollada reportó una contaminación por *Helicobacter pylori* de 57.14 por ciento, solo para las muestras de cebolla china al ingreso del canal de riego a las parcelas. Ante la falta de investigación sobre la asociación de ésta bacteria con hortalizas regadas con agua servidas, un estudio realizado con hortalizas del mercado provenientes de huertas cuyo suelo se riega con aguas servidas, demostró que el 40 por ciento de las analizadas presentaban *Escherichia coli* (Muller, 1981), mientras que un estudio realizado por el CEPIS en Lima Perú menciona que el 91 por ciento de los productos agrícolas regados con aguas servidas mostraron presencia de enteroparásitos (León, 1995).

Hopkins (1993) mencionó, que la aparente correlación demostrada en población chilena entre el riesgo de infección y el consumo de vegetales crudos con aguas de dudosa calidad bacteriológica, sugieren fuertemente una transmisión fecal-oral por esta bacteria.

CUADRO N° 16

FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON *Helicobacter pylori*

Ubicación de las Parcelas	N° de Muestras Positivas	% en relación al Total de Muestras Positivas	% en relación al Total de Muestras Analizadas
Cercanía Presencia de AAHH	6	66.67	42.86
Cercanía Presencia de Animales	3	33.33	21.43
TOTAL	9	100	64.29

FUENTE: Elaboración Propia.

La presencia de *Helicobacter pylori* fue de 71.43 por ciento en la cebolla china muestreada en los puntos de salida del agua de riego de las parcelas, que es mayor que la encontrada en el grupo de muestras al ingreso de las parcelas. Esto se explicaría como es el caso de la parcela N° 1 (muestra 168.01 y 168.08) y la parcela N° 7 (muestra 168.07 y 168.14) cuyos lotes de producción adyacentes en etapa de cosecha tuvieron la presencia de trabajadores rurales bajo pésimas condiciones higiénicas que constituyeron una posible fuente de contaminación. Puesto que los lotes de producción están alejados de los baños e instalaciones de aseo personal y ante la ausencia de baños portátiles.

Alersi (2002) mencionó, que la contaminación por *Helicobacter pylori* depende de condiciones higiénico sanitarias bajas, nivel cultural escaso y malos hábitos higiénicos.

Gibson (1992) indicó, que la fuente de origen del *Helicobacter pylori* se basa en el aislamiento de esta bacteria en deposiciones humanas.

Adicionalmente los altos porcentajes de ADN-Hp e los cultivos con Allium fistulosum L. son el resultado de una contaminación masiva en toda la cadena de producción, incrementado por un refrescamiento y lavado antes de ser embalados y los malos hábitos higiénicos y de aseo personal de los productores; a esto se suma las pésimas condiciones higiénicas de manipulación a través de toda la ruta de comercialización por lo que se hace imprescindible una desinfección de la cebolla china mediante lavados secuenciales seguido de una desinfección utilizando agua de buena calidad bacteriológica y posterior enjuague previo tratamiento germicida adicional (FAO, 2004).

## V. CONCLUSIONES

1. Se puso en evidencia el riesgo al que están expuestos los cultivos agrícolas como el Allium fistulosum L. próximos a establecimientos de crianza de animales, debido a un hacinamiento entre personas, animales y los residuos que producen éstos, se consideró al *Helicobacter pylori* como un microorganismo cuyo riesgo de asociación fue equivalente a 21.43% del total de muestras es atribuible a dichos establecimientos.
2. Se determinó que la vía fecal urinaria proveniente de AAHH constituye el factor más importante de riesgo y contaminación con *Helicobacter pylori*, que llega a los cultivos de Allium fistulosum L. con un riesgo atribuible que alcanza el 42.86% para el ADN-Hp del total de muestras analizadas.
3. La investigación desarrollada determinó que el uso indiscriminado de agua para uso agrícola sin ningún tipo de control sanitario en la zona del Ex Fundo San Agustín en el Callao, constituye un factor que juega un rol relevante en la transmisión del *Helicobacter pylori* que incide en los cultivos de Allium fistulosum L. y que afecta a la población.



4. El análisis estadístico para las siete parcelas en estudio reportó que no se encontró diferencia significativa entre las parcelas con el fin de asociar a los diferentes factores de riesgo de contaminación por *Helicobacter pylori*, puesto que la proporción de contaminación de la cebolla china con la bacteria es la misma para todas las parcelas, haciendo uso de un nivel de significancia de 0.05.
  
5. Se determinó que el 64.29% de las muestras de cebolla china (Allium fistulosum L.) fueron positivas a la presencia de *Helicobacter pylori* y están asociadas a factores de riesgo como son: inadecuadas prácticas agrícolas, vertimientos de residuos sólidos y líquidos, procedentes de asentamientos humanos y de hacinamiento de hombre-animal.
  
6. Se amplificó y detectó la presencia del gen Cag A del ADN.Hp en el 64.29% de muestras de Allium fistulosum L., resultado que representa un peligro potencial para la salud por la carcinogénesis gástrica al que está relacionada, haciéndose necesario el monitoreo mediante análisis periódicos de este vegetal con el fin de detectar dicha bacteria, debido a que su principal destino es el consumo en crudo.

7. Se logró la introducción del método de diagnóstico molecular para productos agrícolas como lo es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para la detección de *Helicobacter pylori* en el Allium fistulosum L. con una colección de 9 ADN-Hp obtenidos, método que por su sensibilidad y especificidad a de ser considerado como el método estándar del futuro en Perú, para la identificación rápida de patógenos.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la determinación de *Helicobacter pylori* para otro tipo de cultivos colindantes con los de Allium fistulosum L. basado en el alto porcentaje del gen Cag A obtenidos, a fin de actualizar, promover y salvaguardar medidas fitosanitarias y de seguridad medidas fitosanitarias y de seguridad alimentaria.
2. Se recomienda estudiar molecularmente el Allium fistulosum L. en diversos puntos de venta finales, con el fin de determinar un posible incremento y relacionarlo con los resultados obtenidos para el gen Cag A en Allium fistulosum L. regado con aguas servidas a nivel de parcelas de producción aquí desarrollados.
3. Se recomienda como medida de prevención para reducir la cantidad de patógenos en la superficie del Allium fistulosum L. la aplicación de un lavado inicial, seguido de una desinfección química con cloro para luego terminar con un enjuague, consiguiendo un alto grado de limpieza, así como promover una cultura de ecuación higiénica desde

que los vegetales son cosechados hasta que lleguen al consumidor final.

4. Se sugiere el uso de los efluentes de las lagunas de estabilización que por su calidad bacteriológica previa certificación por el organismo competente constituirá un recurso muy apreciado que pueda aplicarse en la actividad agrícola de consumo de agua moderada, quedando exceptuados frutas, vegetales y todo tipo de consumo en crudo. Igualmente el empleo de dicho recurso en áreas desérticas; reforestación y riego de áreas verdes urbanas.
5. Se propone tomar en consideración futuras investigaciones para la detección del *Helicobacter pylori* en otras regiones del país haciendo uso de métodos moleculares, con el fin de conocer por un lado la variabilidad genética de la bacteria en Perú, y de investigar por otro los reservorios y vectores de transmisión de dicha bacteria de estas regiones.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. AGAPITO, T. Y SUNG, I. (S/F). Fitomedicina. Editorial Isabel. Perú.  
256 pp.
2. ALERSI, D. (2002). Enfermedad por *Helicobacter pylori*. Revista Elec.  
De Med.Intensiva. Art N° 461. Vol. 2 N° 9.
3. ATHERTON, J.C. (2004). Infecciones por *Helicobacter pylori*.  
Principios de Medicina Interna Harrison. 1076 pp
4. <http://www.allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>
5. <http://www.argenet.com.ar/~hernan/docs/patologa.html>
6. <http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigpcr.html>
7. <http://www.azti.es/castellano/genetico.asp>

8. [http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe7amgen/pak\\_biotec](http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe7amgen/pak_biotec)
9. [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15\\_1\\_01/ali07101.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15_1_01/ali07101.htm)
10. [http://www.cepis.ops\\_oms.org/eswww.fulltext/repind53/mtr](http://www.cepis.ops_oms.org/eswww.fulltext/repind53/mtr)
11. COLLAZOS, CH. C. et al. (1996). *Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Séptima Edición. Editora Gráfica. Perú. 86 pp.*
12. CONDORI, R. J. (2003). "Selección de la Collección Núcleo de Solanum tuberosum Subs. Andígena Basada en Marcadores Microsatelitales Loci. Genetics". U.S.A. 296 pp.
13. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA (1978). *Planeamiento de Sistemas de Riego para Granjas. Editorial Diana, México. 140 pp.*
14. DRUMM, B. (1990). *Intrafamilial clustering of Helicobacter pylori infection. Reino Unido. 322 pp.*

15. [http://www.ecuadorexporta.org/productos\\_down/pdf](http://www.ecuadorexporta.org/productos_down/pdf)

16. <http://www.gastrohvm.medynet.com/hpylori.htm>

17. [http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas\\_de\\_gastroenterologia.htm](http://www.hipocrates.tripod.com/cirugia/atlas_de_gastroenterologia.htm)

18. HOPKINS, R. J. (1993), Seroprevalencia of Helicobacter pylori in Chile: Vegetables May Serve as one Route of Transmission. 226 pp.

19. <http://www.iata.csic.es/iata/dbio/poli/pacti.htf?pyi>

20. <http://www.iladiba.com.co/upr/1997/No41997/htm/Helic.asp>

21. INTERNATIONAL COMISIÓN ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETIES (ICMSF). (1998). Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza .ESPAÑA. 606 pp.

22. JONES, A.H. (1963). Onions and their Aliens, Interscience Publishers, INC. New York. U.S.A. 286 pp.
  
23. KLEIN, P. D. (1999). Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian Children. 337 pp.
  
24. [http://www.losdeconstructores.com/zona\\_verde/lista\\_plantas\\_aromaticas](http://www.losdeconstructores.com/zona_verde/lista_plantas_aromaticas)
  
25. MINISTERIO DE AGRICULTURA. Oficina de Información Agraria. Perú Compendio Estadístico Agrario 1990-1993. Tomo II.
  
26. MINISTERIO DE AGRICULTURA. Oficina de Información Agraria. Producción Agrícola 1994-2000.
  
27. PALSROLL, P. J. (1999). Multiple Levels of Single Strand Slippage at Cetacean Tri and Tetranucleotide Repeat Microsatellite Loci. Genetics. U. S. A. 296 pp.



28. PRINT, F. (1980). Plantas Hortícolas. Editorial Floraprint. España. 143 pp.

29. <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota63-3.htm>

30. [http://www.proexant.org.ec/HT\\_Cebolleta.html](http://www.proexant.org.ec/HT_Cebolleta.html)

31. REYES, C. (1980). Bioestadística Aplicada. Editorial Trillas. México. 216 pp.

32. <http://www.roemmers.com.ar/infovida/gastritis.asp#aguda>

33. SALAS, M. J. (1998). "Comparativo de Cultivares de Cebolla (*Allium cepa* L.) en dos localidades". Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Lima- Perú. U. N. A. L. M.

34. <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap17.htm>

35. SOBRINO, I. (1992). Tratado de Horticultura Herbácea. Editorial Aedos. Barcelona (España). 33 pp.
36. THOMAS, J. E. (1992). Isolation of Helicobacter pylori from human feces. 340 pp.
37. [http://www.tuotromedico.com/temas/ulcera\\_gastroduodenal.htm#0](http://www.tuotromedico.com/temas/ulcera_gastroduodenal.htm#0)
38. <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/espaciales/ee-10-20047conferencias>
39. [http://www.uc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p028.html](http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p028.html)
40. <http://us.labsystems.roche.com/pcr/microwel.htm>
41. WAYNE, W. (2002). Bioestadística. Editorial Limusa Wiley. México. 755 pp.
42. <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2009/02/21/113252>

43. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292011000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292011000100008&script=sci_arttext)
44. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
45. <https://biotechmind.wordpress.com/2015/02/02/pcr-polymerase-chain-reaction/>