

11661

2  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS SEROLOGICAS,  
MICROBIOLOGICAS, HISTOLOGICAS Y PCR EN EL  
DIAGNOSTICO DE INFECCION POR *Helicobacter pylori* EN  
PACIENTES PEDIATRICOS CON ALGUN  
TRASTORNO GASTRICO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRIA EN**

**MICROBIOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. GLORIA LETICIA ARELLANO MARTINEZ**

**DIRECTORA: DRA. SILVIA GIONO CEREZO**

**ASESOR: DR. ANDRES ROMERO ROJAS**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

1999

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

272840



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Universidad Nacional  
Autónoma de México

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE**  
**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO**  
**DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR**  
Presente

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que la alumna ARELLANO MARTINEZ GLORIA LETICIA, con No. de Cta. 8207411-1 y No. de Exp. 100961034 de quien consideramos ha cumplido con todos los requisitos de las actividades en el plan de estudios (481), por lo cual no encontramos inconveniente alguno para que proceda a presentar examen de grado de Maestría en Microbiología, con la tesis titulada "ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS SEROLOGICAS, MICROBIOLOGICAS, HISTOLOGICAS Y PCR EN EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR Helicobacter pylori EN PACIENTES PEDIATRICOS CON ALGUN TRASTORNO GASTRICO". Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli a 26 de Noviembre de 1999

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DRA. SILVIA GIONO CERESO

VOCAL: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

SECRETARIO: DR. JAVIER TORRES LOPEZ

PRIMER SUPLENTE: DR. VICTOR TENORIO GUTIERREZ

SEGUNDO SUPLENTE: DR. ANDRES ROMERO ROJAS

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Bajo la dirección de la Dra. Silvia Giono Cerezo.

Departamento de Endoscopias Pediátricas, Hospital General Centro Médico “La Raza” IMSS. Con la colaboración de la Dra. Rosalia Austria Mireles.

Laboratorio 8 (Biología Molecular), Unidad de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. A cargo del Dr. Andrés Romero Rojas.

La realización del trabajo fue apoyada por la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN. Clave DEPI: 9404464, CGPI:990258.

Los estudios de Maestría fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca crédito 93880.

# INDICE

	Página
I. RELACION DE CUADROS	i
II. RELACION DE FIGURAS	iii
III. LISTA DE ABREVIATURAS	iv
IV. RESUMEN	vi
V. ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCION	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	3
1.2.1. Morfología bacteriana	3
1.2.2. Características de crecimiento	4
1.2.3. Características estructurales y antigénicas	5
1.2.4. Metabolismo	7
1.2.5. Mecanismos de patogenicidad	7
1.3. IMPORTANCIA MEDICA	16
1.4. TRANSMISION	17
1.5. DISTRIBUCION, INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA INFECCION POR <i>H. pylori</i>	19
1.6. DIAGNÓSTICO	22
1.6.1. Métodos que requieren endoscopia	22
1.6.2. Métodos que no requieren endoscopia	27
1.7. TRATAMIENTO	30
2. JUSTIFICACION	33
3. HIPOTESIS	34
4. OBJETIVOS	35

5. MATERIALES Y METODOS	36
5.1. POBLACION	36
5.2. TOMA DE MUESTRA	36
5.3. METODOS DE DIAGNOSTICO	37
5.3.1. Estudio histológico	39
5.3.2. Cultivo	39
5.3.3. Prueba de ureasa rápida	40
5.3.4. Tinción de biopsia con Gram	40
5.3.5. Pruebas de ELISA	40
5.3.6. Inmunoelectrotransferencia	43
5.3.7. PCR	44
5.4. DEFINICIONES	46
5.5. ANALISIS ESTADISTICO	47
6. RESULTADOS	49
6.1. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA	49
6.2. DIAGNOSTICO ENDOSCOPICO	50
6.3. MUESTRAS OBTENIDAS	51
6.4. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	52
6.4.1. Estudio histológico	52
6.4.2. Cultivo	52
6.4.3. Prueba de ureasa rápida	53
6.4.4. Tinción de biopsia con Gram	53
6.4.5. Pruebas de ELISA	54
6.4.6. Inmunoelectrotransferencia	55
6.4.7. PCR	56
6.5. COMPARACION DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS	58
6.6. COMPARACION DEL DIAGNOSTICO CLINICO, HALLAZGOS ENDOSCOPICOS E HISTOLOGICOS CON LA INFECCION POR <i>H. pylori</i>	63

7. DISCUSION	65
8. CONCLUSIONES	78
9. APENDICE	80
10. REFERENCIAS	84

## I. RELACION DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1</b>	Especies del género <i>Helicobacter</i> . 2
<b>Cuadro 2</b>	Factores de patogenicidad de <i>H. pylori</i> . 8
<b>Cuadro 3</b>	Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> en países en vías de desarrollo. 21
<b>Cuadro 4</b>	Métodos de diagnóstico para detectar infección por <i>H. pylori</i> . 22
<b>Cuadro 5</b>	Medios útiles para el cultivo de <i>H. pylori</i> . 25
<b>Cuadro 6</b>	Pruebas bioquímicas que diferencian al género <i>Helicobacter</i> de otros géneros afines. 25
<b>Cuadro 7</b>	Regímenes de erradicación de <i>H. pylori</i> 31
<b>Cuadro 8</b>	Características de la población estudiada. 49
<b>Cuadro 9</b>	Diagnóstico endoscópico en la población estudiada. 51
<b>Cuadro 10</b>	Relación de muestras obtenidas 51
<b>Cuadro 11</b>	Relación de estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción con Gram, ELISA (extracto total y CagA) y PCR que dieron indicios relacionados con infección por <i>H. pylori</i> . 58
<b>Cuadro 12</b>	Sensibilidad y especificidad de la prueba de ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR empleando como referencia cultivo y/o estudio histológico. 59
<b>Cuadro 13</b>	Valor de $X^2$ para la prueba de ureasa rápida, tinción con Gram, serología y PCR comparadas con el cultivo y/o estudio histológico 60



	Página
<b>Cuadro 14</b>	Concordancia de las pruebas diagnosticas para <i>H. pylori</i> cuando la infección es definida con $\geq 3$ , $\geq 4$ , $\geq 5$ o $\geq 6$ pruebas positivas. 61
<b>Cuadro 15</b>	Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR tomando como referencia $\geq 3$ pruebas positivas. 62
<b>Cuadro 16</b>	Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR tomando como referencia $\geq 4$ pruebas positivas. 62
<b>Cuadro 17</b>	Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR tomando como referencia $\geq 5$ pruebas positivas 62
<b>Cuadro 18</b>	Valor de $\chi^2$ para el estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción con Gram, serología y PCR comparadas con $\geq 4$ pruebas positivas. 63
<b>Cuadro 19</b>	Comparación del diagnóstico clínico con la infección por <i>H. pylori</i> considerando $\geq 4$ pruebas positivas. 64
<b>Cuadro 20</b>	Comparación de los hallazgos endoscópicos e histológicos con la infección por <i>H. pylori</i> considerando $\geq 4$ pruebas positivas. 64

## II. RELACION DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b>	Corte longitudinal de <i>Helicobacter pylori</i> y de <i>Campylobacter jejuni</i> . 3
<b>Figura 2</b>	Mucosa gástrica colonizada por <i>H. pylori</i> . 4
<b>Figura 3</b>	Pasos hipotéticos de la formación de úlcera después de la infección por <i>H. pylori</i> . 14
<b>Figura 4</b>	Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> de acuerdo a los datos de 14 países desarrollados y 15 países en vías de desarrollo. 20
<b>Figura 5</b>	Seroprevalencia y magnitud por edad, de la respuesta de IgG anti- <i>H. pylori</i> en 11,605 sujetos mexicanos. 20
<b>Figura 6</b>	Principio de la prueba de ureasa rápida. 26
<b>Figura 7</b>	Diagrama general de trabajo. 38
<b>Figura 8</b>	Nivel socioeconómico de los padres de los niños estudiados. 50
<b>Figura 9</b>	Hallazgos histológicos en la población estudiada. 52
<b>Figura 10</b>	Impronta directa de biopsia teñida con la técnica de Gram. 53
<b>Figura 11</b>	Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> empleando pruebas microbiológicas. 54
<b>Figura 12</b>	Sueros positivos y negativos a <i>H. pylori</i> por prueba de ELISA. 54
<b>Figura 13</b>	Niveles de anticuerpos IgG contra extracto total de <i>H. pylori</i> y proteína CagA recombinante. 55
<b>Figura 14</b>	Inmunoelectrotransferencia de los sueros de los pacientes enfrentados a un lisado de <i>H. pylori</i> ATCC 43504. 56
<b>Figura 15</b>	PCR para la detección del gen <i>vacA</i> en <i>H. pylori</i> ATCC 43504. 57
<b>Figura 16</b>	PCR para la detección del gen <i>vacA</i> en las biopsias de los pacientes 57

### III. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de cepas de referencia)
CagA	Proteína asociada a citotoxicidad
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Enzime Linked Immunosorbent Assay (Enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kDa	Kilodaltones
M	Molar
µg	Microgramos
mg	Miligramos
µl	Microlitros
ml	Militros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PBSTT	Amortiguador de fosfatos-timerosal-tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pmol	Picomol
r. p. m.	Revoluciones por minuto
Taq-DNApol	DNA polimerasa de <i>Thermus acuaticus</i>
TBE	Amortiguador de Tris-Borato-EDTA.

U	Unidades
VacA	Toxina vacuolizante

## IV. RESUMEN

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo asociado a trastornos gastrointestinales tales como: gastritis crónica activa, úlcera gástrica, úlcera duodenal y gastritis atrófica (considerada precursor del cáncer gástrico). Se ha demostrado que la infección puede adquirirse en la infancia, y que cuando esto sucede se tiene mayor predisposición al desarrollo de úlcera duodenal y cáncer gástrico en la vida adulta.

El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar infección por *H. pylori* en una población pediátrica con trastornos gástricos, evaluar 7 métodos de diagnóstico y, aislar *H. pylori* a partir de placa dental y materia fecal. Se trabajaron 100 pacientes con trastorno gástrico, atendidos en el Departamento de Endoscopias Pediátricas del Hospital General Cetro Médico "La Raza"-IMSS. El diagnóstico de infección por *H. pylori* se realizó mediante: estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, dos pruebas de ELISA (una con extracto total de *H. pylori* como antígeno y la otra con proteína CagA recombinante como antígeno) y PCR.

Por evaluación endoscópica se encontró que 71% de los pacientes estudiados presentó gastritis. Los pacientes infectados con *H. pylori* presentaron gastritis nodular (90%) o úlcera gástrica (2%). Por pruebas invasivas se encontró un 24% de pacientes infectados. Por serología se encontró: 35% positivos para CagA y 53% positivos para extracto total. Las pruebas que dieron el mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad fueron ureasa rápida (100%/95%) y tinción de biopsia con Gram (95%/95%), el menor porcentaje de sensibilidad (75%) fue para ELISA con CagA y PCR. La PCR fue la prueba con mayor porcentaje de especificidad (98.98%). Por inmunoelectrotransferencia se identificaron una serie de proteínas (100-133 kDa) de *H. pylori* ATCC 43504 que fueron reconocidas por los sueros de los pacientes en los que se diagnóstico *H. pylori* mediante pruebas invasivas, aunque no se estableció de que proteínas se trata. No se logró aislar *H. pylori* ni de placa dental ni de materia fecal.

## V. ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a Gram negative rod associated to gastrointestinal diseases as chronic active gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer and atrophic gastritis (predecessor of gastric cancer). The infection was showed that can be acquired in childhood and if this occurs the possibility to gets duodenal ulcer and gastric cancer in adult life increases.

The aim of this research was to make the diagnosis of *H. pylori* infection in a pediatric population with gastric disease, comparing 7 diagnostic methods and, the isolation of *H. pylori* from dental plate and feces. We studied 100 patients with abdominal disease who attended at endoscopic evaluation in the Pediatrics Endoscopic Department of General Hospital, Medical Center "La Raza"-IMSS. The diagnosis of *H. pylori* infection was made by: histologic study, culture, urease test, biopsy stain by Gram, two ELISA tests (one with whole cell as antigen and other with CagA recombinant protein as antigen) and PCR.

By endoscopic evaluation 71% of patients that were studied had gastritis. The diagnosis associated to *H. pylori* infection were nodular gastritis (90%) and gastric ulcer (2%). By invasive tests 24% patients were found to be infected. By serological tests 53% were positives to ELISA with whole cell and 35% were positives to ELISA with CagA recombinant protein. The tests with highest percentage of sensitivity and specificity were urease test (100%/95%) and Gram stain (955/95%). The tests with lowest percentage of sensitivity (75%) were ELISA (whole cell) and PCR, however PCR had the highest percentage (98.98%) of specificity. By western-blot we found some proteins (100-133 Kda) of *H. pylori* ATCC 43504 that were recongnized by sera of patients positives to *H. pylori* infection by invasive tests, we did not define what proteins we were dealing with. *H. pylori* was not isolated from feces or dental plate.

# I. INTRODUCCION

## 1.1. ANTECEDENTES

Hasta hace poco más de 15 años, se creía que el pH del estómago no permitía la infección bacteriana de la mucosa gástrica. En 1979, el patólogo australiano Robin Warren notó la presencia de bacterias curvadas en biopsias gástricas, estos microorganismos no estaban presentes dentro de la mucosa, pero sí en la capa de moco, sobre el tejido. Warren encontró que a finales del siglo XIX varios patólogos europeos habían descrito microorganismos similares, pero como no pudieron ser aislados fueron ignorados. Warren junto con Barry Marshal, interesado en los trabajos del primero, se dedicaron a aislar el microorganismo a partir de biopsias, intentaron el aislamiento de forma similar a como se hacía con *Campylobacter* debido a que se trataba de bacilos curvos Gram negativos. Los primeros cultivos (30 especímenes) fueron negativos ya que máximo los incubaron 3 días bajo condiciones microaerofílicas. Por un acontecimiento casual (se atravesaban días festivos) los cultivos fueron incubados por 5 días y entonces pudieron observar crecimiento. El microorganismo fue aislado y caracterizado como *Campylobacter pyloridis*. Después de la publicación de sus trabajos en 1983, investigadores de todo el mundo rápidamente confirmaron la presencia de estos microorganismos en la mucosa gástrica.<sup>40,64</sup>

En 1989 Goodwin y cols. basándose en pruebas bioquímicas y análisis de RNA ribosomal, reclasificaron el microorganismo dentro de un nuevo género al que llamaron *Helicobacter*. De esta forma el bacilo aislado de estómago humano fue llamado *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)<sup>88</sup>. Actualmente se han identificado más de 20 especies del género *Helicobacter*, de las cuales 7 han sido asociadas a infecciones en los humanos (Cuadro 1).<sup>50,117</sup>

En 1984 se estableció que la infección con *H. pylori* estaba fuertemente asociada con inflamación de la mucosa gástrica (gastritis crónica superficial) y especialmente con la

Cuadro 1. Especies del género *Helicobacter*

Género y especie	Origen conocido	Enfermedades asociadas	
		Humano	Veterinaria
<i>Helicobacter pylori</i>	<u>Humanos</u>	Gastritis, linfoma gástrico	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter acinonyx</i>	Chitas	Ninguna hasta ahora	Gastritis en chitas
<i>Helicobacter nemestrinae</i>	Primates	Ninguna hasta ahora	Gastritis en monos macaco
<i>Helicobacter heilmanie</i>	<u>Humanos</u>	Gastritis	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter bizzozeroni</i>	Perros	Ninguna hasta ahora	Gastritis canina
<i>Helicobacter felis</i>	Perros y gatos	Ninguna hasta ahora	Gastritis canina y felina
<i>Helicobacter pullorum</i>	Aves de corral	Ninguna hasta ahora	Hepatitis aviar
<i>Helicobacter CLO-3</i>	<u>Humanos</u>	Proctitis	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter fennelliae</i>	<u>Humanos</u>	Gastroenteritis, septicemia, proctocolitis	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter sp. cepa Mainz</i>	<u>Humanos</u>	Artritis séptica	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<u>Humanos</u> y hámsters	Gastroenteritis, septicemia, proctocolitis	Enteritis del hámster
<i>Helicobacter bilis</i>	Ratones	Ninguna hasta ahora	Hepatitis murina crónica y tumores hepatocelulares
<i>Helicobacter rappini</i>	<u>Humanos</u> , borregos y ratones	Gastroenteritis	Aborto ovino
<i>Helicobacter canis</i>	Perros	Ninguna hasta ahora	Gastroenteritis canina
<i>Helicobacter muridarum</i>	Roedores	Ninguna hasta ahora	Gastritis murina
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Ratones	Ninguna hasta ahora	Hepatitis necrotizante murina
<i>Helicobacter pamatensis</i>	Pájaros y cerdos	Ninguna hasta ahora	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter sp. Bird-C</i>	Pájaros	Ninguna hasta ahora	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter sp. Bird-B</i>	Pájaros	Ninguna hasta ahora	Ninguna hasta ahora
<i>Helicobacter mustelae</i>	Hurón y visón	Ninguna hasta ahora	Gastritis en hurones
<i>Helicobacter sp. cholecystus</i>	Hámsters	Ninguna hasta ahora	Colangiofibrosis y páncreatitis centrilobular en hámster

Modificado de On (1996)<sup>117</sup> y Franklin, et al. (1996)<sup>50</sup>

infiltración de células polimorfonucleares (gastritis crónica activa), aunque tuvieron que pasar varios años para tener evidencias suficientes de la etiología.<sup>84,145,165</sup>

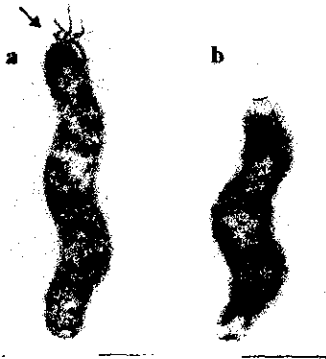
En 1991 se presentaron varios reportes en los que se asoció a *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico y en 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud lo declararon carcinógeno potencial para los humanos.<sup>40,59,115,121</sup>



## 1.2. *HELICOBACTER PYLORI*

### 1.2.1. Morfología bacteriana

*H. pylori* es un microorganismo Gram negativo, pleomórfico (forma de "S", bacilo espiral o alas de gaviota), mide 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y posee 4-6 flagelos unipolares con terminación en bulbo, cada flagelo mide aproximadamente 3-4  $\mu\text{m}$  de largo y 2.5 nm de ancho.<sup>40,96</sup> La superficie de *H. pylori* es lisa, a diferencia de la de *Campylobacter* que es rugosa (Fig. 1).<sup>112</sup>



**Fig. 1** Corte longitudinal de *Helicobacter pylori*(a) y de *Campylobacter jejuni*(b). *H. pylori* tiene superficie lisa, bordes bien redondeados y flagelo polar (flecha). *C. jejuni* tiene una típica pared rugosa y flagelo bipolar. (Barra = 500 nm). Tomado de Murray *et al.* (1990)<sup>112</sup>

En los especímenes de biopsia gástrica *H. pylori* presenta una forma espiral característica (Fig. 2), pero también se han encontrado formas cocoides. En los cultivos la mayoría de las bacterias asumen la forma de bacilo, la forma espiral es poco frecuente o esta ausente y cuando se expone a condiciones desfavorables adquiere la forma cocoide. Las formas cocoides no son cultivables bajo los métodos estándar de laboratorio y los datos acerca de si son viables o no aún son contradictorios, de hecho se ha postulado la existencia de dos formas cocoides, una viable y la otra atribuible a cambio morfológico por muerte celular.<sup>40,87</sup>



Figura 2. Mucosa gástrica colonizada por *H. pylori*. Tomado de Tortora, *et al.* (1992)<sup>160</sup>

## 1.2.2. Características de crecimiento

*H. pylori* es un microorganismo de crecimiento lento (3-7 días) que requiere de un medio rico y condiciones microaerofílicas (5-7% de oxígeno, 10% bióxido de carbono y 80% de nitrógeno). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque puede crecer de 30-37°C.<sup>96</sup>

Su crecimiento *in vitro* requiere un medio basal complejo (sólido o líquido) suplementado con sangre de carnero, caballo o humana, suero, hemina, almidón o emulsión de yema de huevo, mientras algunos de estos compuestos le sirven de nutriente, otros pueden servir para detoxificar el medio y proteger al microorganismo. Uno de los primeros medios usados fue el agar infusión cerebro corazón con 7% de sangre de caballo desfibrinada e IsoVitalex X, también se ha sugerido el uso del agar Columbia, agar Casman, agar chocolate, agar de Mueller-Hinton, agar brucella, agar Skirrow, agar soya tripticaseína y agar yema de huevo.<sup>4,79,96,172</sup>

Los medios líquidos, se requiere complementarlos con suero de caballo o suero fetal bovino en concentraciones que pueden variar del 2 al 10%, cuando se emplea un medio líquido

básico a partir de triptona, se sugiere adicionar algunos iones divalentes como magnesio, manganeso, fierro, cobre y zinc.<sup>4,29,79</sup>

En medio sólido fresco y con alta humedad crece como colonias translúcidas de 0.5-1 mm de diámetro, lisas, con bordes redondos y ligeramente hemolíticas en medios con sangre. El crecimiento en medio líquido se incrementa por agitación e incubación en atmósfera rica en bióxido de carbono.<sup>40,96</sup>

### **1.2.3. Características estructurales y antigénicas**

#### **1.2.3.1. Pared celular**

Se han identificado una gran variedad de proteínas de membrana externa (OMPs), el peso molecular de éstas se encuentra en un rango de 31 a 80 kDa. Algunas OMPs son reprimidas por hierro (pudiendo estar implicadas en la captación del grupo hemo del hospedero), otras han sido asociadas con el enlace a laminina en la mucosa y hay proteínas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en los granulocitos.<sup>45,165,177</sup>

Doig y Trust (1994), empleando anticuerpos monoclonales identificaron la presencia de 6 proteínas antigénicas (pesos moleculares de 31, 48, 50, 51, 60 y 80 kDa) en la membrana externa de *H. pylori*.<sup>38</sup>

Ureasa y HspB (un homólogo de la proteína de choque térmico GroEL de *Escherichia coli*), se encuentran en forma abundante en las preparaciones de OMPs. En los cultivos, al inicio de la fase log ureasa y HspB están localizadas estrictamente dentro del citoplasma, sin embargo al final de la fase llegan a estar asociadas con la superficie bacteriana; de una manera novedosa, éstas proteínas citoplásmicas son liberadas por autólisis bacteriana y llegan a ser adsorbidas en la superficie de bacterias intactas debido a las características únicas de la membrana externa. El análisis de *H. pylori* en biopsias gástricas humanas ha demostrado que la adsorción de la ureasa y HspB también ocurre *in vivo*. Otra proteína que se ha asociado a

la membrana externa de *H. pylori* y que en otras bacterias que también la contienen solo ha sido localizada en el citoplasma es la superóxido dismutasa.<sup>38,128</sup>

En *H. pylori* se han purificado y caracterizado cinco porinas (HopA, HopB, HopC, HopD y Hop E) con peso molecular aparente de 31-67 kDa. Las proteínas forman poros con canales simples de baja conductancia en un modelo plano de bicapa lipídica. HopE con masa molecular de 31 kDa tiene homología con la porina P2 de *Haemophilus influenzae* y es antigénica en individuos infectados.<sup>39</sup>

El lipopolisacárido (LPS) de tipo liso de *H. pylori* tiene baja actividad antigénica y varía dependiendo de la cepa. La cadena O-específica del LPS de *H. pylori* mimetiza la estructura del grupo sanguíneo de Lewis.<sup>8,174,175,180</sup>

#### 1.2.3.2. Genoma

El genoma de *H. pylori* tiene 1.6-1.73 Mb, con un promedio 1.67 Mb. La composición G+C promedio es de 35.2 mol%, con un rango de 34.1-37.5 mol%. Aproximadamente 40% de las cepas *H. pylori* aisladas contienen plásmidos de tamaño variable (1.5-23.3 Kb), pero los plásmidos no contienen factores de virulencia reconocidos.<sup>158</sup>

El genoma de *H. pylori* posee al menos dos copias de cada uno de los genes rRNA 16S y 23S. La localización variable de genes múltiples en el mapa genómico sugieren que existe un rearrreglo extenso en el genoma. Exhibe una diversidad genómica en múltiples genes incluyendo los que codifican para la ureasa estructural y proteínas como la flagelina, la toxina vacuolizante (VacA) y la proteína CagA. El examen de la variación genética por RAPD ha confirmado la diversidad genética de las cepas.<sup>2,76,158,166</sup>

## 1.2.4. Metabolismo

En las pruebas que involucran métodos de rutina, *H. pylori* no parece utilizar los carbohidratos ni oxidativa ni fermentativamente. El análisis de las rutas metabólicas en el genoma de *H. pylori* sugiere que la ruta de la glucólisis-gluconeogénesis constituye la médula espinal de producción de energía y es el punto de partida para otras rutas biosintéticas; sugiere también que la biosíntesis de la péptidoglicana, aminoácidos aromáticos, ácidos grasos y cofactores se derivan de acetil coenzima A o a partir de intermediarios de la ruta glucolítica.<sup>40,158</sup>

*H. pylori* puede metabolizar aminoácidos por la ruta fermentativa similar a como lo hacen las bacterias anaerobias. Los citocromos que intervienen en la terminación de la cadena respiratoria han sido caracterizados. El elevado nivel de CO<sub>2</sub> requerido para su crecimiento *in vitro* puede ser debido en parte a la actividad de la enzima acetil coenzima A carboxilasa.<sup>40,158</sup>

El análisis de las rutas degradativas, el sistema de captación y las rutas biosintéticas de purinas y pirimidinas sugiere que *H. pylori* usa varios sustratos como fuente de nitrógeno, incluyendo la urea, amonio, alanina, serina y glutamina.<sup>158</sup>

*H. pylori* posee gránulos de polifosfato el cual puede funcionar como una reserva de energía; en bacterias asociadas con degeneración del epitelio, cuando hay una fuente de energía exógena estos pueden estar ausentes.<sup>40</sup>

## 1.2.5. Mecanismos de patogenicidad

Los elementos patogénicos de *H. pylori* pueden ser divididos en dos grandes grupos: los factores de mantenimiento (que le permiten colonizar y permanecer en el hospedero) y los factores de virulencia (que contribuyen a los efectos patológicos sobre el hospedero), existiendo factores que pertenecen a ambos grupos (Cuadro 2).<sup>40</sup>

Cuadro 2. Factores de patogenicidad de *H. pylori*.

Factores que permiten la colonización y permanencia de <i>H. pylori</i> en el estómago del hospedero	Mecanismos por los cuales <i>H. pylori</i> altera la fisiología gástrica.
<p>Movilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Forma espiral</li> <li>- Flagelos</li> </ul> <p>Enzimas adaptativas y otras proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ureasa</li> <li>- Catalasa</li> <li>- Superóxido dismutasa</li> <li>- Proteínas de choque térmico</li> </ul> <p>Adhesinas bacterianas y receptores celulares</p> <p>Evasión de la respuesta inmune</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Resistencia a eliminación por polimorfonucleares</li> <li>- Supresión de la respuesta inmune</li> <li>- Mimetocidad molecular con los antígenos de Lewis.</li> </ul>	<p>Inducción de Inflamación gástrica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreción de IL-8</li> <li>- Adherencia de neutrófilos a células endoteliales</li> <li>- Factor activador de plaquetas (FAP)</li> <li>- Lipopolisacárido (LPS)</li> <li>- Ureasa</li> </ul> <p>Destrucción de la barrera de la mucosa gástrica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fosfolipasas (A<sub>2</sub> y C)</li> <li>- Mucinasa</li> <li>- Citotoxinas</li> <li>- Metabolitos reactivos de oxígeno</li> <li>- Inducción de la óxido nítrico sintetasa</li> <li>- Inducción de apoptosis</li> </ul> <p>Alteración de la fisiología gástrica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de la liberación de somatostatina</li> <li>- Hipergastrinemia</li> <li>- Disminución de la respuesta de las células parietales a gastrina</li> </ul>

Modificado de Dunn, *et al.* (1997)<sup>40</sup>

### 1.2.5.1. Movilidad

La movilidad es un factor esencial en la colonización de *H. pylori*, los flagelos están constituidos por dos proteínas FlaA y FlaB. Las cepas que poseen ambas flagelinas son completamente móviles, las que solo poseen FlaA son débilmente móviles y las que sólo poseen FlaB son inmóviles. La bacteria requiere las dos proteínas para poder colonizar, ya que la carencia de FlaB permite la colonización, pero hay una rápida eliminación del microorganismo y la carencia de FlaA o ambas impide la colonización del epitelio.<sup>7,44,73</sup>

### 1.2.5.2. Adhesinas bacterianas y receptores celulares

Las muestras de biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* han demostrado (por microscopía electrónica) dos tipos de interacciones bacteria-hospedero: adhesiones

mediadas por estructuras tipo-fimbria y adhesiones muy estrechas asociadas con la destrucción de la microvellosidad.<sup>88</sup>

La adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica es altamente específica. *In vivo* se han descrito varias adhesinas y otros ligandos entre los que se incluyen: una hemaglutinina que reconoce  $\alpha$ 2-3-sialil glicoconjugados (como GM<sub>3</sub>) y que tiene afinidad por la fetuina, una proteína de 59 kDa que enlaza fosfatidiletanolamina (glicerolípido aislado de células gástricas humanas) y gangliotetraosilceramido (receptor lipídico presente en la mucosa para *H. pylori* y *H. mustelae*). Se ha descrito también una estructura fimbrilar que enlaza N-acetilneuraminyllactosa y una adhesina que reconoce al grupo sanguíneo Lewis; el grupo sanguíneo Lewis esta muy asociado al grupo sanguíneo O y por tal motivo se ha relacionado con una mayor predisposición a la infección para las personas de este grupo sanguíneo.<sup>21,88,103</sup>

*In vitro* la bacteria enlaza laminina, fibronectina, colágena (tipos I, IV y V), vitronectina y heparansulfato. Basados en evidencias serológicas se cree que el polisacárido presente en la superficie de *H. pylori* puede jugar un papel relacionado con la adherencia.<sup>21,68,75</sup>

### 1.2.5.3. Enzimas adaptativas y otras proteínas

#### i) Ureasa

La ureasa nativa de *H. pylori* (540 kDa) es una metaloenzima hexamérica que requiere níquel y esta constituida por dos subunidades UreA (30 kDa) y UreB (62 kDa) en relación 1:1 molar.<sup>26,58,110,153</sup> Su baja  $K_m$  (aprox. 0.3 mM) la hace eficientemente catalítica aún a concentraciones muy bajas de urea (1.7-3.4mM). Para su actividad óptima requiere de una proteína fijadora de níquel (NixA). La producción de ureasa permite a *H. pylori* resistir las condiciones ácidas del estómago, y es tan importante, que se han construido mutantes ureasa negativas incapaces de colonizar el estómago de animales de experimentación.<sup>6,42,124,151,162</sup> Además la ureasa es un estímulo potente de la activación de fagocitos mononucleares y de la producción de citocinas inflamatorias.<sup>40,41</sup>

La urea secretada por las células del epitelio gástrico sirve como factor quimiotáctico para *H. pylori*, de esta manera se mueve mejor a través del ambiente viscoso, además el amonio producido por la degradación de la urea es tóxico para las células y causa daño del epitelio.<sup>108,113</sup>

## ii) Mucinasas

*H. pylori* coloniza la capa mucosa que esta constituida principalmente por mucina, proteína altamente glucosilada que cubre y protege la superficie del epitelio gástrico. Además de tener receptores para la mucina, *H. pylori* posee un gen que es muy similar al gen de la mucinasa de *Vibrio cholerae*, la actividad de mucinasa es expresada *in vivo*.<sup>40</sup>

## iii) Catalasa y superóxido dismutasa

La catalasa producida por *H. pylori* protege a la bacteria contra el efecto de los metabolitos reactivos de oxígeno formados en los neutrófilos como resultado del estallido oxidativo. Los genes que codifican para la catalasa y superoxidodismutasa muestran homología con los genes contenidos por microorganismos patógenos intracelulares, sugiriendo un papel importante en la resistencia a muerte por las células polimorfonucleares. Estas dos enzimas están asociadas también con la presencia de células viables.<sup>64,128</sup>

## iv) Proteínas homólogas a proteínas de choque térmico

HspB (homólogo de la proteína de choque térmico GroEL de *E. coli*) ha sido identificado en *H. pylori*. El gen *hspB* forma parte de un gen bicistrónico (*hspB-hspA*).<sup>41,128</sup>

### 1.2.5.4. Evasión de la respuesta inmune

Durante una infección con *H. pylori*, parte de las bacterias penetran la capa mucosa y atacan directamente a las células epiteliales. Esto despierta una respuesta inmune activa tanto local como sistémica. La colonización de *H. pylori* puede persistir por años e inclusive de por vida en personas no tratadas.<sup>96</sup> *H. pylori* exhibe resistencia parcial a la muerte por fagocitos quizá debido al daño a las membranas fagosomales por productos de amonio.<sup>40</sup>



En varias cepas de *H. pylori* se ha detectado la expresión de antígenos de Lewis ( $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $Le^x$  y  $Le^y$ ) como parte de las cadenas del LPS, siendo mucho más común el determinante  $Le^x$  y  $Le^y$ , mismo que se presenta en las células de la mucosa gástrica. La expresión de antígenos de Lewis puede crear mimetismo de la bacteria con los antígenos de la mucosa y de esta manera evadir al sistema inmune. En general las cepas  $CagA^+$  muestran niveles más altos de Le que las  $CagA^-$ .<sup>8,21,164,175</sup>

Los anticuerpos producidos en respuesta a la infección con *H. pylori* exhiben reactividad cruzada contra células de la mucosa gástrica; aunque la antigenicidad del LPS de *H. pylori* es baja, por su homología con los antígenos de Lewis puede despertar una respuesta autoinmune que dañe las células parietales, sugiriendo que la autoinmunidad puede jugar un papel importante en el desarrollo de gastritis y úlcera.<sup>88</sup>

#### 1.2.5.5. Inducción de inflamación gástrica

*In vitro*, se han descrito una gran variedad de mediadores de la inflamación inducidos por *H. pylori*. Estos están fuertemente relacionados con la patogénesis de la gastritis observada en los estudios histológicos. Los agentes que han sido incriminados como mediadores de la inflamación incluyen: inducción de IL-8, el factor activador de plaquetas, leucotrieno  $B_4$  y fosfolipasa  $A_2$ .<sup>88,123</sup>

##### i) Interleucina-8

*In vitro*, se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de inducir la secreción de IL-8 en células de carcinoma gástrico, y puesto que extractos de membrana no lo hacen, se sugiere que se requiere de la bacteria completa y su contacto directo con las células endoteliales para la inducción de IL-8 *in vivo*. Se ha observado que en los pacientes infectados con *H. pylori*, la normalización en los niveles de IL-8 ocurre un mes después de la terapia de erradicación y que las cepas silvestres  $CagA^+$  y  $VacA^+$  produjeron significativamente más IL-8 que las cepas  $CagA^-$  y  $VacA^-$ .<sup>1,5,67,136</sup>

## ii) Adherencia de Neutrófilos

Se ha identificado una proteína de 150 kDa que incrementa la expresión de CD11a/CD18 y CD11b/CD18 en los neutrófilos e incrementa la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales. La proteína designada como "HP-NAP", es un polímero de 10 subunidades idénticas.<sup>40,123</sup>

## iii) Factor activador de plaquetas (PAF)

Es un fosfolípido mediador reconocido como potente agente ulcerogénico. Lyso-PAF es producido por las células de la mucosa gástrica bajo condiciones basales y en respuesta a gastrina en personas sanas. PAF estimula la secreción de ácido gástrico vía receptores celulares parietales específicos. *H. pylori* puede metabolizar el precursor no ulcerogénico Lyso-PAF en PAF y a través de esto inducir directamente daño en la mucosa o indirectamente vía incremento de la secreción ácida.<sup>40</sup>

### 1.2.5.6. Destrucción de la barrera de la mucosa gástrica

#### i) Fosfolipasas

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> y C, destruyen la capa fosfolipídica de las células de la membrana apical. La fosfolipasa A<sub>2</sub> convierte los lípidos de membrana en ácido araquidónico, el cual puede ser posteriormente convertido en leucotrienos, prostaglandinas o tromboxanos; éstos últimos compuestos son agentes quimiotácticos y pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular. La fosfolipasa A puede generar también a partir de los fosfolípidos, un metabolito citotóxico, la lisolecitina, que es capaz de causar daño sobre los tejidos y es precursor del factor activador de plaquetas.<sup>64</sup>

#### ii) Citotóxicas (VacA y CagA)

##### VacA

Aproximadamente 50% de las cepas de *H. pylori* producen una toxina vacuolizante (VacA) que induce vacuolas ácidas en el citoplasma de las células eucarióticas. Esta toxina de aproximadamente 87 kDa, es antigénica y se han detectado anticuerpos neutralizantes en los

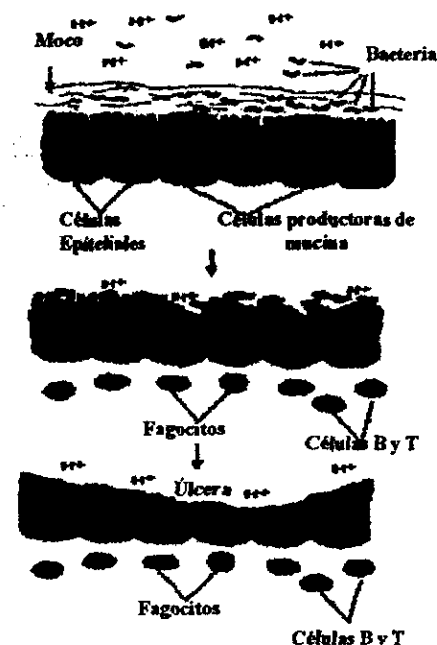
individuos infectados. Esencialmente todas las cepas de *H. pylori* llevan el gen *vacA*, aunque no todas lo expresan. El gen *vacA* posee tanto secuencias conservadas como secuencias variables y ha sido dividido en dos regiones principales la *s* (que codifica la secuencia señal) y la *m* (que codifica la región media). Existen 3 tipos de alelos *s* (*s1a*, *s1b*, y *s2*) y dos tipos *m* (*m1* y *m2*) estos alelos forman un total de 6 combinaciones que han sido identificadas en las cepas silvestres. Interesantemente las cepas *s1/m1* producen niveles más altos de citotoxina seguidas de las *s1/m2*, las cepas *s2/m2* producen muy poca o no la producen. Las cepas *s1a* están asociadas a inflamación gástrica, mientras que las *m1*, independientemente del tipo *s* al que pertenezcan están más asociadas a daño del epitelio gástrico, estas cepas pueden ser identificadas solamente por métodos como el PCR o hibridación de colonias.<sup>10,18,31,44,53,70,100</sup>

VacA puede causar vacuolación por alterar el transporte de solutos a través de la membrana. Las membranas de las vacuolas inducidas por VacA contienen la proteína Rab7 (marcador endosomal) que enlaza GTP y la glicoproteína Lap110 (marcador lisosomal) lo que indica que las vacuolas representan un compartimiento híbrido postendosomal.<sup>10,18,31,43,53,100</sup>

### CagA

Aproximadamente 60% de las cepas de *H. pylori* poseen el gen *cagA*, aunque esta proporción varía entre las poblaciones. Este gen es un marcador de la región *cag*, una isla de patogenicidad de 35 Kb compuesta de aproximadamente 20 genes. El gen *cagA* produce una proteína de 128 kDa que es altamente inmunogénica y al parecer se expresa en función de las condiciones de pH del medio. En la actualidad se sabe que las cepas CagA<sup>+</sup> tienen mayor densidad bacteriana en el antro, son más patógenas e incrementan el riesgo a desarrollar úlcera duodenal y adenocarcinoma comparadas con las cepas CagA<sup>-</sup>.<sup>18,30,54,77,135,163</sup>

La Fig. 3 representa los pasos hipotéticos de la formación de úlcera por infección por *H. pylori*.



A) *H. pylori* pasa al estómago (flagelos, ureasa)

B) *H. pylori* coloniza la mucosa, puede adherirse a varias células de la mucosa (varias adhesinas)

C) Inflamación, destrucción de células del hospedero (LPS, Ureasa, Vac A, Hsp)

D) Destrucción progresiva de la mucosa; formación de úlcera (respuesta inflamatoria, Vac A?)

Figura 3. Pasos hipotéticos de la formación de úlcera después de la infección por *H. pylori*. La bacteria utiliza la ureasa para protegerse del pH ácido durante su tránsito a través de la capa de mucina. Coloniza la capa de mucina y puede adherirse a la mucosa gástrica. Los productos de la bacteria provocan una respuesta inflamatoria que daña la capa mucosa. Los factores de virulencia que parecen estar implicados en cada paso se indican entre paréntesis. Modificado de Salyers, *et al.* (1994)<sup>146</sup>

### iii) Metabolitos reactivos de oxígeno

*H. pylori* estimula la producción de radicales libres de oxígeno tanto *in vivo* como *in vitro*. El nivel de 9-hidroxiexiguanosina, un marcador del daño que los radicales libres causan sobre el DNA esta incrementado en los individuos infectados con *H. pylori*.<sup>40</sup>

### iv) Inducción de la oxido nítrico sintetasa (iNOS)

*In vitro*, *H. pylori* induce iNOS en los macrófagos. La erradicación de *H. pylori* reduce iNOS en las células del epitelio gástrico, sugiriendo que el microorganismo puede inducir la actividad de la enzima *in vivo*.<sup>40</sup>

#### v) Inducción de apoptosis

*H. pylori* parece inducir apoptosis en las células del epitelio gástrico y estimular el daño oxidativo hacia el DNA en la mucosa gástrica infectada, también parece inhibir la migración y proliferación de las células del epitelio gástrico.<sup>170</sup>

#### vi) LPS

Aunque la inmunogenicidad del LPS de *H. pylori* es baja, parece inhibir la glicosilación y sulfatación del moco dando como resultado un cambio significativo en la conformación macromolecular de la mucina, esto sugiere que la función protectora del moco se vuelva vulnerable a la acidez gástrica.<sup>88</sup>

#### vii) Alcohol deshidrogenasa

*H. pylori* produce alcohol deshidrogenasa y puede metabolizar el etanol en acetaldehído, un metabolito altamente tóxico. Esto tiene particular interés en las personas alcohólicas, ya que la alcohol deshidrogenasa es capaz de producir acetaldehído a concentraciones muy bajas de etanol (0.1%). El acetaldehído producido por *H. pylori* genera la peroxidación de lípidos y puede ser un factor de riesgo a daño gástrico, úlcera péptica y cáncer.<sup>64,139</sup>

#### 1.2.5.7. Alteración de la fisiología gástrica

Durante una infección con *H. pylori*, el amonio liberado por hidrólisis de la urea incrementa el pH y disminuye la secreción de somatostatina además, *H. pylori* posee N-histamina metiltransferasa, enzima que transforma la histamina en N-metilhistamina un potente estimulador de la secreción gástrica que inhibe la liberación de somatostatina. La somatostatina es un inhibidor de la producción de gastrina, por tanto al disminuir la somatostatina, se produce hipergastrinemia y una disminución de la respuesta de las células parietales a gastrina; por otro lado se cree que VacA interactúa con la ATPasa (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) alterando la secreción de gastrina.<sup>88,123</sup>

### 1.3 IMPORTANCIA MEDICA

Los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollan inflamación gástrica crónica; sin embargo, esta condición es usualmente asintomática y no es una enfermedad *per se*.<sup>57,86</sup>

*H. pylori* ha sido asociado con dispepsia no ulcerosa, gastritis crónica y en más del 90% de los casos de úlcera gástrica y duodenal; al grado que el tratamiento para la erradicación de *H. pylori* permite la cura de las úlceras.<sup>49,93,123,169</sup>

*H. pylori* esta fuertemente relacionado con el riesgo a desarrollar gastritis atrófica precursora del cáncer gástrico, este último estimado como el segundo más común en el mundo (aunque la incidencia puede cambiar dramáticamente de lugar a lugar y de una generación a otra). Se ha postulado que el riesgo a desarrollar cáncer se incrementa con el tipo de dieta y la adquisición de la infección a edad temprana. La asociación de *H. pylori* con cáncer ha sido tan fuerte que en 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la Organización Mundial de la Salud lo declararon un carcinógeno potencial para los humanos.<sup>55,59,61,115,120,154</sup> Recientemente se le ha asociado también como agente causal de linfoma gástrico (MALToma).<sup>19,36,176</sup>

La infección en niños tiene un patrón clínico diferente al de los adultos y aunque aún existen controversias, el dolor abdominal recurrente parece ser el principal síntoma. La infección con *H. pylori* ha sido asociada en un 92% de los niños con úlcera duodenal y 25% de los niños con úlcera gástrica. Por otro lado se ha sugerido que la infección con *H. pylori* en niños, puede estar relacionada con la presencia de otras enfermedades tales como: retardo del crecimiento, cardiopatía coronaria, diabetes mellitus, urticaria recurrente, enfermedad autoinmune tiroidea, púrpura de Henoch-Schonlen, síndrome de Sjogren, fenómeno de Raynaud, así como a alopecia y anemia perniciosa, así como en el retardo del crecimiento. Aunque no existen evidencias suficientes que confirmen éstas suposiciones.<sup>12,20,25,66,97,131,144</sup>

### **1.3.1. Histopatología de la infección por *H. pylori***

*H. pylori* esta asociado con gastritis crónica superficial, este patrón esta caracterizado por células inflamatorias mononucleares infiltración de neutrófilos al epitelio y cambios no específicos asociados con metaplasia, granuloma o atrofia de la glándula. La inflamación puede ser variable desde infiltración leve sin afectar la arquitectura glandular hasta inflamación severa con microabscesos severos. La respuesta inflamatoria se manifiesta histológicamente como gastritis crónica superficial. Las células de superficie epitelial sufren cambios degenerativos incluyendo disminución de la producción de mucina, vacuolización citoplásmica y desorganización de las glándulas de la mucosa.<sup>31,40,88</sup>

La respuesta inflamatoria a *H. pylori* en niños difiere de la respuesta en adultos. La endoscopia puede revelar una superficie granular fina o nodular, que microscópicamente corresponde a hiperplasia linfonodular, especialmente en la zona del antro. Tales agregados linfoides pueden contener centros germinales activados. Además la cantidad de neutrófilos en la lesión puede ser menor que en los adultos y pueden encontrarse células inflamatorias plasmáticas, linfocitos y polimorfonucleares. A diferencia del adulto, la inflamación es superficial.<sup>40,131</sup>

## **1A. TRANSMISION**

Se ha establecido que el humano es el único hospedero y reservorio de *H. pylori*, por ello se ha sugerido la transmisión del microorganismo persona a persona; sin embargo, no se sabe cómo es que el *H. pylori* viaja del estómago de una persona a otra, no ha sido posible establecer la o las rutas de transmisión. Las rutas propuestas son cinco: la fecal-oral, la oral-oral, la gastro-oral, la iatrogénica y la transmisión a través de vectores; siendo las dos primeras las más aceptadas.<sup>11,178</sup>

#### **1.4.1. Transmisión fecal-oral**

Estudios epidemiológicos sugieren que la vía fecal-oral es la ruta más probable de transmisión y que es análoga a la transmisión de la hepatitis A. *H. pylori* ha sido aislado de heces y se ha demostrado su presencia por medio de PCR, aunque esto no es común, indicando que la eliminación bacteriana podría ser intermitente. Kelly, *et al.* (1994) reportaron por primera vez el aislamiento de *H. pylori* a partir de heces en un país desarrollado; dicho hallazgo implica que la transmisión de la infección por *H. pylori* es factible a través de la vía fecal-oral. Lo anterior está apoyado por la sectorización de las infecciones dentro de las familias y los hospitales. Se ha sugerido también el consumo de agua contaminada con materia fecal como fuente de transmisión.<sup>11,51,80,94,118,156</sup>

#### **1.4.2. Transmisión oral-oral**

La transmisión oral-oral ha sido identificada en el caso de mujeres africanas quienes premastican los alimentos que dan a sus hijos. Se ha intentado el aislamiento a partir de saliva, pero no se ha logrado.<sup>11</sup>

#### **1.4.3. Transmisión gastro-oral**

Es un tipo de transmisión que se ha postulado sobre todo en niños, considerando el vómito como ruta posible, sobre todo cuando el vómito tiene contacto con las manos ya sea del niño o de la madre y no se tiene el cuidado de lavárselas, el llevárselas nuevamente a la boca puede ser una vía de transmisión.<sup>11</sup>

#### **1.4.4. Transmisión iatrogénica**

Se considera el tipo de transmisión menos común y se atribuye al uso de endoscopios, tubos, sondas y algunos otros instrumentos (mal lavados) que han estado en contacto con la mucosa gástrica de una persona y son introducidos en otra. La ruta iatrogénica es importante sobre todo en lugares en donde se tiene mucha demanda de atención clínica y muchos pacientes son examinados en un periodo muy corto de tiempo usando el mismo endoscopio y el lavado del material se realiza por métodos manuales.<sup>11,178</sup> Esta ruta es también importante en los endoscopistas, en particular en aquel personal que no usa guantes



durante los procedimientos y por tanto tienen mayor riesgo de ser infectados, ya que se ha reportado la adquisición de *H. pylori* como infección ocupacional.<sup>40</sup>

#### 1.4.5. Transmisión a través de vectores

Se ha reportado el aislamiento de *H. pylori* a partir de gatos, sugiriendo a éstos como posibles transmisores de la infección. También se ha reportado el aislamiento de microorganismos parecidos a *H. pylori* de moscas domésticas, sugiriendo a este organismo como otro posible vector, sin embargo ésta última posibilidad ha sido poco aceptada.<sup>60,62,63,84,114</sup>

### 1.5. DISTRIBUCION, INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *H. Pylori*

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por *H. pylori* se presenta en todo el mundo, pero existen diferencias entre las características epidemiológicas en los países en desarrollo comparados con los países desarrollados. En los primeros la población que presenta colonización por *H. pylori* alcanza niveles de 70-90%, en cambio en los países desarrollados la prevalencia de la infección es más baja (25-50%). Mientras que en los países desarrollados solo una minoría de los niños son infectados con *H. pylori*, en los países en desarrollo, la infección se caracteriza por una alta prevalencia durante la niñez (Fig. 4).<sup>12,48,85</sup>

No obstante que las técnicas de referencia para diagnosticar infección por *H. pylori* son el aislamiento del microorganismo o el examen histológico, éstos métodos no son practicables en algunos de los países en vías de desarrollo, por tal motivo la mayoría de los estudios epidemiológicos se han realizado teniendo como evidencia de la infección las pruebas serológicas (Cuadro 3).<sup>13</sup>

La mayoría de los estudios sugieren que hombres y mujeres son infectados en la misma proporción y que el nivel socioeconómico tiene cierta influencia en la adquisición de la infección, ya que los países con menor desarrollo socioeconómico tienen mayor incidencia.<sup>13,55,85,120</sup>

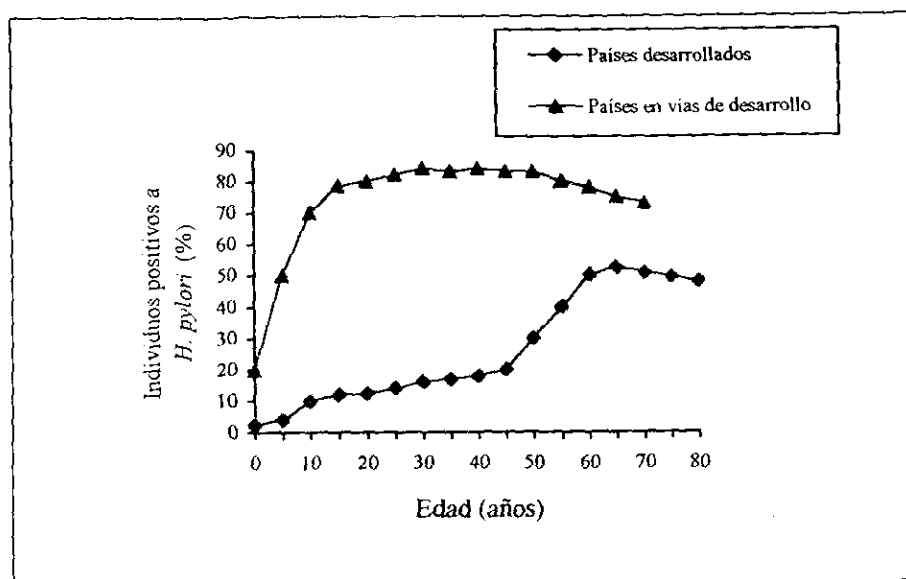


Figura 4. Prevalencia de la infección por *H. pylori* de acuerdo a los datos de 14 países desarrollados y 15 países en vías de desarrollo. Tomado de Bardhan (1997).<sup>13</sup>

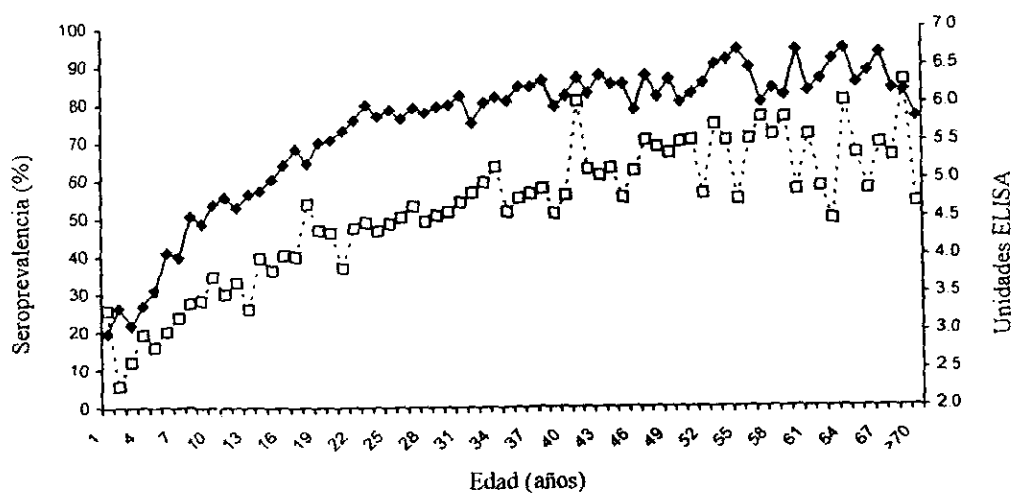


Figura 5. Seroprevalencia (♦) y Magnitud (□) por edad, de la respuesta de IgG anti-*H. pylori* en 11,605 sujetos mexicanos (5,608 con edad entre 1-19 años). Tomado de Torres, *et al.* (1998).<sup>159</sup>

Cuadro 3. Prevalencia de la infección con *H. pylori* en países en vías de desarrollo.

País	Edad de la población estudiada (No. de sujetos)	Método de diagnóstico	Prevalencia (%)
<b>Africa</b>			
Argelia	5 - 65 años (277)	Serología	43 - 92
Gambia	5 - 36 meses (353)	Serología	15 - 46
Costa Ivory	5 - 60 años (377)	Serología	54 - 80
Kenya	Adultos (14)	Histología	94
Nigeria	1 - 60 años (311)	Serología	69 - 91
Sur África	2 meses - 87 años (1,352)	Serología	50 - 94
Zaire	5 - 45 años (133)	<sup>14</sup> C- PDA	77.4
<b>Asia</b>			
Bangladesh	1 mes - 35 años (180)	<sup>13</sup> C- PDA, Histología	42 - 85
China	1 - 50 años (1,727)	Serología	38.6 - 52.4
India	3 - 81 años (435)	Serología, Histología	60 - 81
Irán	35 - 55 años (947)	Serología	88.4 - 93
Jordania	17 - 86 años (169)	Histología, Cultivo	64
Kuwait	9 meses - 13 años (18)	Histología, Cultivo	27
Nueva Guinea	5 - 50 años (157)	Serología	36 - 75
Arabia Saudita	5 - 91 años (577)	Serología	40 - 70
Corea del Sur	1 - 75 años (413)	Serología	22 - 75
Taiwan	< 10 - 70 años (823)	Serología	54.4
Tailandia	1 - 60 años (1,788)	Serología	74
Vietnam	5 - 60 años (377)	Serología	13 - 80
<b>América Latina</b>			
Brasil	1 mes - 45 años (629)	Serología	16.4 - 64.3
Chile	4 meses - 35 años (2,203)	Serología	5 - 70
Colombia	2 - 9 años (742)	Serología	54 - 68
Costa Rica	Niños y adolescentes (290)	Serología	68
Perú	2 meses - 70 años (1,632)	<sup>13</sup> C- PDA, Serología	3 - 92

PDA = Prueba de aliento. Tomado de Bardhan (1997).<sup>13</sup>

En los países desarrollados, la incidencia extrapolada a partir de los datos de prevalencia se ha estimado en 0.5-1.0% por año. En los países en desarrollo la incidencia parece ser mayor, variando en un rango de 5-13.5% por año.<sup>13,120</sup>

En México, se han encontrado anticuerpos contra *H. pylori* en más del 20% de los niños menores de 4 años.<sup>131,137,159</sup> La frecuencia de este hallazgo se incrementa en forma gradual, alcanzando 70-80% de los 25-40 años, 80-90% de los 40-70 años y a partir de esta edad la respuesta disminuye (Fig. 5).<sup>159</sup>

## 1.6. DIAGNOSTICO

Las pruebas para diagnosticar infección por *H. pylori*, se dividen básicamente en dos grupos: i) Las pruebas que requieren de una biopsia de mucosa gástrica, la cual es tomada por endoscopia y por eso son llamados métodos invasivos y ii) Las pruebas que no requieren de biopsia gástrica y que se pueden realizar en otro material biológico (suero, saliva o aliento) y son conocidos como métodos no invasivos (Cuadro 4).<sup>40</sup>

**Cuadro 4.** Métodos de diagnóstico para detectar infección por *H. pylori*.

Métodos invasivos	Métodos no invasivos
- Estudio histológico	- Detección de anticuerpos
- Cultivo	ELISA
- Ureasa rápida	- Pruebas de aliento
- PCR	Urea- <sup>13</sup> C
	Urea- <sup>14</sup> C

### 1.6.1. Métodos que requieren endoscopia (Invasivos)

La demostración directa de *H. pylori* en especímenes de biopsia de pacientes dispépticos es posible a través del cultivo, análisis histológico y ensayos para demostrar la actividad de ureasa rápida. Recientemente se han desarrollado ensayos para la detección de la infección por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).<sup>40,96</sup>

La endoscopia, no obstante ser un procedimiento relativamente caro y molesto para el paciente, es el único método (hasta ahora conocido) mediante el cual se puede ver directamente la mucosa gástrica y tomar muestras de biopsia para cultivo y estudio histológico (considerados por como "estándar de oro" en el diagnóstico de infección por *H. pylori*) con lo que se proporciona un diagnóstico más completo.

Hay dos condiciones que son observables directamente por el endoscopista y que están directamente relacionadas con la infección por *H. pylori* estas son: la nodularidad antral y úlcera duodenal no complicada. Al realizar la endoscopia, debe cuidarse el hacer bien la toma de muestra ya que si no se realiza adecuadamente puede dar un resultado falso negativo, dado que la infección se distribuye en parches. Se recomienda tomar un mínimo de dos biopsias a 5 cm del píloro.<sup>32,40</sup>

#### 1.6.1.1. Estudio histológico

Las biopsias gástricas tomadas por endoscopia, se fijan en formalina se procesan rutinariamente y se tiñen. La tinción de hematoxilina-eosina puede servir para identificar los bacilos, las bacterias son localizadas en el moco adherente sobre la superficie del epitelio y están localizadas dentro de las criptas. La identificación hitológica de la bacteria puede ser mejorada por el uso de tinciones especiales como Warthin-Starry y Giemsa modificada. La correcta identificación de *H. pylori* por histología depende de varios factores, como son: la densidad bacteriana, el tipo de tinción usada y la experiencia de la persona que realice el estudio. La presencia de infiltrado inflamatorio activo es muy sugestiva de la presencia de *H. pylori*. La histología puede revelar también la presencia de alteraciones premalignas tales como metaplasia intestinal o displasia de la mucosa gástrica.<sup>40,96,105,134</sup>

#### 1.6.1.2. Cultivo

El cultivo representa dos ventajas principales: i) sirve para evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos y ii) los aislamientos realizados a partir del cultivo pueden ser bien caracterizados. No obstante que no tenga una alta sensibilidad, el cultivo es la mejor manera de demostrar que la infección esta presente. Se ha reportado que el cultivo puede ser realizado tanto a partir de biopsias como de heces y jugo gástrico, aunque los dos últimos no han sido muy reproducibles.<sup>80,96,105,117</sup>

Para el transporte de biopsias en tiempos menores a las 6 horas se ha recomendado el uso de solución salina como único medio, aunque también se puede usar medio de transporte de Stuart o caldo brucella suplementado con sangre o suero de caballo. Medios suplementados con glicerol, suero o sangre de caballo han sido empleados para el almacenamiento por tiempos prolongados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .<sup>9,96,141</sup>

Una gran variedad de medios selectivos y no selectivos se encuentran disponibles para el cultivo de *H. pylori* (Cuadro 5). El primoaislamiento se recomienda realizarlo en medio suplementado con sangre de caballo al 10% y antibióticos tales como el suplemento de Skirrow (vancomicina 10 mg/l, polimixina 0.25 mg/l y trimetropim 5 mg/l). Cuando las biopsias son sembradas en medio fresco e incubadas por 3-7 días bajo condiciones microaerofílicas, alta humedad y a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , *H. pylori* crece como colonias translúcidas de 0.5-1 mm de diámetro, lisas con bordes redondos y ligeramente hemolíticas.<sup>96,129</sup>

*H. pylori* presenta un perfil enzimático que ayuda a su identificación, encontrando a la ureasa como la propiedad enzimática característica por la gran actividad hidrolítica que presenta comparada con la de otros microorganismos. La catalasa y oxidasa, son también importantes para su identificación, así como la sensibilidad a cefalotina y resistencia a ácido nalidíxico.<sup>96,110,117</sup> (Cuadro 6).

### 1.6.1.3. Ureasa rápida

La capacidad de *H. pylori* para producir ureasa ha sido empleada también para diagnosticar la infección. El CLOtest (Delta West Ltd., Bentley, Australia) desarrollado por Marshall, fue el primer equipo comercial disponible para la identificación específica de *H. pylori* mediante la ureasa. Este consistía de agar conteniendo rojo de fenol y urea; en presencia de la ureasa, la urea es hidrolizada produciendo amonio (Fig. 6), esto provoca un incremento de pH y por tanto un cambio del indicador de amarillo a rojo. La prueba es interpretada a la hora y hasta por 24 h después de introducida la biopsia en el gel. A raíz de esto se han

Cuadro 5. Medios útiles para el cultivo de *H. pylori*.

Medios sólidos con sangre de caballo al 10%	Medios líquidos con suero de caballo al 10%	Medios sólidos sin sangre de caballo
Agar Brucella	Caldo BHI	Agar Columbia
Agar Mueller-Hinton	Caldo Mueller-Hinton	Hemina
Agar Skirrow	Caldo Brucella	Rojo fenol
Agar Columbia	Caldo soya-tripticasa	Isovitalex
Agar Campylobacter		Urea
Agar chocolate		Agar Columbia
Agar base CG		Carbón activado
Agar Casman		Piruvato de sodio
		Hemina

Tomado de Luqueño, et al. (1994).<sup>96</sup>Cuadro 6. Pruebas bioquímicas que diferencian al género *Helicobacter* de otros géneros afines.

Prueba bioquímica	<i>Campylobacter jejuni</i> NTCC11341	<i>Helicobacter pylori</i> NCTC11637	<i>Helicobacter mustelae</i> NCTC12032	<i>Wollinella succinogenes</i> NCTC11488	<i>Helicobacter rappini</i> NCTC1893
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+
Ureasa	-	+	+	-	+
Hidrólisis de hipurato	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	-	+	+	-
Fosfatasa alcalina	d	+	+	-	-
$\delta$ -glutamil transpeptidasa	-	+	+	-	+
Crecimiento microaerofílico					
25°C	- (2 días)	- (4 días)	- (4 días)	- (2 días)	- (2 días)
30°C	+ (1 día)	+ (2 días)	+ (2 días)	- (2 días)	- (2 días)
37°C	+ (1 día)	+ (2 días)	+ (1 día)	+ (1 día)	+ (1 día)
42°C	+ (1 día)	- (4 días)	+ (2 días)	d (2 días)	+ (1 día)
Crecimiento en glicina 0.5%	+	+	+	-	+
Susceptibilidad a :					
ác. nalidixico	sensible	resistente	sensible	resistente	resistente
cefalotina	resistente	sensible	resistente	resistente	resistente
metronidazol	resistente	sensible	sensible	sensible	resistente

Tomado de Luqueño, et al. (1994).<sup>96</sup>

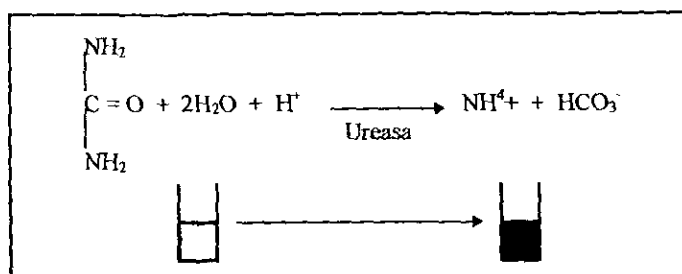


Figura 6. Principio de la prueba de ureasa rápida. Tomado de Misewicz, *et al.* (1995).<sup>105</sup>

diseñado otros equipos para diagnóstico, en los cuales lo único que han variado es el tipo de indicador usado.<sup>40,96,105</sup>

Aunque la prueba de ureasa tiene alta sensibilidad en adultos en niños falsos negativos son comunes, probablemente debido a la baja densidad bacteriana.

#### 1.6.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se han diseñado varios modelos para la identificación de *H. pylori* por PCR, estos métodos han sido muy variados y altamente sensibles. No obstante la PCR es una técnica muy sensible, hay varios factores que hay que tomar en cuenta para obtener buenos resultados, estos son: la selección y el uso de iniciadores y el DNA blanco adecuados, la preparación del espécimen, densidad bacteriana y el procedimiento para realizar la PCR. Se han reportado técnicas de PCR aplicables tanto a biopsias y placa dentobacteriana, como a heces, con un 100% de sensibilidad y especificidad para la detección de *H. pylori*. Algunos autores no obstante han reportado ensayos de PCR que han sido menos efectivos que la tinción inmunohistológica de la bacteria, la posibilidad de obtener falsos negativos con la PCR también ha sido contemplada. Las técnicas de PCR más que emplearse para diagnóstico han sido empleadas para la diferenciación genética entre las cepas de *H. pylori* y estudios epidemiológicos.<sup>24,35,76,90,116,126</sup>



Las cepas de *H. pylori* son altamente diversas a nivel genético, comparado con otros 13 patógenos importantes para los humanos, así como con algunos microorganismos comensales, las cepas de *H. pylori* mostraron ser las más diversas del grupo. La diversidad es una de las características fundamentales de *H. pylori* y refleja mutaciones puntuales, rearrreglos genómicos, genes no conservados, movilidad del DNA incluyendo secuencias de inserción y plásmidos. Además se ha descrito la coinfección de cepas CagA<sup>+</sup> con cepas CagA<sup>-</sup>. La diversidad genética y la presencia de *cagA* se pueden identificar por PCR, RT-PCR o hibridación de las colonias con una sonda específica.<sup>70,90</sup>

## **1.6.2. Métodos que no requieren endoscopia (No invasivos)**

La determinación de anticuerpos anti-*H. pylori* por ELISA y las pruebas de aliento han sido las técnicas empleadas más empleadas, dentro de las pruebas no invasivas.

En niños se ha enfatizado el uso de métodos no invasivos, pero un diagnóstico claro alternativo al cultivo o estudio histológico aún no ha sido propuesto.<sup>24,33, 37,74,131,142,144</sup>

### **1.6.2.1. Detección de anticuerpos**

La infección con *H. pylori* despierta una respuesta inmune tanto local como sistémica, elevando los niveles de anticuerpos séricos IgG e IgA específicos y elevación de IgA secretoria e IgM en el estómago. Los métodos serológicos han sido muy importantes para el tamizado de infecciones por *H. pylori*. Aunque se han descrito una variedad de pruebas serológicas, las más difundidas son los ensayos de ELISA.<sup>3,101,106,132,152</sup>

La utilidad de las pruebas serológicas dependen del tipo de antígeno empleado, en general se han utilizado tres tipos de antígeno: antígeno crudo (células sonicadas), fracciones celulares (extractos con glicina), antígenos termoestables y antígenos "enriquecidos" como la ureasa.

La sensibilidad y especificidad de estas pruebas ha sido reportada de alrededor de 95%.<sup>33,122,150</sup>

La detección de la infección con cepas CagA<sup>+</sup> llega a ser clínicamente relevante, para ello se pueden usar una variedad de técnicas, dentro de las cuales la determinación anticuerpos contra el antígeno CagA recombinante ha sido muy empleada.<sup>22,106,107,122</sup>

En ausencia de tratamiento, los niveles de anticuerpos se mantienen elevados por tiempos prolongados. Una vez que la infección ha sido erradicada los niveles de anticuerpos tienden a disminuir a aproximadamente la mitad, seis meses después de la erradicación. Una ventaja de las pruebas serológicas es que estas pueden ser positivas en caso de atrofia gástrica, en la cual el número de microorganismos puede ser tan bajo que no sea detectable en la biopsia o por pruebas de aliento.<sup>82,125</sup>

Una limitante de las pruebas serológicas es que son sensibles y específicas sólo para las poblaciones en las cuales fueron ensayadas y no pueden ser igualmente sensibles cuando se aplican a poblaciones de diferentes países o personas de diferente grupo étnico. Además el valor de corte para distinguir pacientes *H. pylori* positivos de *H. pylori* negativos puede ser diferente entre niños y adultos, esto es debido a la variabilidad de la respuesta inmune de los niños con respecto a la de los adultos. Otra limitante de las pruebas serológicas en niños es el factor nutricional, que va a influir en la respuesta inmune que monte el paciente.<sup>22,73</sup>

#### 1.6.2.2. Pruebas de aliento

El principio para las pruebas de aliento es similar al de la prueba de ureasa rápida. En estas pruebas la urea marcada con <sup>14</sup>C o <sup>13</sup>C es administrada vía oral como sustrato. La prueba implica la recolección de una muestra de aliento antes y otra 30 minutos después de beber la solución con isótopos. Si *H. pylori* esta presente, la urea es degradada en amonio y <sup>13/14</sup>CO<sub>2</sub> marcado, éste último es exhalado por el paciente y colectado. El isótopo <sup>14</sup>C es detectado en un contador de centelleo mientras que el <sup>13</sup>C es detectado por espectrometría de masas. Las

dosis de  $^{14}\text{C}$  aprobadas por la FDA son muy bajas ( $1\mu\text{Ci}$ ), lo que equivale a menos de un día de radiación solar.<sup>40,65,105</sup>

El  $^{13}\text{C}$  tiene la ventaja de que puede emplearse en niños y mujeres embarazadas, cosa que no sucede con el  $^{14}\text{C}$ . Esta prueba ofrece la ventaja de que puede llevarse a cabo en niños asintomáticos, en los que no es ético realizar endoscopia para confirmar el diagnóstico e incluso algunos autores la han propuesto como estándar de oro.<sup>24,37,142</sup>

Entre los factores que pueden afectar las pruebas de aliento se encuentran: la presencia de otras bacterias ureasa productoras de ureasa en la boca o el estómago de los pacientes, y el tránsito rápido a través del estómago.<sup>24,144</sup>

Hasta ahora las pruebas de aliento específicamente la que emplea  $^{13}\text{C}$  esta disponible en pocos lugares, ésta prueba ha tenido buenos resultados para evaluar la terapia de erradicación sobre todo en la población pediátrica.<sup>34,66,72</sup>

No obstante las pruebas de aliento representan la ventaja de no ser traumáticas éstas no pueden reemplazar la endoscopia, ya que mediante las pruebas de aliento se detecta la presencia de la bacteria, pero no se distingue entre los pacientes que tienen gastritis o úlcera de los que no la tienen y tampoco distingue si la infección es causada por cepas patógenas.

### 1.6.2.3. Otros ensayos

Para el diagnóstico de *H. pylori* se han empleado también la determinación de bicarbonato marcado con  $^{14}\text{C}$  en suero, después de la administración de urea marcada. Así mismo se ha administrado urea marcada con  $^{15}\text{N}$  y se ha evaluado la eliminación de amoníaco marcado con  $^{15}\text{N}$  en orina. Sin embargo ninguno de éstos métodos ha sido estandarizado y no representa reales ventajas sobre los métodos ya probados.<sup>40</sup>

## 1.7. TRATAMIENTO

No existe acuerdo sobre quienes y con que tratar la infección. Los ensayos terapéuticos en niños son escasos y las series cortas, por ello una gran parte de las pautas para tratar niños se basan en estudios hechos en adultos.<sup>15,19,34,131,157</sup> Para adultos se recomienda tratar a los pacientes que tengan enfermedad ulcerosa, linfoma gástrico (tipo MALT), gastritis con cambios inflamatorios graves, antecedente de resección gástrica por úlceras o cáncer, historia familiar de cáncer y algunos casos de dispepsia funcional. En niños aún no existe consenso.<sup>19,131</sup>

*H. pylori* es sensible a una gran variedad de antibióticos, existen cepas que *in vitro* presentan susceptibilidad a penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, tetraciclinas, nitroimidazoles, nitrofuranos, quinolonas, sales de bismuto e inhibidores de bomba de protones. Es intrínsecamente resistente a bloqueadores de receptores-H<sub>2</sub> (ranitidina y cimetidina), polimixina y trimetropim.<sup>40,56</sup>

Los primeros estudios para erradicación de *H. pylori* fueron dominados por la terapia con sales de bismuto (6 semanas) combinada con dos antibióticos (1-2 semanas). Se inició por tratar con subcitrato de bismuto, tetraciclina y metronidazol, logrando la erradicación en 90% de los casos. Sin embargo se ha ido generando una marcada resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, particularmente nitroimidazoles y macrólidos. Van der Wuden, *et al.* (1997) reportaron un incremento de la resistencia a metronidazol (del 7% en 1993 al 32% en 1996) en los países bajos.<sup>23,69,167</sup>

La resistencia a antibióticos varía a lo largo del mundo, esto se ha asociado al uso indiscriminado que se ha hecho de los mismos. La resistencia de las cepas de *H. pylori* a metronidazol es altamente variable, en los países desarrollados la resistencia va de un 11-70%, en cambio en los países en desarrollo se ha reportado una resistencia del 95%. La claritromicina en combinación con otros agentes ha disminuido la resistencia a metronidazol. La resistencia a claritromicina en general no es mayor al 10%, una excepción a esto fue

reportada en Perú por Vazquez, *et al.* (1996) quienes encontraron una resistencia del 50% a claritromicina. En Costa Rica se ha reportado una alta resistencia a eritromicina (92.6%), tetraciclina (80.4%), y amoxicilina (51.2%).<sup>36,109,130,168</sup>

Los mejores resultados del tratamiento se han obtenido con la terapia triple, ya que no existen medicamentos que puedan ser empleados como monoterapia. En la terapia triple en lugar de metronidazol se incluye claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de bomba de protones. La combinación bomba de protones, bismuto, tetraciclina y metronidazol ha resultado eficaz en los casos en los que se ha reportado la presencia de cepas resistentes a metronidazol. La FDA ha aprobado diferentes tratamientos para la erradicación de la úlcera péptica, consistentes en terapia triple a base de: subsalicilato de bismuto (262 mg), metronidazol (250 mg), y tetraciclina (500 mg) por 14 días (Cuadro 7).<sup>23,36,40,69</sup>

**Cuadro 7.** Regímenes de erradicación de *H. pylori*.

Régimen	Erradicación %	Duración
<b>Terapia Doble</b>		
RAN 400 mg + CLAR 500 mg	82	---
OMP 40 mg + CLAR 500 mg	74	---
<b>Terapia Triple</b>		
<b>Regímenes basados en omeprazol</b>		
OMP 20 mg + CLAR 250 mg + TIN 500 mg	87	una semana
OMP 20 mg + CLAR 500 mg + AMOX 1 g	96	una semana
OMP 20 mg + CLAR 250 mg + MET 400 mg	95	una semana
OMP 20 mg + CLAR 500 mg + MET 400 mg	90	una semana
OMP 20 mg + CLAR 250 mg + AMOX 1g	84	una semana
OMP 20 mg + MET 400 mg + AMOX 1 g	79	una semana
<b>Regímenes basados en lanzoprazol</b>		
LAN 30 mg + CLAR 500 mg + AMOX 1g	91	una semana
LAN 30 mg + CLAR 250 mg + MET 400 mg	92	una semana
LAN 30 mg + CLAR 250 mg + TET 300 mg	83	una semana
LAN 30 mg + CLAR 250 mg + AMOX 1g	90	una semana
LAN 30 mg + MET 400 mg + AMOX 1g	73	una semana
<b>Régimen basado en ranitidina</b>		
RAN 300 mg + AMOX 500 mg + MET 500 mg	47.5	6 semanas RAN 12 días antibiótico
<b>Régimen basado en sales de bismuto</b>		
SCB 120 mg + AMOX 500 mg + MET 500 mg	86.8	6 semanas SCB 12 días antibiótico
SSB 120 mg + TET-HCl 500 mg + MET 250 mg	85%	2 semanas

OMP = Omeprazol; LAN = Lanzoprazol; MET = Metronidazol; AMOX = Amoxicilina; TIN = Tinidazol  
TET = Tetraciclina; RAN = Ranitidina; SCB = Subcitrate de bismuto; SSB = Subsalicilato de bismuto  
CLAR = Claritromicina. Modificado de Hunt. (1966)<sup>69</sup> y Dunn, *et al.* (1997)<sup>40</sup>

### **1.7.1. Diagnóstico postratamiento.**

La alta incidencia de resistencia al tratamiento para erradicación de *H. pylori*, hace necesario el diagnóstico postratamiento. El diagnóstico debe de llevarse no antes de 4 semanas después de haber concluido el tratamiento y puede realizarse por medio de:

- i) Prueba de ureasa, se deben de tomar varias muestras, ya que después del tratamiento baja la densidad bacteriana y la prueba se hace menos sensible.
- ii) Serología, una vez que se erradicó la infección, los niveles de anticuerpos tienden a disminuir hasta en un 50%. Es importante considerar el periodo de convalecencia debido a que los niveles de anticuerpos disminuyen a las seis semanas pero estos cambios no diferencian entre la cura y la falla al tratamiento (en ambos casos se da una disminución de los niveles de anticuerpos). Para diferenciar esto hay que evaluar el nivel de anticuerpos 6 meses después del tratamiento.
- iii) Pruebas de aliento, son las que más se han empleado para evaluar la erradicación de la infección sobre todo en la población pediátrica.<sup>40</sup>

### **1.7.2. Prevención y erradicación de *H. pylori* por vacunas.**

Debido a la incrementada resistencia a los antibióticos, el campo de la investigación para la erradicación de *H. pylori* se ha centrado más en el desarrollo de una vacuna y aunque no se han definido las poblaciones que deban recibir tratamiento preventivo, el desarrollo de vacunas esta en proceso.<sup>173</sup>

La vacunación ha sido ensayada en una variedad de modelos animales en los cuales se ha involucrado la administración orogástrica de los antígenos en combinación con adyuvantes mucosales tales como la toxina colérica y la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. En los animales una serie de inmunógenos confieren protección contra el desafío de infección con *H. pylori*, entre estos se encuentran sonicados bacterianos, la enzima ureasa purificada, subunidades de la ureasa (UreA y UreB) o porciones de la misma, la citotóxina Vac A purificada y las proteínas de choque térmico (HspA y HspB).<sup>15,28,46,91,119,173</sup>

## 2. JUSTIFICACION

La infección por *H. pylori* se encuentra distribuida en todo el mundo, como lo han demostrado estudios epidemiológicos, se presenta tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo; sin embargo en éstos últimos además de existir una mayor prevalencia la infección se adquiere a edad más temprana.<sup>13,159</sup>

En niños la infección por *H. pylori* revierte particular interés ya que la bacteria es importante en la génesis de patologías gástricas progresivas y la predisposición al desarrollo de cáncer gástrico. Además se ha observado que los niños infectados con *H. pylori* desarrollan menos que los no infectados y son de menor estatura.<sup>57,131,132</sup>

En México, los problemas de desnutrición en gran parte de la población infantil son por todos conocidos; si a esto se suma el hecho de que las alteraciones provocadas por *H. pylori* alteran la digestión y por tanto disminuyen la asimilación de alimentos por parte del individuo, se está hablando de problemas serios que causarán alteración en el desarrollo del niño.

Dado lo anterior resulta de gran interés el contar con métodos de diagnóstico sencillos, económicos, rápidos, sensibles y específicos que ayuden a identificar la infección en pacientes pediátricos con algún trastorno gástrico.

Debido a que aún se desconoce el mecanismo exacto de transmisión de la infección y son varias las rutas propuestas, se hace necesario realizar el aislamiento del microorganismo a partir de materia fecal y placa dentobacteriana, para tener datos que aporten información acerca del posible mecanismo de transmisión.

### **3. HIPOTESIS**

1. Si en el trastorno gástrico esta involucrado el *H. pylori* se esperaría aislarlo de biopsia gástrica, identificarlo en impronta y que la prueba de ureasa rápida sea positiva.
2. Si existe infección por *H. pylori* y no se logra el aislamiento, esta podrá ser identificada por un método más sensible como es el PCR.
3. Si la infección por *H. pylori* es transmitida por vía oral-oral y/u oral-fecal, se esperaría aislarlo de heces y/o placa dentobacteriana.
4. Si existe colonización por *H. pylori*, se esperaría identificarlo por algún método invasivo y que los niveles de anticuerpos se encontraran considerablemente incrementados.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Comparar el valor diagnóstico del estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR en el diagnóstico de infección por *H. pylori* en pacientes pediátricos con algún trastorno gástrico.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Diagnosticar infección por *H. pylori* en pacientes pediátricos con algún trastorno gástrico empleando 5 pruebas invasivas y serología.
2. Comparar el valor diagnóstico del estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, ELISA y PCR en pacientes pediátricos que presenten algún trastorno gástrico.
3. Evaluar la respuesta de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero de los pacientes y determinar si los títulos correlacionan con la presencia de infección o daño gástrico.
4. Evaluar el patrón de reconocimiento antigénico en los pacientes estudiados y determinar la existencia de proteínas comunes en los pacientes infectados.
5. Aislar *H. pylori* de placa dentobacteriana y/o materia fecal, con el fin de aportar datos que ayuden a elucidar el posible mecanismo de transmisión.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. POBLACION**

Se estudiaron 100 pacientes pediátricos con trastornos gastrointestinales que acudieron al servicio de Endoscopias Pediátricas del Hospital General Centro Médico La Raza-IMSS de Julio de 1997 a Marzo de 1998.

#### **5.1.1 . Criterios de inclusión**

Se incluyeron pacientes hospitalizados y de consulta externa que no hubieran consumido medicamentos antiulcerosos o de erradicación de *H. pylori* cuando menos dos semanas antes del estudio, de los cuales se pidió consentimiento informado y firmado por los padres.

#### **5.1.2. Criterios de exclusión**

Se excluyeron pacientes con sangrado masivo de tubo digestivo, insuficiencia respiratoria o algún tipo de incapacidad física para cooperar.

### **5.2. TOMA DE MUESTRA**

Se tomaron muestras de: sangre, placa dentobacteriana, biopsias (de antro gástrico, esófago y duodeno) y materia fecal. Los medios de cultivo y los reactivos empleados en todos los procedimientos se describen en el apéndice.

#### **5.2.1. Placa dentobacteriana**

Antes de realizar el estudio endoscópico, con ayuda de un limpiador de sarro, se tomó una muestra de placa dentobacteriana, se colocó en 0.5 ml de medio de transporte y se llevó al laboratorio para cultivo.

### 5.2.2. Sangre

Antes del estudio endoscópico se tomó una muestra de sangre por punción venosa, para separar el suero, las muestras fueron centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 min. Los sueros se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### 5.2.3. Biopsias

Bajo anestesia general, se realizó panendoscopia (por un médico especialista) para evaluar tubo digestivo superior y obtener muestras de mucosa gástrica, se utilizó un endoscopio Pentáx EG-2900 o un fibroscopio Olympus XP-10. Se tomaron 4 biopsias de antro: la primera fue puesta en formaldehído al 10% para realizar examen histológico; la segunda fue colocada en 0.5 ml de medio de transporte y se llevó al laboratorio para realizar cultivo; la tercera biopsia se dividió en dos partes, una se empleó para realizar un frote en portaobjetos y la otra para prueba de ureasa rápida; la cuarta muestra se tomó en un tubo Eppendorf conteniendo 300  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la fecha de su utilización.

Además se tomó una biopsia de esófago y una de duodeno (estas se emplearon solo para estudio histológico y se mencionan porque se relacionó el reporte del estudio, con la infección por *H. pylori*)

### 5.2.4. Materia fecal

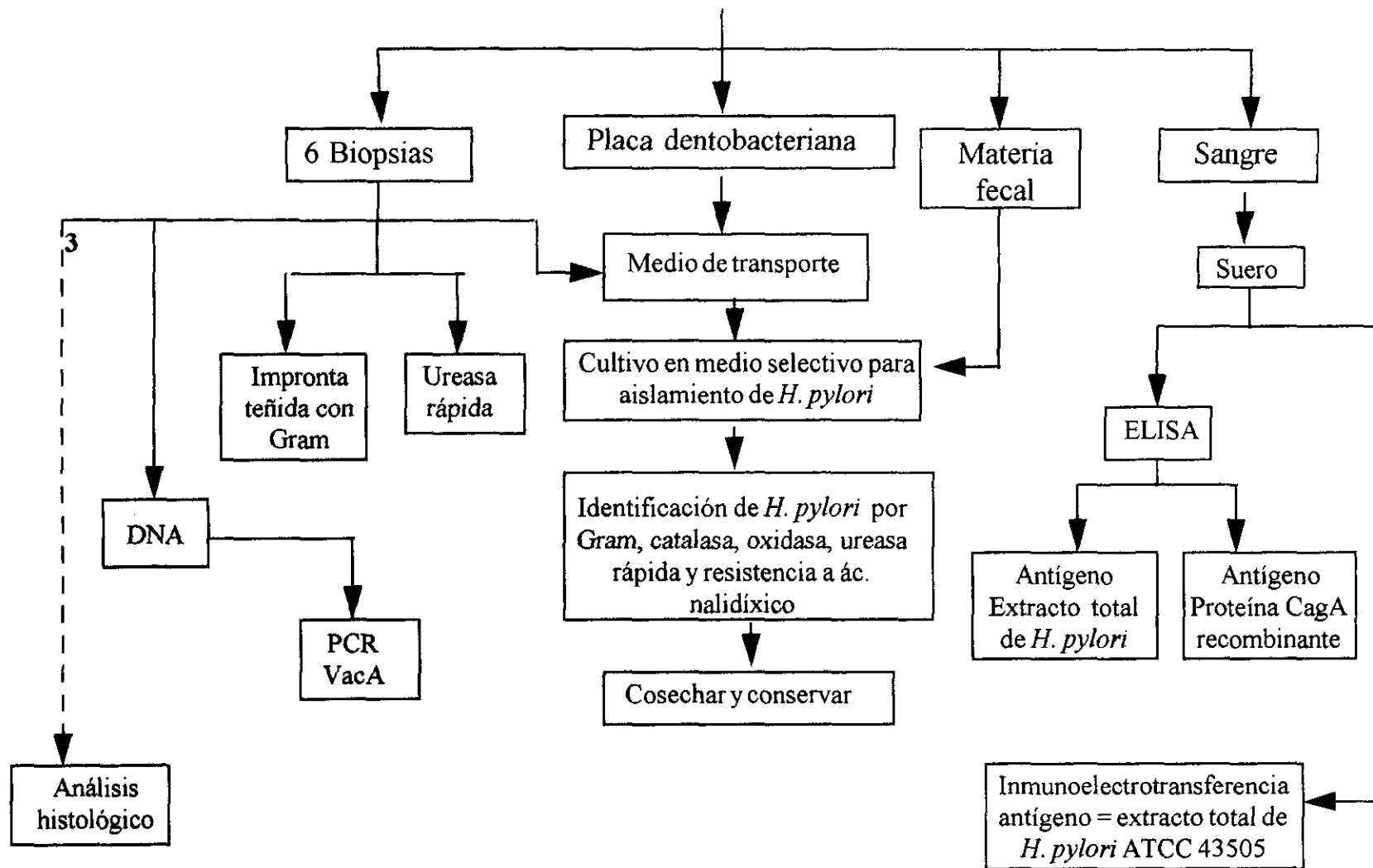
La muestra la tomó el paciente (antes de asistir al estudio endoscópico) en un frasco estéril de boca ancha.

## 5.3. METODOS DE DIAGNOSTICO

La identificación de infección por *H. pylori* se realizó por: estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, dos pruebas de ELISA y PCR. Para evaluar la existencia de algún patrón de reconocimiento antigénico por parte de los pacientes infectados con *H. pylori*, se realizó inmunoelctrotransferencia (Fig. 7).<sup>22,92,96,129,161,179</sup>

Como cepa de referencia se utilizó *H. pylori* ATCC43504.

## PACIENTES CON TRASTORNO GASTRICO



**Figura 7. Diagrama general de trabajo.** La línea discontinua indica que el estudio histológico fue realizado por los patólogos del departamento de patología HGCM-La Raza, IMSS.

### **5.3.1. Estudio histológico**

Las muestras de biopsia fueron procesadas por métodos estándar y teñidas con hematoxilina-eosina. El criterio de positividad fue la presencia de bacterias con morfología compatible con la de *H. pylori* (Esta prueba fue realizada por los patólogos del HGCM-La Raza-IMSS).<sup>96</sup>

### **5.3.2. Cultivo**

#### **5.3.2.1. De biopsias y placa dentobacteriana**

Las muestras se maceraron en el medio de transporte y fueron sembradas en agar selectivo para *H. pylori*, las placas fueron incubadas durante 3-7 días a 37°C en ambiente húmedo y atmósfera microaerofílica generada por sobres (Oxoid BR39). La identificación de *H. pylori* se realizó con base en la morfología colonial (colonias translúcidas borde liso de 1-2 mm de diámetro), tinción de Gram (bacilo curvo Gram negativo), y la positividad a las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, ureasa rápida y resistencia a ácido nalidíxico.<sup>92,96</sup>

#### **5.3.2.2. De materia fecal.**

Se realizó según la técnica de Kelly, *et al.* (1994), con las siguientes modificaciones: la muestra fue homogeneizada en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.1, la mezcla fue filtrada primero en gasa para retirar los elementos más grandes y posteriormente se centrifugó a 7000 r.p.m./4°C durante 10 min, el paquete obtenido se lavó con el mismo amortiguador y fue centrifugado nuevamente a 7000 r.p.m./4°C durante 10 min. Tanto los sobrenadantes como los paquetes obtenidos de las centrifugaciones, fueron sembrados de la misma forma que las muestras de biopsia y placa dentobacteriana e incubados bajo las mismas condiciones.<sup>80,92,96</sup>

#### **5.3.2.3. Conservación de las cepas aisladas.**

Las colonias seleccionadas se resembraron en agar selectivo para *H. pylori* y se incubaron por 3 días bajo las mismas condiciones que el cultivo primario. Se confirmó pureza mediante

tinción de Gram y se realizaron nuevamente pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa rápida. Después de cosechar las cepas fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  empleando como soporte caldo brucella-sangre de caballo al 50%.<sup>92,96</sup>

### **5.3.3. Prueba de ureasa rápida.**

Se realizó en tubo con medio semisólido de urea al 1%. Se utilizó un tubo por cada biopsia o colonia a identificar, la muestra se colocó dentro del tubo y se observó cada 10 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos hasta las 4 horas. En el caso de las biopsias, se incubaron hasta 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y se revisaron para confirmar prueba negativa. La hidrólisis de la urea se manifestó por la presencia de un color rosado alrededor de la biopsia o del inóculo, lo cual indica un resultado positivo.<sup>92,129</sup>

### **5.3.4. Tinción de biopsia con Gram.**

Se realizó frote directo de la biopsia sobre la superficie de un portaobjetos limpio y desengrasado. La preparación se fijó con metanol y se tiñó con tinción de Gram, para posterior observación al microscopio buscando la morfología característica de *H. pylori*.<sup>92,129</sup>

### **5.3.5. Pruebas de ELISA**

Las pruebas de ELISA se realizaron en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, siguiendo la técnica de Camorlinga, *et al.* (1998)<sup>22</sup>. Se realizaron dos pruebas de ELISA indirecta para detectar la presencia de anticuerpos clase IgG. Los reactivos empleados en éstas técnicas fueron proporcionados por el Dr. Javier Torres López (Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, CMN-Siglo XXI).

### 5.3.5.1. Prueba de ELISA con extracto total de *H. pylori* como antígeno.

El antígeno empleado fue un sonicado de 3 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos (un niño y dos adultos), con a una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

#### a) Acoplamiento del antígeno.

El antígeno fue diluido con amortiguador de carbonatos 0.05M pH 9.6, hasta una concentración de 5 µg de proteína/ml. A partir de esta dilución se transfirieron 100 µl a cada uno de los pozos de una microplaca y se dejaron adsorber durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se decantó la placa y se procedió a bloquear espacios libres.

#### b) Bloqueo de espacios libres del micropozo

El bloqueo se realizo con 200 µl de amortiguador de fosfatos 0.5M pH 7.2-timerosal 0.01%-tween 20, 0.05% (PBSTT)-gelatina 0.1% a cada pozo, las placas fueron incubadas por 3 horas a 37°C. Después de la incubación las placas fueron lavadas tres veces con 250 µl de PBSTT.

#### c) Incubación con el anticuerpo primario

Los sueros de los pacientes se diluyeron 1:1000 con PBSTT-gelatina 0-1%-gamaglobulina bovina 0.5%. 100 µl de los sueros diluidos se transfirieron a la microplaca (por duplicado) y se incubaron durante una hora a 37°C. Por cada microplaca se incluyó un control positivo y un control negativo. Después de la incubación las placas fueron lavadas tres veces con 250 µl de PBSTT.

#### d) Incubación con el anticuerpo secundario

A cada pozo se adicionaron 100 µl del conjugado ratón-anti-IgG humano acoplado a fosfatasa alcalina (Southern-Biotech, Birmingham, AL) diluido 1:1000 en PBSTT-gamaglobulina bovina 0.1%-albúmina 1.0%. Se incubó a 37°C por una hora, terminada la incubación las placas fueron lavadas 3 veces con 250 µl PBSTT.

#### e) Revelado

Como sustrato se preparó una solución 1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato (Southern Biotech) en amortiguador de dietanolamina pH 9.8. Se adicionaron 100 µl del sustrato a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos (protegido de la luz). Transcurrido

el tiempo de incubación, se leyó inmediatamente la densidad óptica de cada pozo a 405 nm en un lector de ELISA (iEMS analyser, Labsystems, Finland).<sup>22</sup>

#### **5.3.5.2. Prueba de ELISA utilizando proteína Cag A recombinante como antígeno.**

El antígeno empleado fue proteína CagA recombinante (Ora Vax, Cambridge, MA) con una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

##### a) Acoplamiento del antígeno

El antígeno fue diluido con amortiguador de carbonatos 0.05M pH 9.6, hasta una concentración de 1 µg de proteínas/ml. A partir de esta dilución se transfirieron 100 µl a cada uno de los pozos de una microplaca y se dejaron adsorber 12 horas a 4°C. Después de este tiempo, las placas se lavaron 4 veces con PBSTT.

##### b) Bloqueo de espacios libres del micropozo

El bloqueo se realizo con 200 µl de PBSTT-leche descremada 2.5% a cada pozo, las placas fueron incubadas por una hora a 37°C. Después de la incubación las placas fueron lavadas 4 veces con 250 µl de PBSTT.

##### c) Incubación con el anticuerpo primario

Los sueros de los pacientes se diluyeron 1:200 con PBSTT-leche descremada 2.5%. 100 µl de los sueros diluidos se transfirieron a la microplaca (por duplicado) y se incubaron durante una hora a 37°C. Por cada microplaca se incluyó un control positivo y un control negativo. Después de la incubación las placas fueron lavadas tres veces con 250 µl de PBSTT.

##### d) Incubación con el anticuerpo secundario

A cada pozo se adicionaron 100 µl del conjugado ratón-anti-IgG humano acoplado a fosfatasa alcalina (Southern-Biotech, Birmingham, AL) diluido 1:1000 en PBSTT-leche descremada 2.5%. Se incubó a 37°C por una hora, terminada la incubación las placas fueron lavadas 3 veces con 250 µl de PBSTT.

##### e) Revelado

Se realizó de la misma forma que para el ELISA con extracto total.<sup>22</sup>



El valor de corte para ambas pruebas se determinó a partir de los valores de densidad óptica de 30 sueros de pacientes no infectados (determinados por cultivo e histología) y 30 sueros de pacientes infectados. El umbral de positividad fue el promedio de la densidad óptica de los sueros de los pacientes no infectados + 3 desviaciones estándar. Una unidad ELISA fue definida como la relación de la densidad óptica de la muestra entre el valor de corte. Se consideró positivo  $> 1$  Unidad ELISA.<sup>22</sup>

### 5.3.6. Inmunoelectrotransferencia

Se realizó empleando como antígeno un lisado total de la cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504, ajustado a una concentración de proteínas de 1 mg/ml.<sup>147</sup>

La separación de proteínas se llevó a cabo por PAGE-SDS en gel vertical discontinuo según técnica de Laemli (1970), bajo las siguientes condiciones: 450 µg de antígeno fue corrido en gel concentrador al 5% y gel separador al 12% a 15 mA durante 2.5 h en una cámara de electroforesis (Mini-protean II cell, Bio-Rad). Como marcador se empleó un estándar de peso molecular (Sigma SDS-6H).<sup>89,147</sup>

La transferencia a papel de nitrocelulosa se realizó según técnica de Towbin, *et al.* (1979), bajo las siguientes condiciones: Las proteínas del gel de poliacrilamida fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Immobilon P40, Millipore 0.45µm) a 10 mA durante 12 h en una cámara de transferencia (Mini-transblot cell, Bio-Rad). Terminada la transferencia la membrana de nitrocelulosa fue lavada con agua destilada, secada al aire y cortada en tiras de 2 mm de ancho. La tira correspondiente al marcador de PM se tiñó con negro amido al 0.1%.<sup>147,161</sup>

Las tiras de papel de nitrocelulosa con antígeno adsorbido se procesaron de la siguiente forma:

a) Bloqueo de espacios libres en la membrana.

Cada tira fue bloqueada con 800 µl de amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-caseinato de calcio 5% por 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente lavada 4 veces con 800 µl de amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20, 0.05%.

b) Incubación con el anticuerpo primario.

Los sueros de los pacientes se diluyeron 1:20 con amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-caseinato de calcio 0.5%. Las tiras de papel fueron incubadas con 800 µl de los sueros (diluidos) de los pacientes durante una hora a temperatura ambiente. Se incluyó un control positivo y un control negativo por cada placa. Al término de la incubación, las placas fueron lavadas 4 veces con 800 µl de amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween20, 0.05%.

c) Incubación con el anticuerpo secundario

A cada tira se adicionaron 800 µl del conjugado ratón-anti-IgG,IgA e IgM humano peroxidado (Sigma Immuno Chemicals) diluido 1:2000 en amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4-caseinato de calcio 0.5%. Se incubó a temperatura ambiente por una hora, después de la incubación, las placas fueron lavadas 4 veces con 800 µl de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20 0.05%.

d) Revelado

Como sustrato se preparó una solución 0.6 mg/ml de 4-cloro- $\alpha$ -naftol (Sigma C8890), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.015%, en amortiguador de trietanolamina 0.02 M pH 7.2. Se adicionaron 800 µl del sustrato a cada tira y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (hasta observar la aparición de bandas), después las tiras fueron lavadas 4 veces con 800 µl de Tris-HCl 0.1M pH 7.4-Tween 20, 0.05% y secadas al aire.<sup>161</sup>

### **5.3.7. PCR**

Para realizar esta prueba se empleó DNA extraído de las biopsias de los pacientes así como de la cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504.

### 5.3.7.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA tanto de las biopsias como de la cepa de referencia se realizó siguiendo la técnica de Monteiro, *et al.* (1997), con las siguientes modificaciones:

#### a) Lisis de las muestras

Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m./4°C durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y el paquete se resuspendió en 300 µl de amortiguador de lisis pH 8.0, se adicionaron 7.5 µl de proteinasa K [20 mg/ml] (Promega) y se incubó a 55°C durante 2 horas.<sup>95,111</sup>

#### b) Extracción de DNA

Se realizaron 3 extracciones: la primera con fenol, la segunda con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y la tercera con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Cada extracción se realizó adicionando 300 µl, se agitó y se centrifugó a 10,000 r.p.m./4°C/10 min conservando la fase acuosa. Después de la última extracción se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol frío. Se dejó a -20°C por 12 horas, posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m./4°C por 15 min y se lavó con etanol frío al 70%. El DNA fue resuspendido en 50 µl de agua destilada. La concentración de DNA fue calculada realizando una dilución 1:250 y leyendo densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU65), empleando el siguiente factor de conversión D.O. x 12.5 = µg/µl. El DNA así obtenido se guardó a -20°C hasta la fecha de utilización.<sup>95,111,147</sup>

### 5.3.7.2. Amplificación del gen *vacA*.

La PCR se realizó de acuerdo con la técnica de Xiang, *et al.* (1995) con las siguientes modificaciones:

La reacción fue llevada a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo: [10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl] (Boehringer-Mannheim), 0.4 mM de deoxinucleótidos trifosfato [dATP, dCTP, dGTP y dTTP] (Promega), 35 pmol de cada iniciador F6 [GCT TCT CTT ACC ACC ATT GC] (GIBCO, BRL) y R20 [TGT CAG GGT TGT TCA CAA TG] (GIBCO, BRL), 2.5 U de Taq-DNApol (Boehringer-Mannheim), 10 ng de DNA de la cepa pura y 100 ng de DNA cromosomal en el caso de las biopsias, para amplificar un fragmento de 1160 pb.

Las condiciones de reacción en el termociclador (Perkin Elmer) fueron: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C, 1 minuto a 72°C por un total de 25 ciclos y un tiempo de extensión de 10 minutos a 72°C, enfriado a 4°C por 10 min. Por cada corrida se incluyó un control negativo y un control positivo.<sup>179</sup>

### **5.3.7.3. Detección y análisis de los productos de DNA amplificados.**

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.4% corridos en TBE 0.5 X a 100V por 1 h. y teñidos con bromuro de etidio. Como marcador se uso el ladder 123pb (Sigma, D5042).<sup>147,179</sup>

Se consideró como resultado positivo la obtención del producto de 1160 pb.

## **5.4. DEFINICIONES**

La evaluación y comparación de las pruebas diagnósticas se realizó tomando en cuenta los siguientes criterios:

1. Tomando como referencia el cultivo y/o el estudio histológico, que son las técnicas tradicionalmente empleadas como "estándar de oro". De este modo un paciente se considero positivo cuando una o ambas pruebas fueron positivas y negativo cuando las dos fueron negativas. La decisión de considerar dos pruebas como referencia para realizar el análisis de discrepancia se tomó de acuerdo a lo reportado por Koumans, *et al.* (1998) y Miller (1998).<sup>40,75,94</sup>

2. Tomando como referencia la positividad a 4 de las 7 pruebas evaluadas, dada la baja sensibilidad del cultivo y el estudio histológico, ya que la infección se distribuye en parches.<sup>32</sup> De este modo un paciente fue considerado positivo con 4 o más pruebas positivas (de las 7 evaluadas) y negativo cuando menos de 4 pruebas fueron positivas.

Un paciente se consideró verdaderamente no infectado, cuando todas las pruebas fueron negativas.

En ambos casos, los pacientes positivos a la prueba de referencia con resultado positivo a la prueba evaluada verdaderos positivos (VP); mientras los pacientes negativos con resultado negativo a la prueba evaluada, se consideraron verdaderos negativos (VN). Los pacientes positivos con resultado negativo a la prueba evaluada, se consideraron falsos negativos (FN); mientras que los pacientes negativos con resultado positivo a la prueba evaluada, se consideraron falsos positivos (FP).

## 5.5. ANALISIS ESTADISTICO

Para realizar el análisis estadístico, se cálculo el total de casos positivos y negativos para cada prueba. Los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia de las pruebas fueron calculados según Fescina, *et al.* (1985). Las ecuaciones empleadas así como la Matriz de decisión se muestran a continuación:

Tabla de doble entrada (Matriz de decisión) para calcular porcentajes de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas.

		Prueba de referencia		
		+	-	
Prueba a evaluar	+	VP	FP	
	-	FN	VN	
				Total

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Eficacia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

La correlación de las pruebas diagnósticas fue realizada por chi-cuadrada ( $X^2$ ) comparando cada prueba con el estándar y realizando también la correlación del conjunto de pruebas con un nivel de significancia  $\alpha = 0.01$ .

Para el conjunto de pruebas se planteó:

$H_0$ : Todas las pruebas tienen el mismo valor diagnóstico que el estándar.

$H_A$ : Al menos una de las pruebas no tiene el mismo valor diagnóstico.

Se rechaza  $H_0$  si la  $X^2$  calculada  $> X^2_{0.01,5}$ .

Para el análisis de las pruebas individuales se planteó:

$H_0$ : La prueba evaluada tiene el mismo valor diagnóstico que el estándar.

$H_A$ : La prueba tienen diferente valor diagnóstico.

Se rechaza  $H_0$  si la  $X^2$  calculada  $> X^2_{0.01,1}$ .

La  $X^2$  calculada se obtuvo con el total de casos positivos y negativos para cada prueba, y calculando los casos positivos y negativos esperados para sustituir en la ecuación de  $X^2$ , de acuerdo al cuadro y las ecuaciones mostradas a continuación:

	<b>Estándar</b>	<b>Prueba(s) a evaluar</b>	
<b>Positivos</b>	Casos observados ( $O_1$ )	Casos observados ( $O_2$ )	Total de renglón ( $T_R$ )
<b>Negativos</b>	Casos observados ( $O_3$ )	Casos observados ( $O_n$ )	Total de renglón ( $T_R$ )
	Total de columna ( $T_C$ )	Total de columna ( $T_C$ )	Total de totales ( $T_T$ )

$$T_C = \sum \text{casos observados en la columna} \quad T_R = \sum \text{casos observados en el renglón}$$

$$T_T = \sum T_C = \sum T_R$$

$$\text{Casos esperados } (E_i) = \frac{T_C \times T_R}{T_T} \quad X^2 \text{ calculada} = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

De los 100 casos estudiados 44 fueron niñas y 56 fueron niños, con edad promedio de 8 años. La mayoría de los pacientes (78%) fueron residentes del Distrito Federal y Estado de México. El diagnóstico por el cual se solicitó estudio endoscópico fue variable, siendo los más comunes el síndrome ácido-péptico (46%) y dolor abdominal recurrente (31%) (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Características de la población estudiada.

	Pacientes estudiados (n = 100)
Edad en años cumplidos media $\pm$ SD (rango)	8 $\pm$ 4.7 (0 - 17)
Género femenino:masculino (relación)	44:56 (1:1.3)
Lugar de residencia No. = %	
Distrito Federal	34
Estado de México	44
Hidalgo	4
Guanajuato	1
Sin datos	17
Diagnóstico* No. = %	
Dolor abdominal recurrente	31
Síndrome ácido-péptico	46
Evaluación postfunduplicación	20
Antecedente de infección con <i>H. pylori</i>	13
Sangrado de tubo digestivo alto	5
Gastropatía congestiva	1
Diarrea prolongada	1
Sin antecedente de problema digestivo	4

\* El total es mayor al 100%, debido a que algunos niños (n = 21) presentaron cuadros combinados.

El nivel socioeconómico de la población estudiada en general fue bajo, los padres de los niños dijeron percibir en promedio un salario mínimo (71%) y sólo el 12% dijo percibir salarios mayores. En 71% de los casos dijeron contar con casa propia o vivir en casa de algún familiar sin pagar renta y contar con todos los servicios, 12% dijo vivir en casa rentada con todos los servicios y en 17% de los casos no se tuvieron datos. Con respecto al nivel educativo de los padres (considerando el máximo nivel del padre o la madre) 12% dijeron ser profesionistas, 6% dijo tener bachillerato y 65% dijo haber concluido la secundaria. (Figura 8).



**Figura 8.** Nivel socioeconómico de los padres de los niños estudiados. A) Ingreso mensual, B) Tipo de vivienda y C) Nivel educativo.

## 6.2. DIAGNOSTICO ENDOSCOPICO

Los diagnósticos endoscópicos fueron principalmente esofagitis (65%), gastritis (47%), gastritis nodular (24%), hiato laxo (36%) y duodenitis (31%) (Cuadro 9).



**Cuadro 9.** Diagnósticos endoscópicos en la población estudiada

Diagnóstico endoscópico	No. = %
Esofagitis	65
Gastritis	46
Gastritis nodular	25
Hiato laxo	36
Duodenitis	31
Hernia hiatal	9
Úlcera gástrica	2
Normal	7

El total suma más del 100% debido a que los pacientes presentaron cuadros combinados.

### 6.3. MUESTRAS OBTENIDAS

Se obtuvieron 832 muestras, que incluyeron 400 biopsias de antro, 100 biopsias de esófago, 100 biopsias de duodeno, 100 muestras de sangre, 89 muestras de placa dentobacteriana y 43 muestras de materia fecal (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Relación de muestras obtenidas.

Tipo de muestra	Número de muestras
Biopsia de esófago	100
Biopsia de antro gástrico	400
Biopsia de duodeno	100
Placa dentobacteriana	89
Materia fecal	43
Sangre	100
	Total = 832

## 6.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 6.4.1. Estudio histológico

Esta es la técnica que se sigue de rutina en el HGCM-La Raza. Por esta técnica fueron reportados 13 casos positivos (presencia de gastritis crónica con flora bacilar adherente), 84 negativos (57 con mucosa normal y 27 con gastritis crónica, sin flora bacilar adherente) y 3 biopsias fueron reportadas como muestra insuficiente (estas 3 muestras correspondieron a pacientes que dieron negativas las demás pruebas) (Fig. 9).

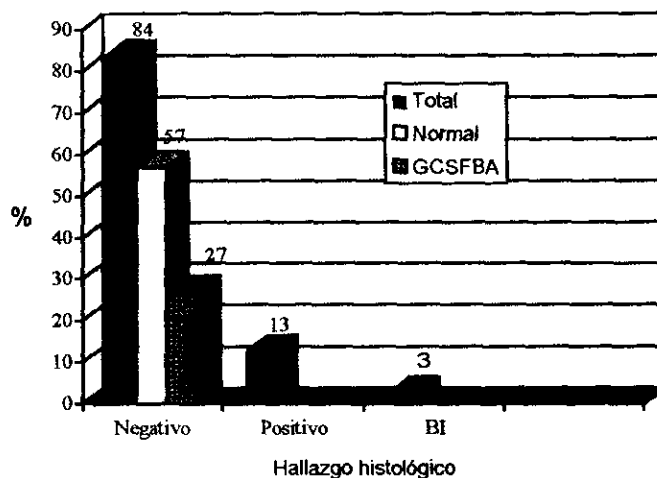


Figura 9. Hallazgos histológicos en la población estudiada. Se obtuvieron 13 casos positivos, 84 negativos [57 con mucosa normal, 27 con gastritis crónica sin flora bacilar adherente (GCSFBA)] y 3 biopsias fueron reportadas como insuficientes (BI).

### 6.4.2. Cultivo

De las muestras cultivadas, solo se logró aislar *H. pylori* a partir de biopsia, no se logró ningún aislamiento de placa dentobacteriana o materia fecal. Se obtuvieron un total de 16 aislamientos, identificados como colonias características de *H. pylori* y confirmadas con

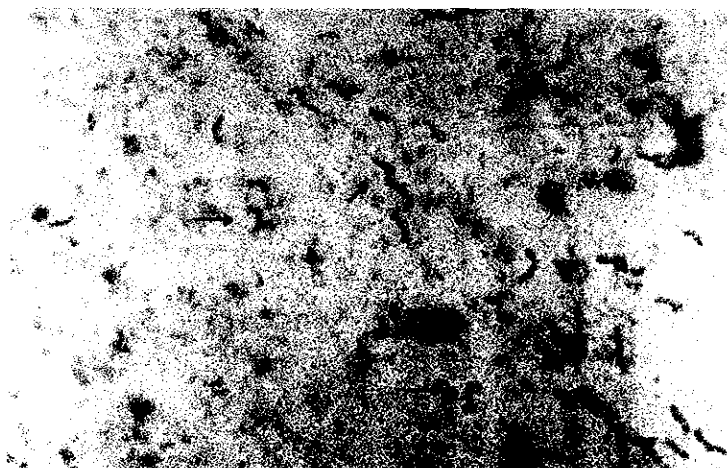
tinción de Gram, catalasa, oxidasa y ureasa rápida (las 3 positivas) y la resistencia a ácido nalidíxico.

### **6.4.3. Ureasa rápida**

Se obtuvieron 24 casos positivos, la mayoría de las pruebas dieron positivas antes de una hora y como máximo se presentó prueba positiva a las 4 horas. A pesar de que las muestras se incubaron hasta 24 horas, no se observó cambio en las muestras que fueron negativas a las 4 horas.

### **6.4.4. Tinción de biopsia con Gram**

Se obtuvieron 23 casos positivos, evidenciados por la presencia de bacilos espirales Gram negativos característicos de *H. pylori* (Fig. 10).



**Figura 10.** Impronta directa de biopsia teñida con la técnica de Gram. Se observa la morfología característica de *H. pylori* (alas de gaviota y forma de S).

De las pruebas microbiológicas (cultivo, ureasa rápida y tinción de biopsia con Gram) se obtuvieron un total de 24 pacientes positivos. Los 16 pacientes con aislamiento positivo fueron positivos también por prueba de ureasa rápida y tinción de biopsia con Gram (Fig. 11).

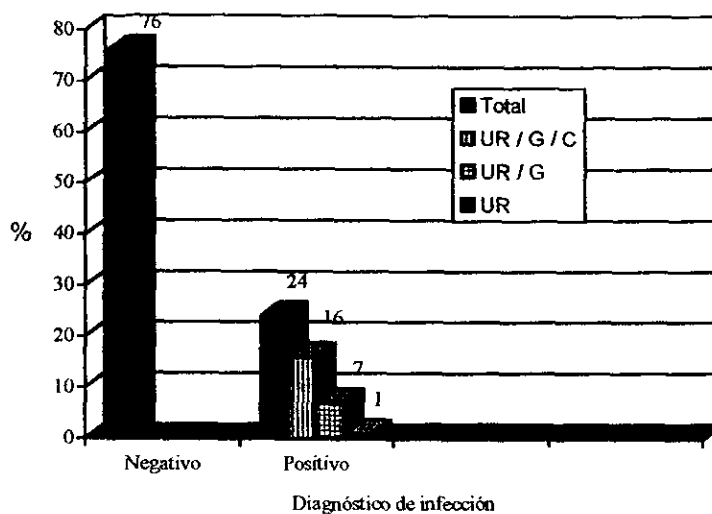


Figura 11. Diagnóstico de la infección por *H. pylori* empleando pruebas microbiológicas. El diagnóstico se realizó por: Prueba de ureasa rápida (UR), tinción de biopsia con Gram (G) y cultivo (C).

#### 6.4.5. Pruebas de ELISA

Las pruebas serológicas detectaron un total 58 casos positivos (30 a ambos antígenos, 23 sólo a extracto total y 5 sólo a proteína CagA recombinante) y 42 negativos (Fig. 12).

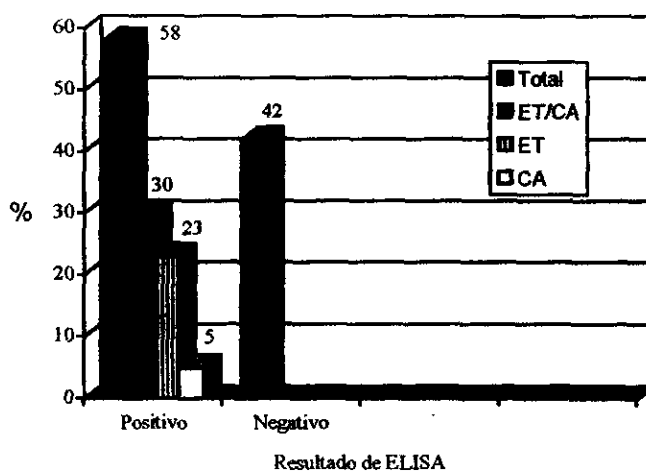
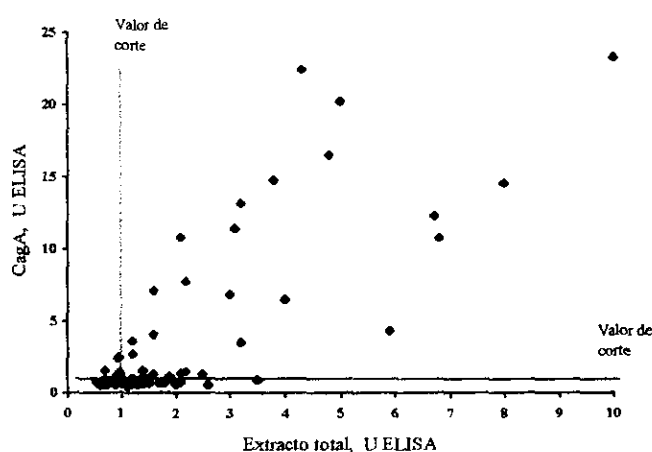


Figura 12. Sueros positivos y negativos a *H. pylori* por prueba de ELISA. Antígenos empleados: Extracto total (ET) y proteína CagA recombinante (CA).

En general la respuesta a extracto total fue menor que a proteína CagA, los títulos de anticuerpos contra extracto total fueron muy cercanos al valor de corte y no mayores a 10 U ELISA, en tanto que los títulos contra CagA alcanzaron valores de 10-24 U ELISA en 31.4% (11/35) de los casos positivos (Figura 13). 83.3% (15/18) de los pacientes con títulos > 4 U ELISA para CagA dieron prueba de ureasa rápida y tinción con Gram positivas (entre estos se encuentran los 7 que dieron positivas a todas las pruebas).

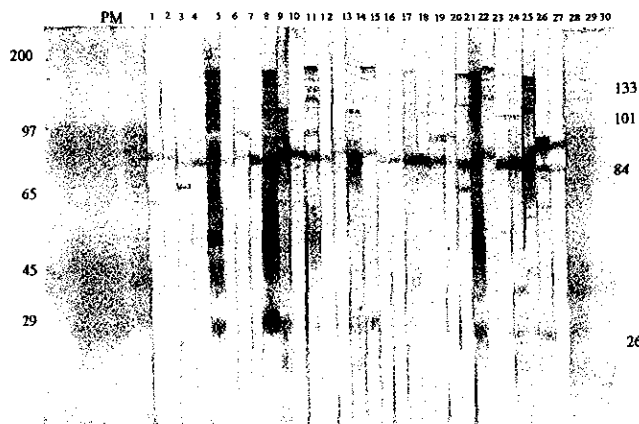


**Figura 13.** Niveles de anticuerpos IgG contra extracto total de *H. pylori* y proteína CagA recombinante, detectados por prueba de ELISA en la población estudiada.

#### 6.4.6. Inmunolectrotransferencia

En este ensayo, al enfrentar los sueros de los pacientes contra un lisado de *H. pylori* ATCC 43504 se observó una banda común en todos los pacientes, esta banda correspondió a una proteína de aproximadamente 84 kDa. La respuesta fue un tanto heterogénea, sin embargo se observó un reconocimiento a 7 proteínas (101-133 kDa) por parte de los pacientes que fueron positivos a alguna de las pruebas microbiológicas y que no se presentó en aquellos que fueron negativos a dichas pruebas. Estos pacientes fueron positivos por serología a extracto total y proteína CagA recombinante y la intensidad de la bandas correlacionó con los títulos de anticuerpos, ya que los carriles que presentaron las bandas más intensas,

correspondieron a los sueros de los pacientes con títulos más altos. Otro dato interesante lo constituyen los sueros que fueron positivos únicamente por ELISA que reconocen además a una proteína de aproximadamente 97 kDa (Fig. 14).



**Figura 14.** Inmunoelectrotransferencia de los sueros de los pacientes enfrentados a un lisado de *H. pylori* ATCC 43504. PM = marcador de peso molecular. Carriles = 5, 9, 12, 16, 23, 24, 25 y 28 pacientes que dieron positiva al menos una prueba microbiológica

### 6.4.7. PCR

La PCR se estandarizó con DNA de la cepa *H. pylori* ATCC 43504 que es CagA<sup>+</sup>/VacA<sup>+</sup>. Con la cepa de referencia, se obtuvo una sola banda que correspondió al producto esperado (1160 pb) no obteniéndose amplificaciones inespecíficas (Fig. 15). El DNA de tres biopsias de pacientes que fueron negativos por pruebas microbiológicas, estudio histológico y serología, se emplearon como controles negativos, además del control negativo de reactivos (sin DNA), ninguna de las cuales amplificó con los iniciadores usados.

El DNA extraído de las biopsias de los pacientes se empleó para hacer la prueba de PCR sin embargo no se logró ninguna amplificación, por lo que tuvo que correrse un doble PCR, usando los mismos iniciadores y como molde el producto del primer amplificado. En este segundo PCR sí se logró amplificar el producto de 1160 pb, aunque en algunos casos se obtuvieron algunas bandas inespecíficas (Fig. 16).

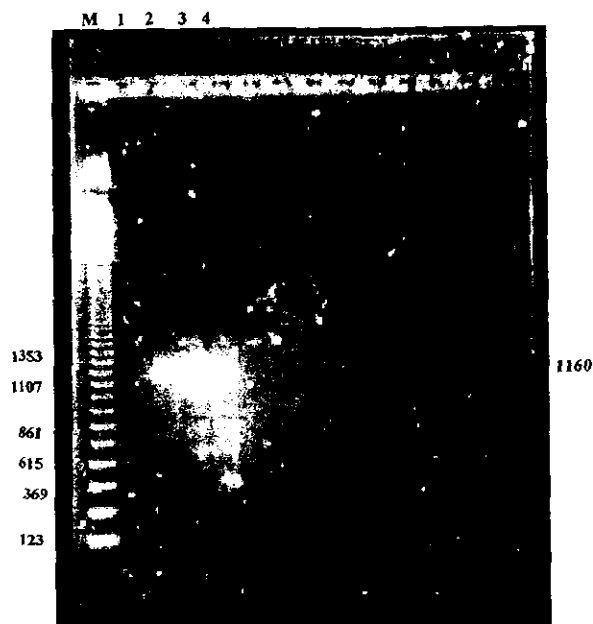


Fig. 15. PCR para la detección del gen *VacA* en *H. pylori* ATCC 43504. M = Ladder 123 (Sigma). Carril 1= control negativo. Carriles 2-4 *H. pylori* ATCC 43504.

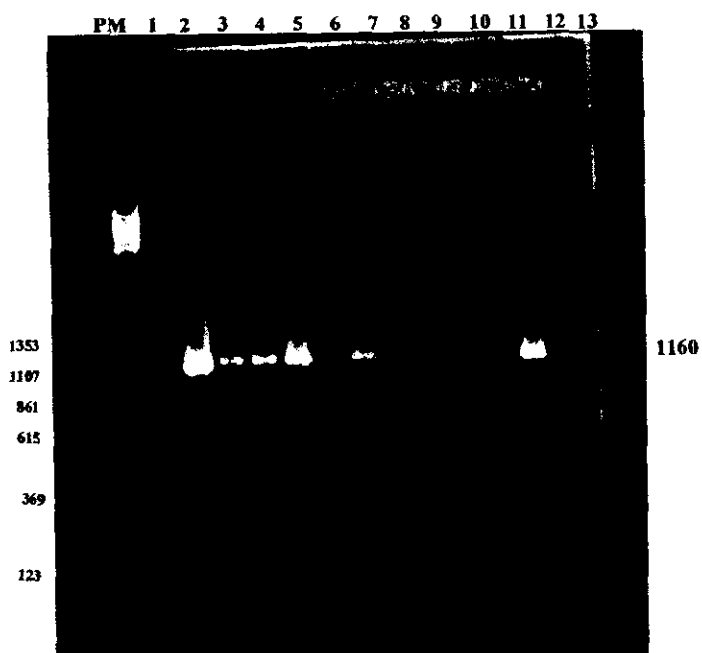


Fig. 16. PCR para la detección del gen *VacA* en las biopsias de los pacientes. M = Ladder 123 (Sigma). Carril 1 = control negativo. Carril 2 = Control positivo (*H. pylori* ATCC 43504). Carriles = 3-13 biopsias de los pacientes.

Por ésta técnica se obtuvieron 16 casos positivos y 84 negativos. Todos los casos positivos por PCR fueron también positivos al menos a dos de las pruebas microbiológicas, aunque no todos los casos positivos a pruebas microbiológicas o histología (en los cuales se identificó la presencia de la bacteria) fueron positivos por la PCR (Cuadro 11).

## 6.5. COMPARACION DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Los resultados de todas las pruebas fueron confrontados para poder compararlas. (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Relación de estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción con Gram, ELISA (extracto total y CagA) y PCR, que dieron indicios relacionados con infección por *H. pylori*.

No. de pacientes	Análisis histológico	Cultivo	Ureasa rápida	Tinción con Gram	ELISA (ET)	ELISA (CagA)	PCR
7	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+	+
1	+	-	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	-	-	+
1	+	+	+	+	+	-	-
1	-	+	+	+	-	+	+
1	-	-	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	-	-	+
3	-	-	+	+	+	-	-
1	+	-	+	-	+	-	-
15	-	-	-	-	+	+	-
18	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	+	-
39	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total 100</b>	<b>13*</b>	<b>16*</b>	<b>24*</b>	<b>23*</b>	<b>53*</b>	<b>35*</b>	<b>16*</b>

(+) prueba positiva (-) prueba negativa (ET) Extracto total (CagA) Proteína CagA recombinante  
 (\*) Sumatoria de los casos positivos.



### 6.5.1. Comparación empleando como referencia el cultivo y/o estudio histológico.

**Ejemplo** de como se calcularon los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia para la prueba de ureasa rápida.

		Cultivo / estudio histológico		
		+	-	Total
Ureasa	+	20	4	24
rápida	-	0	76	76
Total		20	80	100

$$\text{Sensibilidad} = \frac{20}{20 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{76}{76 + 4} \times 100 = 95\%$$

$$\text{VPP} = \frac{20}{20 + 4} \times 100 = 83.3\%$$

$$\text{VPN} = \frac{76}{76 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Eficacia} = \frac{20 + 76}{20 + 4 + 76 + 0} \times 100 = 96\%$$

El mismo procedimiento se siguió para las demás pruebas. De los métodos invasivos la prueba de ureasa rápida dio el mayor porcentaje de sensibilidad (100%), seguida por la tinción de biopsia con Gram (95%). La prueba que dio el mayor porcentaje de especificidad fue la PCR (98.8%) sin embargo presentó baja sensibilidad (75%). En el caso de las pruebas serológicas ambas presentaron baja sensibilidad y especificidad (80%/54%) para extracto total y (75%/75%) para la proteína CagA recombinante (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Sensibilidad y especificidad de la prueba de ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram, serología y PCR.

Prueba	Sensibilidad (%)	E especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficacia (%)
Ureasa rápida	100	95	83.3	100	96
Tinción con Gram	95	95	82.6	98.7	95
ELISA (ET)	80	54	30.2	91.5	59
ELISA (CagA)	75	75	43	92.3	75
PCR	75	98.8	93.8	94	80

Como pruebas de referencia se emplearon el análisis histológico y el cultivo.

**Ejemplo** de como se calculo  $X^2$  para correlacionar el valor diagnóstico de las pruebas.

	Estudio histológico y/o Cultivo	Ureasa rápida	Tinción con Gram	ELISA (ET)	ELISA (CagA)	PCR	Total
Positivos	20	24	23	53	35	16	171
Negativos	80	76	77	47	65	84	429
Total	100	100	100	100	100	100	600

$$\text{Casos positivos esperados} = \frac{171 \times 100}{600} = 28.5$$

$$\text{Casos negativos esperados} = \frac{429 \times 100}{600} = 71.5$$

$$X^2 \text{ calculada} = \frac{(20 - 28.5)^2}{28.5} + \frac{(24 - 28.5)^2}{28.5} + \frac{(23 - 28.5)^2}{28.5} + \frac{(53 - 28.5)^2}{28.5} + \frac{(35 - 28.5)^2}{28.5} + \frac{(16 - 28.5)^2}{28.5} \\ + \frac{(80 - 71.5)^2}{71.5} + \frac{(76 - 71.5)^2}{71.5} + \frac{(77 - 71.5)^2}{71.5} + \frac{(47 - 71.5)^2}{71.5} + \frac{(65 - 71.5)^2}{71.5} + \frac{(84 - 71.5)^2}{71.5}$$

$$X^2 \text{ calculada} = 45.16$$

$$X^2_{0.01,5} = 15.08$$

Como  $X^2 \text{ calculada} = 45.16 > X^2_{0.01,5} = 15.08$ , se rechaza  $H_0$ . Al menos una de las pruebas no guarda correlación y se confirma que no todas las pruebas tienen el mismo valor diagnóstico.

Al correlacionar cada una de las pruebas con el estándar (de la misma forma como se hizo para el conjunto), se obtuvo que la única que no guarda correlación es la prueba de ELISA con extracto total ( $\alpha=0.01$ ), misma prueba que dio los porcentajes más bajos de eficacia y especificidad (Cuadros 12 y 13).

**Cuadro 13.** Valor de  $X^2$  para las pruebas de ureasa rápida, tinción con Gram, serología y PCR comparadas con el cultivo y/o estudio histológico.  $\alpha=0.01$ ,  $gl = 1$

Prueba diagnóstica	$X^2$ calculada	$X^2_{0.01,1}$	Comparación	Decisión
Ureasa rápida	0.460	6.635	0.460 < 6.635	Se acepta $H_0$
Tinción con Gram	0.249	6.635	0.249 < 6.635	Se acepta $H_0$
ELISA (ET.)	23.48	6.635	23.48 > 6.635	Se rechaza $H_0$
ELISA (CagA)	5.64	6.635	5.64 < 6.635	Se acepta $H_0$
PCR	0.538	6.635	0.538 < 6.635	Se acepta $H_0$

### 6.5.2. Comparación empleando como estándar la positividad a 4 o más pruebas (de las siete evaluadas).

Para calcular el valor diagnóstico de las pruebas empleando este criterio, primero se evaluó la concordancia entre las mismas (Cuadro 14). Dado que no se encontraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.01$ ) empleando  $\geq 3$ ,  $\geq 4$  o  $\geq 5$  pruebas positivas y que, con  $\geq 4$  la concordancia entre las pruebas es del 80% o más (excepto para estudio histológico), se decidió emplear  $\geq 4$  como prueba de referencia.

Cuadro 14. Concordancia de las pruebas diagnósticas para *H. pylori* cuando la infección es definida como  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$  o  $\geq 6$  pruebas positivas.

Prueba diagnóstica	Concordancia (%)			
	Pruebas positivas $\geq 3$ (n = 24)	Pruebas positivas $\geq 4$ (n = 20)	Pruebas positivas $\geq 5$ (n = 18)	Pruebas positivas $\geq 6$ (n = 11)
Invasivas				
Estudio histológico	54.2	60	66.7	81.8
Cultivo	66.7	80	77.8	81.8
Ureasa rápida	100	100	100	100
Tinción con Gram	95.8	100	100	100
PCR	66.7	80	77.8	100
No Invasivas				
ELISA (ET)	83.3	80	88.9	100
ELISA (CagA)	66.7	80	88.9	100

El cálculo de sensibilidad y especificidad, así como valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia de las pruebas; se realizó de la misma forma que el punto anterior. Se calcularon los valores para  $\geq 3$ ,  $\geq 4$  y  $\geq 5$  (Cuadros 15,16,17). Cuando se empleo  $\geq 4$  como referencia, el mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad correspondió a la tinción de biopsia con Gram (100%/96.3%), seguido de la prueba de ureasa rápida (100%/95%), el estudio histológico presentó el valor más bajo de sensibilidad

**Cuadro 15.** Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida tinción de biopsia con Gram, PCR, y serología.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficacia (%)
<b>Pruebas invasivas</b>					
Estudio histológico	54.2	100	100	87.4	89
Cultivo	66.7	100	100	90.5	92
Ureasa rápida	100	100	100	100	100
Tinción con Gram	95.8	100	100	98.7	99
PCR	66.7	100	100	90.5	92
<b>Pruebas no invasivas</b>					
ELISA (ET)	83.3	56.6	37.7	91.5	63
ELISA (CagA)	66.7	75	45.7	87.7	73

Como pruebas de referencia se empleo  $\geq 3$  pruebas positivas.

**Cuadro 16.** Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida tinción de biopsia con Gram, PCR, y serología.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficacia (%)
<b>Pruebas invasivas</b>					
Estudio histológico	60	98.8	92.3	90.8	91
Cultivo	80	100	100	95.2	96
Ureasa rápida	100	95	83.3	100	96
Tinción con Gram	100	96.3	87	100	97
PCR	80	100	100	95.6	96
<b>Pruebas no invasivas</b>					
ELISA (ET)	80	53.8	30.2	91.5	59
ELISA (CagA)	80	76.3	45.7	93.8	77

Como pruebas de referencia se empleo  $\geq 4$  pruebas positivas.

**Cuadro 17.** Sensibilidad y especificidad del estudio histológico, cultivo, ureasa rápida tinción de biopsia con Gram, PCR, y serología.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficacia (%)
<b>Pruebas invasivas</b>					
Estudio histológico	66.7	99.8	92.3	93.1	93
Cultivo	77.7	97.6	87.5	95.2	94
Ureasa rápida	100	92.7	75	100	94
Tinción con Gram	100	93.9	78.3	100	95
PCR	77.7	97.6	87.5	95.2	94
<b>Pruebas no invasivas</b>					
ELISA (ET)	88.9	54.9	30.2	95.7	61
ELISA (CagA)	88.9	76.8	45.7	96.9	79

Como pruebas de referencia se empleo  $\geq 5$  pruebas positivas.

(60%) aunque alta especificidad (98.8%). Las pruebas se ELISA dieron el mismo porcentaje (80%) de sensibilidad, sin embargo la especificidad de CagA (76.3%) fue mayor que la de extracto total (53.8%).

Al correlacionar las pruebas con la prueba de referencia ( $\geq 4$  pruebas positivas), se obtuvo que la única que no guarda correlación es la prueba de ELISA con extracto total ( $\alpha=0.01$ ).

**Cuadro 18.** Valor de  $\chi^2$  para el estudio histológico, cultivo, prueba de ureasa rápida, tinción con Gram, PCR y ELISA (extracto total y proteína CagA) comparadas con  $\geq 4$  pruebas positivas.  $\alpha=0.01$ ,  $gl = 1$

Prueba diagnóstica	$\chi^2$ calculada	$\chi^2_{0.01,1}$	Comparación	Decisión
Pruebas invasivas				
Estudio histológico	1.778	6.635	1.778 < 6.635	Se acepta $H_0$
Cultivo	0.542	6.635	0.542 < 6.635	Se acepta $H_0$
Ureasa rápida	0.466	6.635	0.466 < 6.635	Se acepta $H_0$
Tinción con Gram	0.266	6.635	0.266 < 6.635	Se acepta $H_0$
PCR	0.542	6.635	0.542 < 6.635	Se acepta $H_0$
Pruebas no invasivas				
ELISA (ET.)	23.49	6.635	23.49 > 6.635	Se rechaza $H_0$
ELISA (CagA)	5.64	6.635	5.64 < 6.635	Se acepta $H_0$

## 6.6. COMPARACION DEL DIAGNOSTICO CLINICO, HALLAZGOS ENDOSCOPICOS E HISTOLOGICOS CON LA INFECCION POR *H. pylori*

La comparación del diagnóstico clínico, hallazgos endoscópicos e histológicos con la infección por *H. pylori* se realizó tomando en cuenta que los pacientes infectados son los que dieron  $\geq 4$  pruebas positivas. No se observó un diagnóstico clínico que estuviera fuertemente asociado a la infección, 50% de los pacientes infectados presentaron síndrome ácido péptico, sin embargo el 45% de los que fueron negativos tuvieron este mismo diagnóstico (Cuadro 19).

Por endoscopia se obtuvo la gastritis nodular fue el hallazgo que estuvo fuertemente asociado a infección, 90% de los pacientes infectados presentaron gastritis nodular, en tanto que este patrón se presentó sólo en el 8.8% de los casos negativos (Cuadro 20).

**Cuadro 19.** Comparación del diagnóstico clínico con la infección por *H. pylori*, considerando  $\geq 4$  pruebas positivas.

Diagnóstico clínico	H. pylori (+) (n = 20) No. (%)	H. pylori (-) (n = 80) No. (%)
Dolor abdominal recurrente	7 (35)	24 (30)
Síndrome ácido-péptico	10 (50)	36 (45)
Evaluación postfunduplicación	6 (30)	14 (17.5)
Antecedente de infección por <i>H. pylori</i>	9 (45)	4 (5)
Sangrado de tubo digestivo alto	1 (5)	4 (5)
Gastropatía congestiva	1 (5)	—
Diarrea prolongada	—	—
Sin antecedente de problema digestivo	1 (5)	3 (3.8)

**Cuadro 20.** Comparación de los hallazgos endoscópicos e histológicos con la infección por *H. pylori*, considerando  $> 4$  pruebas positivas.

	H. pylori (+) (n = 20) No (%)	H. pylori (-) (n = 80) No. (%)
<b>Endoscopia</b>		
Esofagitis	12 (60)	53 (66.3)
Hernia hiatal	3 (15)	6 (7.5)
Hiato laxo	6 (30)	30 (37.5)
Gastritis	3 (15)	43 (53.8)
Gastritis nodular	18 (90)	7 (8.8)
Úlcera gástrica	2 (10)	—
Duodenitis	6 (30)	25 (31.3)
Normal	—	7 (8.8)
<b>Estudio histológico</b>		
Esofagitis crónica	1 (5)	4 (5)
Gastritis crónica	7 (35)	20 (25)
Gastritis activa	13 (65)	—
Duodenitis crónica	1 (5)	4 (5)
Sin alteraciones	2 (10)	55 (68.8)

## 7. DISCUSION

La infección por *H. pylori* ha sido establecida como factor etiológico importante en la enfermedad ácido-péptica en niños y adultos. Los estudios realizados en poblaciones pediátricas, han incluido pacientes de hasta 17 o 18 años de edad.<sup>16,22,25,81</sup> En el presente trabajo se incluyeron pacientes de 0-17 años, debido a que la edad pediátrica considerada en el HGCM-"La Raza".

Se ha reportado que el nivel socioeconómico esta relacionado con la adquisición de la infección, siendo más frecuente en personas con bajo nivel socioeconómico.<sup>132</sup> El grupo de trabajo en fisiología gastrointestinal de Perú-Baltimore (1990)<sup>155</sup> realizó un estudio para evaluar la relación entre edad, sexo, y nivel socioeconómico, encontrando un mayor predominio de la infección en los pacientes que fueron atendidos en los hospitales públicos, que en los hospitales privados; un mayor porcentaje de infectados al incrementar la edad de la población estudiada, no encontrando prevalencia de la infección relacionada al sexo.<sup>132,155</sup>

En este trabajo, se observó que un alto porcentaje (71%) de las familias de los niños estudiados que percibió salarios mínimos. No se encontró prevalencia de trastornos gástricos relacionada al sexo, de los 100 casos atendidos, 44% fueron niñas y 56% fueron niños. Los pacientes positivos a la infección por *H. pylori* estuvieron distribuidos en todas las edades el número de casos positivos así como la respuesta de IgG anti-*H. pylori* incrementó de manera proporcional con la edad del paciente. Esto coincide con los datos reportados en la población mexicana.<sup>140,159</sup> Los 7 casos positivos a todas las pruebas se encontraron distribuidos entre los 2 a 17 años de edad.

Sarker, *et al.* (1997) reportaron que los hijos de madres analfabetas tienen un 2.5% más riesgo a contraer la infección que los hijos de madres que saben leer y escribir.<sup>148</sup>

El 65% de los padres de los niños aquí estudiados curso la educación media básica y, aunque no se trata de padres analfabetas, el bajo nivel educativo repercute en la mala higiene de los niños (en varios de los pacientes atendidos se observaron deficiencias en la higiene personal).

Entre los factores de riesgo que favorecen la infección por *H. pylori* se encuentran: el consumo de agua y alimentos contaminados, así como el tipo de alimento.<sup>95,120</sup> En la población aquí estudiada, el 71% de los padres entrevistados dijo tener casa propia o vivir con algún familiar, contar con todos los servicios, tener cuidado en la preparación de los alimentos y consumir agua hervida o purificada.

Malaty, *et al.* (1994)<sup>148</sup> reportaron que la infección por *H. pylori* esta relacionada con factores genéticos y ambientales, no obstante que no se trabajo con familias completas se obtuvieron datos que concuerdan con este reporte; uno de los pacientes estudiados que resultó ser positivo a infección por *H. pylori* dijo tener un hermano gemelo con problemas gástricos, se solicitó autorización de la madre para incluirlo en el estudio y resultó ser uno de los pacientes que dieron positivas a todas las pruebas. Algo similar sucedió con uno de los hermanos y los padres de dos de los pacientes estudiados, debido a que presentaban problemas gástricos y no respondían al tratamiento se solicitó el estudio de la familia completa (los padres y 3 hijos) resultando todos positivos por pruebas serológicas, además de identificar la presencia del microorganismo por prueba de ureasa rápida e impronta teñida con Gram en el padre y uno de los hijos. Estos datos comprueban también la prevalencia intrafamiliar de la infección, reportada por Mendall, *et al.* (1992).<sup>102</sup>

En los niños infectados con *H. pylori* es común la dispepsia no ulcerosa y algunos presentan dolor abdominal severo, observándose una disminución de los síntomas una vez que la infección con *H. pylori* ha sido erradicada.<sup>34,57,140</sup> Kansau, *et al.* (1996) en un estudio realizado en niños, encontraron que el 48% de los niños infectados con *H. pylori* presentó dolor abdominal recurrente.<sup>76</sup> Sin embargo no existe consenso entre el porcentaje de niños infectados y el dolor abdominal recurrente, ya que se han reportado valores de 8-80%<sup>76,140</sup>



En la presente investigación, el 31% de los niños estudiados presentó dolor abdominal, siendo éste, junto con el síndrome ácido péptico las principales causas por las que se realizó el estudio endoscópico.

Goodwin (1997) reportó que en los niños, cuando la primera infección con *H. pylori* se da antes de los 5 años, usualmente ocurre una inflamación de la mucosa gástrica con daño a las células productoras de ácido trayendo consigo una disminución de la producción de ácido y no generando úlcera; sin embargo cuando la adquisición de la infección se da después de los 5 años las células productoras de ácido han madurado y no se inflaman pero se produce metaplasia que puede causar duodenitis.<sup>57</sup>

Al realizar el estudio endoscópico se observó que el 100% (24/24) de los niños infectados con *H. pylori* (diagnosticados por pruebas microbiológicas) presentaron gastritis y solo 8.2% (2/24) presentó úlcera. Este es un resultado esperado en los niños ya que la formación de úlcera es el resultado de un proceso crónico y se ha visto que las úlceras llegan a formarse después de meses e incluso décadas de haberse adquirido la infección. El análisis histológico reportó 40% de los pacientes con gastritis crónica, sin embargo en el 27% no se observó la presencia del microorganismo, esto coincide con lo reportado por Goodwin (1997)<sup>57</sup> quien observó que la inflamación de una mucosa gástrica, no necesariamente revela una infección con *H. pylori*. Datos similares fueron encontrados en adultos por Bazet, *et al.* (1997)<sup>14</sup>, en donde sólo el 50% de los pacientes positivos presentaron gastritis crónica.

El cultivo y el estudio histológico fueron los primeros métodos considerados como "estándar de oro" en el diagnóstico de infección por *H. pylori*, sin embargo dada su baja sensibilidad en niños y la forma de colonización de la mucosa gástrica (en parches), se han estado buscando métodos alternativos no invasivos con un alto grado de sensibilidad y especificidad, que puedan ser aplicados a la población pediátrica y a la fecha no existe consenso acerca de cual es el más adecuado.<sup>24,32,74</sup>

El cultivo y el estudio histológico, requieren de una biopsia gástrica para su realización y la endoscopia (no obstante ser un procedimiento caro y agresivo) es el único método hasta ahora conocido, mediante el cual se puede ver directamente la mucosa gástrica y obtener biopsia. En el presente estudio no se partió del hecho de realizar endoscopia para buscar *H. pylori*, sino de evaluar cual es la prevalencia de la infección en esta población, ver que síntomas y alteraciones de la mucosa gástrica están más asociados a la infección, contar con los parámetros de referencia necesarios para evaluar y comparar las pruebas de: ureasa rápida, tinción de biopsia con Gram y serología, que son métodos más sencillos, rápidos y económicos (comparados con los dos anteriores).

Al comparar las pruebas microbiológicas, se obtuvo un mayor porcentaje de positivos a prueba de ureasa rápida (24%) y tinción de biopsia con Gram (23%) en relación al cultivo (16%); resultados similares fueron reportados por Bazet, *et al.* (1997)<sup>14</sup> quienes evaluaron una población adulta obteniendo 53.3% positivos a Clotest, 52.5% positivos a tinción de biopsia con Gram y 46.9% positivos al cultivo. Yoshida, *et al.* (1998)<sup>181</sup> evaluaron 114 adultos, logrando aislar *H. pylori* en 57% de los casos, porcentaje menor al de positivos con la tinción de biopsia con Gram (58%) o la prueba de ureasa rápida (62%).

La tinción de biopsia con Gram dió un mayor porcentaje (23%) de positivos que el cultivo (16%), esto plantea la duda de si pudieron ser falsos positivos (morfologías similares de especies diferentes), o bien si fueron fallas en el cultivo. En favor de la primera hipótesis apunta el hecho de que se trate de otras bacterias con las mismas características morfológicas pero con diferentes características de cultivo, sin embargo a excepción de otras especies de *Helicobacter* la literatura no ha reportado la presencia de otros microorganismos colonizando mucosa gástrica<sup>64,117</sup> En favor de la segunda hipótesis, apunta el hecho de que *H. pylori* es un microorganismo difícil de cultivar y son muchos los factores que pueden afectar su desarrollo en cultivo. Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, Bazet *et al* (1997)<sup>14</sup> encontraron que las muestras positivas por tinción de Gram y cultivo negativo, fueron también positivas a prueba de ureasa rápida, esta discrepancia en los resultados fue atribuida a la falla en el cultivo o a la mala toma de muestra.

Un resultado positivo a ureasa rápida y negativo a cultivo y tinción de Gram puede atribuirse a la presencia de otros microorganismos ureasa positivos, tales como *Proteus*, *Campylobacter nitrofigilis*, *Streptococcus viridans* o *Staphylococcus coagulasa negativo*<sup>14</sup>. Una de las biopsias dio positiva a ureasa rápida y negativa a cultivo y tinción con Gram, sin embargo ninguno de los microorganismos antes mencionados fue aislado a partir de la biopsia, y el resultado del estudio histológico fue positivo, atribuyendo la discrepancia nuevamente a la toma de muestra y a la distribución no uniforme de la bacteria en la mucosa gástrica. Por otro lado Clyne, *et al.* (1995)<sup>27</sup> reportaron que la hipoclorhidria causada por el mismo *H. pylori* puede ser una causa que limite su crecimiento y que al cambiar el pH pueda sobrevivir en una forma no cultivable.

La ureasa rápida y la tinción de biopsia con Gram fueron las técnicas que presentaron el mayor porcentaje de sensibilidad (100%/95%, con histología/cultivo como referencia y 100%/100%, considerando  $\geq 4$  pruebas positivas) y especificidad (95%/95%, con histología/cultivo como referencia y 95%/96.3%, considerando  $\geq 4$  pruebas positivas).

Bazet, *et al.* (1997)<sup>14</sup> y Neiger, *et al.* (1998)<sup>14</sup> reportaron que la tinción de biopsia con Gram puede usarse como una técnica útil y rápida en el diagnóstico de infección por *H. pylori*. En el presente estudio, tomando como referencia  $\geq 4$  pruebas positivas de las 7 evaluadas, se obtiene que el mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad (100%/96.3) corresponde precisamente a esta prueba. Cutler *et al.* (1995) compararon estudio histológico con tinción por Wrtin-Starry, prueba de ureasa rápida, serología y prueba de aliento, obteniendo mayor sensibilidad y especificidad para la tinción con Wartin-Starry (93.1%/99%) que para las demás pruebas. Esto sugiere que la tinción de biopsia con Gram puede ser un buen método que ayude a confirmar el diagnóstico de infección por *H. pylori*.

El aislamiento de *H. pylori* a partir de heces, así como la identificación de la bacteria mediante PCR ha sido previamente reportada.<sup>24,35,80,156</sup> Por otro lado Perkins, *et al.*

(1996)<sup>126</sup> reportaron el aislamiento de *H. pylori* a partir de saliva de gatos infectados, además de identificarlo en saliva y placa dentobacteriana por medio de PCR.

El no lograr el aislamiento de *H. pylori* de materia fecal ni de placa dentobacteriana fue atribuido a varios factores:

- i) No todos los pacientes cooperaron llevando la muestra de materia fecal y aunque se trató de tomarla en el hospital no se tuvo la colaboración del paciente en todos los casos.
- ii) Si el aislamiento a partir de biopsia, en donde se detecta una mayor densidad bacteriana y menor número de contaminantes es un tanto difícil, el aislamiento a partir de materia fecal, en donde se encuentran gran cantidad de bacterias resultó ser todavía más complicado y aunque se siguió una modificación del método empleado por Kelly, *et al.* (1994)<sup>80</sup> y Thomas, *et al.* (1992)<sup>156</sup> y el medio de cultivo suplementado con antibióticos, sólo se desarrollaron microorganismos característicos de muestras de materia fecal, tales como *E. coli*.
- iii) El pH de la boca así como el de las heces, es mayor que el del estómago y esta pudiera ser otra razón por la cual no se logró el aislamiento de *H. pylori* de materia fecal ni de placa dentobacteriana. Clyne, *et al.* (1995)<sup>27</sup> reportaron que la dependencia de un pH ácido para su supervivencia, puede explicar el porque *H. pylori* raramente ha sido aislado de otros sitios no ácidos, aunque su presencia haya sido demostrada por otros métodos tales como el PCR.

La prueba de ELISA ha sido uno de los métodos de diagnóstico más empleados sobre todo en los estudios epidemiológicos, ya que además de ser un método menos traumático que la endoscopia es más económico.<sup>13,16</sup>

En México se ha reportado 20-40% de seropositividad en niños menores de 5 años.<sup>131,137,159</sup> En el presente trabajo se encontró que con extracto total como antígeno, el 52% (16/31) de los niños menores de 6 años fueron seropositivos; mientras que cuando se emplea CagA como antígeno se encuentra seropositividad sólo el 29% (9/31).

La serología como método de diagnóstico sobre todo cuando se trabaja con niños, debe de interpretarse con cuidado, ya que como lo reportaron Khanna, *et al.* (1998) los resultados de las pruebas de ELISA van a variar no solo en función del antígeno que se empleo, sino también en función de que muestras se emplearon en la estandarización, si se trabajo con cepas y sueros obtenidos de niños o bien si se trabajo con adultos.<sup>81</sup>

Las pruebas microbiológicas se compararon con la serología observando que, el caso más discrepante lo representó la población menor de 3 años, ya que por serología se detectaron 60% (9/15) positivos ELISA con extracto total y 40% (6/15) positivos a CagA, en tanto que las pruebas microbiológicas solo identificaron el 7% (1/15).

Los títulos de anticuerpos contra CagA correlacionaron mejor con la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica, ya que los pacientes que dieron positivas dos o más pruebas microbiológicas fueron los que presentaron los títulos más altos de anticuerpos (4-23 U ELISA) contra CagA. Resultados similares fueron reportados por Yoshida, *et al.* (1998).<sup>159</sup> Mitchell (1999)<sup>106</sup> realizando un estudio con sueros de niños australianos y chinos, encontró que en los primeros la respuesta a CagA correlacionaba en un 100% con pacientes con enfermedad úlcero-péptica sin embargo, encontró anticuerpos contra CagA en 81.8% de los niños chinos asintomáticos.

El hecho de que los títulos de CagA correlacionen mejor con las pruebas microbiológicas se atribuye a lo reportado por Witherell, *et al.* (1997)<sup>176</sup> quién observó que los pacientes infectados con cepas CagA<sup>+</sup> presentan mayor densidad bacteriana que los infectados por cepas CagA<sup>-</sup> y por ello es posible que sean más fáciles de identificar en el Gram directo y los cultivos sean positivos.

A excepción de una niña de 2 años, los pacientes que dieron positivas a todas las pruebas presentaron títulos mayores a 10 U ELISA contra CagA y superiores a 4 U ELISA cuando se enfrentaron contra extracto total. Esto es esperado debido a que todos los pacientes

infectados con cepas CagA<sup>+</sup> desarrollan respuesta serológica a la proteína de 128 KDa y presentan mayor densidad bacteriana.<sup>163,176</sup>

En los países desarrollados las cepas CagA<sup>+</sup> se presentan en 60% de los casos, sin embargo en los países en vías de desarrollo esto parece ser más alto.<sup>18,143</sup> En este caso aunque no de determinó por PCR cuántas de las cepas aisladas son CagA<sup>+</sup>, por la respuesta de anticuerpos contra CagA se obtuvo que 81% (13/16) de los pacientes en los que se aisló *H. pylori* presentaron anticuerpos contra CagA, por lo que se puede pensar que el 81% de las cepas aisladas podrían ser CagA<sup>+</sup>

Well, *et al.* (1996) reportó el aislamiento de *H. pylori* CagA<sup>+</sup> en el 98.3% de los pacientes que presentaron anticuerpos contra CagA, propone que los anticuerpos contra CagA pueden ser usados para averiguar si *H. pylori* esta expresando CagA. Además observó una mayor prevalencia de *H. pylori* CagA<sup>+</sup> (93.4%) en pacientes con enfermedad ulcero péptica que en pacientes con dispepsia funcional (64%).<sup>171</sup>

Covacci, *et al.* (1993) reportaron que 75.3% de los pacientes con enfermedad gastroduodenal y 100% de los pacientes con úlcera duodenal presentaron anticuerpos contra un fragmento recombinante de la proteína CagA y que pacientes con patología gastroduodenal presentaron títulos de anticuerpos significativamente más altos que los pacientes con mucosa gástrica normal.<sup>30</sup> Por otro lado, el gen *cagA* se ha detectado más en aislamientos de pacientes con úlcera péptica que en pacientes que solo presentan gastritis crónica.<sup>143</sup> Esto revierte particular interés porque los pacientes en los que se detectaron anticuerpos contra CagA, podrían desarrollar úlcera péptica si no son tratados a tiempo.

Dado que en la inmunoelectrotransferencia se detectaron una serie de bandas (101 a 133 Kda) que fueron reconocidas por los pacientes que dieron positiva al menos a una prueba microbiológica, éstas pudieran ser empleadas como prueba diagnóstica, a reserva de que se confirme su relación con la colonización. Karvar, *et al.* (1997)<sup>78</sup> realizaron inmunoelectrotransferencia con sueros de pacientes infectados con *H. pylori* e identificaron,

el reconocimiento de varias proteínas que ellos clasificaron como: bajo (22-33 KDa), mediano (43-66 KDa) y alto (87-128kDa) peso molecular; ubicando en el primer grupo a UreA (30 KDa) y en el último a CagA (128 KDa) y VacA (87 Kda), sugiriendo la inmunoelectrotransferencia como un método diagnóstico más específico que las pruebas de ELISA.

Johansen, *et al.* (1995) detectaron la presencia de antígenos de reacción cruzada en pacientes con fibrosis quística infectados con *H. pylori*, ellos analizaron los sueros de estos pacientes y encontraron antígenos de reacción cruzada entre *H. pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*, sugiriendo que al menos en este tipo de pacientes se debe tener cuidado cuando se obtienen títulos elevados de anticuerpos contra extracto total ya que puede tratarse de falsos positivos.<sup>71</sup> En el caso de la banda común obtenida en la población estudiada habría que realizar inmunoelectrotransferencia para verificar que se trata de un antígeno de reacción cruzada y ver con que microorganismos estaría cruzando. Si se analizan los resultados obtenidos en la  $\chi^2$ , se observa que la única prueba que no correlacionó con el estándar fue la prueba ELISA con extracto total y esto pudiera deberse a lo antes mencionado.

La PCR ha sido una técnica muy empleada para evaluar la presencia de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas, jugo gástrico, placa dentobacteriana, saliva y heces. Con esta técnica ha sido reportada la presencia de *H. pylori*, cuando los cultivos de biopsias resultan ser negativos.<sup>35,52,126,181</sup>

La PCR resultó ser la prueba con la mayor especificidad (98.8%); sin embargo parece tener baja sensibilidad (75%), esto puede ser atribuible a que se tenga una densidad bacteriana muy baja, ya que se tuvo que correr un doble PCR y aún así en 3 de los pacientes en los que se identificó la presencia de *H. pylori* por histología y/o cultivo no se logró amplificar el producto esperado, la toma de muestra pudiera ser otro factor que justifique la baja sensibilidad ya que fueron biopsias diferentes las que se emplearon para cada una de las pruebas.

La PCR es una herramienta de la biología molecular que se ha considerado tan específica como el cultivo, para el diagnóstico de infección por *H. pylori* no obstante, en este caso se debe de incrementar su potencial de sensibilidad. El haber identificado el gen *VacA*, indica que el microorganismo está presente, ya que *VacA* es un gen constitutivo y se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo esto no nos dice si la cepa es capaz o no de inducir vacuolización en las células de la mucosa. La detección del gen *vacA* correlacionó en un 82% (9/11) con los pacientes en los que se obtuvieron los títulos más altos de anticuerpos y se logró el aislamiento del microorganismo por cultivo.

Los ensayos de PCR no obstante ser muy específicos, presentan el inconveniente de que son muy costosos y no están disponibles en varios países en vías de desarrollo, en donde el cultivo es una técnica más accesible.

Yoshida, *et al.* (1998) reportaron un ensayo de PCR en jugo gástrico, en el cual la muestra fue adsorbida con fibras de nylon encapsuladas, obteniendo muestras de jugo gástrico de hasta 0.5 ml (suficiente para un ensayo de PCR), observando además una buena correlación al ensayar el PCR de jugo gástrico con el cultivo y de presentar la ventaja de una toma menos traumática que la endoscopia,<sup>181</sup> La PCR a partir de jugo gástrico es una posibilidad que se podría ensayar en niños, lo cual evitaría la toma de biopsia y por lo tanto disminuiría la contaminación por el uso de material contaminado.

La PCR así como sus variantes han sido empleadas no sólo para diagnóstico sino también para evaluar la variabilidad genética y esto ha sido aplicado en la población pediátrica. Kansau, *et al.* (1996)<sup>76</sup> empleando PCR-RAPD identificó la infección por *H. pylori* en una población infantil, éste método además de servirle como método diagnóstico, le permitió observar la variabilidad de las cepas de los pacientes.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas, sobre todo en el caso de las pruebas serológicas dieron porcentajes menores (80% sensibilidad / 54% especificidad para extracto



total y 75% sensibilidad / 75% especificidad para CagA) a los reportados por otros autores. Ramírez, *et al.* (1997)<sup>132</sup> reportaron el uso de una prueba de ELISA con extracto crudo como antígeno (sensibilidad 84% y especificidad 92%) para diagnosticar infección con *H. pylori*. En este trabajo se obtuvo incluso que los valores de sensibilidad y especificidad fueron más bajos a los reportados por Camorlinga, *et al.* (1998)<sup>22</sup>, quienes también trabajaron con niños en el Centro Médico Nacional Siglo XXI y obtuvieron mayores porcentajes de sensibilidad y especificidad tanto para extracto total (85% de sensibilidad, 87% de especificidad) como para proteína CagA recombinante (83% de sensibilidad, 97% de especificidad). Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a varios factores:

- i) En el caso de la discrepancia con el estudio de Ramírez pudo deberse al antígeno usado, que como ya se comentó antes, la sensibilidad y especificidad va a variar en función del antígeno y las condiciones bajo las cuales se estandarizó y se realizó el ensayo.
- ii) En el caso de la discrepancia con los resultados de Camorlinga *et al.* no obstante la ELISA se realizó empleando el mismo antígeno, las pruebas microbiológicas así como la toma de muestra fueron realizadas en lugares diferentes, con personal diferente y bajo diferentes condiciones pudiéndose tener aquí las diferencias más significativas, ya que si se compara el total de positivos a cultivo y/o histología (20) con el total de positivos a serología (53 para extracto total y 35 para CagA) la diferencia sobre todo en el caso de extracto total es de más del 50%.
- iii) La toma de muestra es un punto importante para justificar la discrepancia de los resultados cuando no se detecta la infección por todos los métodos. Definitivamente para mejorar la sensibilidad de las pruebas invasivas se debería de incrementar el número de biopsias tomadas, sin embargo en el caso de los niños no se recomienda tomar tantas muestras, ya que no es ético.

Por otro lado aún con las discrepancias en los valores de sensibilidad y especificidad con respecto a otros estudios; de el análisis con  $X^2$  se obtuvo que: a excepción de la prueba de ELISA con extracto total, si un paciente en edad pediátrica con trastornos gástricos esta infectado con *H. pylori*, este puede ser diagnosticado por cualquiera de las pruebas aquí evaluadas ( $\alpha = 0.01$ ). Sugiriendo como ya se ha hecho en otros reportes<sup>105</sup>, que las pruebas

serológicas se utilicen como prueba tamiz, sobre todo en aquellos lugares en los que no se tenga acceso a la endoscopia y que si se obtienen resultados positivos, se procure confirmar el diagnóstico por pruebas micorbiológicas, sobre todo si se tienen pacientes CagA<sup>+</sup>.

Blaser (1997)<sup>19</sup> cuestionó muy acertadamente, si todos los pacientes infectados con *H. pylori* deberían o no recibir tratamiento de erradicación, ya que no todas las de *H. pylori* son igualmente patógenas y propuso que sean precisamente en los que se detecte la presencia de cepas patógenas los que deban de recibir tratamiento; y para ello es muy importante que se tenga un diagnóstico bien realizado con la identificación de dichas cepas.

Hasta ahora la histología y el cultivo, 4 semanas después del tratamiento, es lo que más se ha empleado para evaluar la erradicación de la infección. Sin embargo definitivamente el método para evaluar erradicación debería de ser un método no invasivo para evitar la contaminación por la ruta iatrogénica, ya que el empleo de un endoscopio mal lavado puede generar reinfección.

Aunque se han realizado notables progresos en el desarrollo de técnicas para la identificación rápida y específica de *H. pylori* es evidente que se requiere de mejoras en este campo. Un método rápido, específico y sensible para la identificación de infección con *H. pylori* puede ser de gran valor sobre todo ahora que se tiene clara su asociación con enfermedades gastrointestinales. Esto es especialmente útil en el caso de la rutina clínica, en donde además hay que evaluar los efectos costo-beneficio.

Consideramos que cada método tiene sus ventajas y desventajas, esto esta relacionado con la especificidad, practicabilidad, flexibilidad, realización, sensibilidad, rapidez y/o costo del ensayo. Dado que no existe un método ideal para la identificación de la infección es obvio que se requiere de la combinación de varios métodos.

La combinación del examen directo (tinción de biopsia con Gram) y ureasa rápida mejora la precisión diagnóstica, en relación a las pruebas por separado, por lo que resultan útiles en el tamizaje dada su fácil realización y bajo costo comparadas con cultivo y estudio histológico.

El cultivo que además de requerir de personal capacitado y ser laborioso, puede ser afectado por múltiples factores y merece ser reservado para casos discrepantes con otras técnicas, para laboratorios de referencia y estudios de sensibilidad a antimicrobianos.<sup>14</sup>

Sin duda alguna el diagnóstico de infección por *H. pylori* mediante pruebas no invasivas ha encontrado en las pruebas de aliento un método muy sensible y específico para el diagnóstico, sin embargo cuando se usa <sup>13</sup>C se requiere de un espectrofotómetro de masas, y este es un equipo muy costoso por lo que se ha introducido la espectroscopía infrarroja usando el mismo principio, aunque a un precio más bajo<sup>65</sup>, y aún así, en México no en todos los hospitales se tiene acceso a ella.

Dada la alta resistencia o reinfección después del tratamiento se ha visto la necesidad de contar con métodos de diagnóstico para identificar si se trata de la misma cepa o bien hubo reinfección con una nueva. Las técnicas de biología molecular tales como el PCR y sus variantes, tales como el RFLP-PCR y RAPD-PCR ayudan a identificar la presencia de diferentes cepas directamente a partir de biopsias y compararlas con los resultados obtenidos a partir del cultivo, para poder identificar las cepas.<sup>95</sup> Finalmente el PCR evita el cultivo y se puede diferenciar entre cepas directamente de biopsia.<sup>2,95</sup>

Una situación grave cuando no se tiene un diagnóstico oportuno sobre todo en la población pediátrica perteneciente a bajo nivel socioeconómico, es que además de los problemas de desnutrición, el problema de las gastritis les impide una correcta absorción de nutrientes y lo poco que consumen es mal aprovechado, generando un adulto con problemas de desnutrición y alteraciones en su desarrollo. Además de incrementar el riesgo a desarrollar úlcera gástrica e incluso cáncer.

## 8. CONCLUSIONES

1. El 100% (16/16) de los niños en los que se aisló *H. pylori* presentaron gastritis antral nodular, indicando que este tipo de alteración es fuertemente sugestivo de infección por *H. pylori*, en 24% (24/100) se diagnosticó la infección por alguna prueba microbiológica.
2. La colonización más temprana fue identificada a la edad de 2 años.
3. Las pruebas serológicas dieron 35% de positividad para CagA y 53% para extracto total por ELISA, la primera con buena correlación diagnóstica ( $p \geq 0.01$ ), creemos que es útil para los hospitales de bajos recursos, la segunda no correlacionó ( $p \geq 0.01$ ) lo que indica que algunos pudieran ser falsos positivos.
4. La sensibilidad y especificidad para tinción de biopsia con Gram (95-100% / 95-96.3%) y prueba de ureasa rápida (100% / 95%) indican que son pruebas diagnósticas presuntivas buenas en donde no se cuente con personal capacitado para el cultivo.
5. Los sueros de los pacientes con títulos de anticuerpos  $\geq 4U$  ELISA contra CagA recombinante, son fuertemente sugestivos de infección por *H. pylori*, en 67% (16/24) correlacionó con diagnóstico de infección en más de una prueba invasiva.
6. Los sueros de los pacientes con pruebas microbiológicas positivas reconocieron por inmunoelectrotransferencia proteínas de peso molecular 101-133 kDa, probablemente relacionadas con antígenos de *H. pylori*.

7. La PCR a partir de biopsias, resultó tener un alto grado de especificidad (98.8-100%) pero baja sensibilidad (75%) atribuible a la baja cantidad de DNA bacteriano en la muestra.
8. No se logró aislar *H. pylori* de placa dentobacteriana ni de materia fecal, quedando todavía mucho por investigar en este aspecto con relación al mecanismo de transmisión de la infección.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## 9. APENDICE

### 10.1. MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

#### 10.1.1. Medio de transporte para biopsias y placa dentobacteriana

Caldo brucella (Bioxón) enriquecido con suero de caballo al 5% y suplemento selectivo para *H. pylori* DENT. (Oxoid SR147E).

#### 10.1.2. Suplemento selectivo para *H. pylori* (DENT.) Oxoid SR147E

Cada vial contiene:

Vancomicina	5.0 mg
Trimetropim lactato	2.5 mg
Cefsulodina	2.5 mg
Anfotericina B	2.5 mg

y es suficiente para suplementar 500 ml de medio.

#### 10.1.3. Agar selectivo para aislamiento de *H. pylori*

Agar Casman (Bioxón) enriquecido con sangre de caballo al 7% y suplemento selectivo para *H. pylori* DENT. (Oxoid SR147E).

#### 10.1.4. Medio para conservación de cepas

Caldo brucella (Bioxón)-sangre de caballo al 50%.

#### 10.1.5. Medio para prueba de Ureasa rápida

Agar bacteriológico (Bioxón) al 0.5%-amortiguador de fosfatos 1.2 mM pH 6.8 - urea 1% - rojo de fenol 0.01%. Modificado de Lennette, E.H. (1993)<sup>84</sup>

## 10.2. REACTIVOS

### 10.2.1. Amortiguador para diluciones de materia fecal

Tris-HCl 0.1M pH 7.4

### 10.2.2. Para tinción de Gram

Solución de Cristal violeta (I.M.S.S.)

Lugol (I.M.S.S.)

Mezcla alcohol-acetona:

50% alcohol-50% acetona.

Solución de safranina:

Safranina 0.25% en etanol al 10%.

### 10.2.3. Para identificación de *Helicobacter pylori*

Catalasa:

Peróxido de hidrógeno: Solución al 3% en agua.

Oxidasa:

Bactident oxidase (Merck 13300).

Ureasa rápida:

Mismo medio para la prueba de ureasa rápida indicado en el punto 10.1.5.

Resistencia a ácido nalidíxico:

Discos de papel filtro de 7 mm de diámetro impregnados con 30 µg de ácido nalidíxico (Sigma N8878). Lennette, E.H. (1993)<sup>84</sup>

### 10.2.4. Para pruebas de ELISA

Amortiguador para dilución y fijación del antígeno a las placas:

Carbonatos 0.05 M pH 9.6

Amortiguador de lavado:

Fosfatos 0.5 M pH 7.2 - timerosal 0.01% - Tween 20, 0.05%. (PBSTT)

Amortiguadores para bloqueo:

PBSTT-gelatina 0.1%

PBSTT-leche descremada 2.5%

Amortiguadores para dilución de sueros de los pacientes:

PBSTT-gelatina 0.1%- $\gamma$  globulina bovina 0.5%

PBSTT-leche descremada 2.5%

Solución de revelado:

p-nitrofenil fosfato (Southern Biotech) en amortiguador de dietanolamina 0.1 M,  
pH 9.8.

### **10.2.5. Para Inmunoelectrotransferencia**

#### **10.2.5.1. PAGE-SDS**

Gel de poliacrilamida:

Tris-base 1.5 M pH 8.8

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Acrilamida-bis acrilamida 30%

SDS 10%

Solución digestora para la muestra:

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 - SDS 2%-glicerol 10%-2 mercaptoetanol 5%-azul de  
bromofenol 0.05%.

Amortiguador de corrida:

Tris-base 0.25 M pH 8.3 - glicina 0.192 M - SDS 0.001%.

#### **10.2.5.2. Electrotransferencia**

Amortiguador de corrida:

Tris-base 0.25 M pH 8.3 - glicina 0.192 M - SDS 0.001%.- Metanol 20%

Solución de negro amido al 0.1%

Negro amido 0.1% - Metanol 45% - ác. acético 10%.

#### **10.2.5.3. Reconocimiento antigénico**

Amortiguador de lavado:

Tris-HCl 0.1M pH 7.4 - Tween 20, 0.05%



Amortiguador para bloqueo:

Tris-HCl 0.1M pH 7.4 - caseinato de calcio 5%

Amortiguador para dilución de sueros de los pacientes:

Tris-HCl 0.1M pH 7.4 - caseinato de calcio 0.5%

Solución de revelado:

4-cloro- $\alpha$ -naftol (Sigma C8890) 0.06%, metanol 20%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.0.15% en amortiguador de trietanolamina 0.02M pH 7.2.

### **10.2.6. Para PCR**

#### **10.2.6.1. Lisis de muestras.**

Amortiguador de lisis:

Tris-HCl 20 mM pH 8.0-Tween 20, 0.5%.

Proteinasas K (Promega) 20 mg/ml. Adicionar 7.5  $\mu$ l a cada 300  $\mu$ l de la solución anterior.

#### **10.2.6.2. Extracción de DNA.**

Fenol (Merck )

Destilado y equilibrado según Sambrouk, J. (1989)<sup>130</sup>

Cloroformo (J.T. Baker)

Alcohol isoamílico (J.T. Baker)

Acetato de sodio (J.T. Baker)

Solución 3M

Alcohol etílico (J.T. Baker)

#### **10.2.6.3. Electroforesis horizontal para DNA en gel de agarosa.**

Amortiguador de corrida (TBE 10X):

Tris-base 16.2% - ác. bórico 0.5% - EDTA 0.95% ajustar a pH 8.3 con HCl.

Solución de tinción:

Solución stock: bromuro de etidio 10 mg/ml (en agua). De esta solución poner 25  $\mu$ l en 250 ml de TBE 0.5X para realizar la tinción.

## 10. REFERENCIAS

1. Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H. *et al.* (1997). Mechanism Involved in *Helicobacter pylori*-Induced Interleukin-8 Production by a Gastric Cancer Cell Line, MKN45. *Infect. Immun.* **65**(8):3218-3224.
2. Akopiants, N.S., Bukanov, N.O., Westblom, T.U. *et al.* (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD finger printing. *Nucleic Acids Research* **20**(19):5137-5142.
3. Allerberger, F., Oberhuber, G., Wrba, F. *et al.* (1996). Detection of *Helicobacter pylori* Infection Using Single Serum Specimens: Comparison of Five Commercial Serological Tests. *Hepato-Gastroenterol.* **43**:1656-1659.
4. Andersen, A.P., Elliot, D.A., Lawson, M. *et al.* (1997). Growth and Morphological Transformations of *Helicobacter pylori* in Broth Media. *J. Clin. Microbiol.* **35**(11):2918-2922.
5. Ando, T., Kusugami, K., Ohsuga, M. *et al.* (1998). Differential Normalization of Mucosal Interleukin-8 and Interleukin-6 Activity after *Helicobacter pylori* Eradication. *Infect. Immun.* **66**(10):4742-4747.
6. Andrutis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B. *et al.* (1995). Inability of an Isogenic Ureasa-Negative Mutant Strain of *Helicobacter mustelae* to Colonize the Ferret Stomach. *Infect. Immun.* **63**(9):3722-3725.
7. Andrutis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B. *et al.* (1997). Infection of the Ferret Stomach by Isogenic Flagellar Mutant Strains of *Helicobacter mustelae*. *Infect. Immun.* **65**(5):1962-1966.
8. Appelmelmelk, B.J., Simoons-Smith, I., Negrini, R. *et al.* (1996). Potential Role of Molecular Mimicry between *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide and Host Lewis Blood Group Antigens in Autoimmunity. *Infect. Immun.* **64**(6):2031-2040.
9. Assous, M., Zone, A., Watne, J. *et al.* (1991). Frozen biopsy specimens and culture rates of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **337**:1412-1413.
10. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M. *et al.* (1996). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **270**(30):17771-17777.
11. Axon, A.T.R. (1997). Transmission of *Helicobacter pylori*. *Yale J. Biol. Med.* **70**:1-6.

12. Barabino, A., Dufour, C., Mariano, C.E. *et al.* (1999). Unexplained refractory iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastric infection in children: further clinical evidence. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(1):116-119.
13. Bardhan, P.K. (1997). Epidemiological Features of *Helicobacter pylori* Infection in Developing Countries. *Clin. Infect. Dis.* **25**:973-978.
14. Bazet, C., Escudero, A., Sendam, M. *et al.* (1997). *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas. *Rev. Mex. Patol. Clin.* **44**(4):211-216.
15. Berquist, W.E. (1998) New, improved *Helicobacter pylori* eradication therapy in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **26**(3):360-361.
16. Best, L.M., Veldhuyzen van Zanten, S.J.O., Sherman, P.M. *et al.* (1994). Serological Detection of *Helicobacter pylori* Antibodies in Children and Their Parents. *J. Clin. Microbiol.* **32**(5):1193-1196.
17. Blanchard, T.G., Czinn, S.J., Maurer, R. *et al.* (1995). Urease-Specific Monoclonal Antibodies Prevent *Helicobacter felis* Infection in Mice. *Infect. Immun.* **63**(4):1394-1399.
18. Blaser, M.J. (1996). Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10**(Suppl.1):73-77.
19. Blaser, M.J. (1997). Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated?. *Lancet* **349**:1020-1022.
20. Bonamico, M., Mariani, P., Magliocca, F.M. *et al.* (1997) *Helicobacter pylori* duodenal colonization in children. *Acta Paediatr.* **86**:356-360.
21. Boren, T., Normark, S. and Falk, P. (1994). *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **2**(7):221-228.
22. Camorlinga, P.M., Torres, J., Perez-Perez, G. *et al.* (1998). Validation of a serological test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and *CagA* in children. *Am. J. Gastroenterol.* **93**(8):1264-1270.
23. Carpintero, P. Blanco, M. and Pajares, J.M. (1997). Ranitidine Versus Colloidal Bismuth Subcitrate in Combination with Amoxicillin and Metronidazole for Eradicating *Helicobacter pylori* in Patients with Duodenal Ulcer. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1032-1037.
24. Casswall, T.H., Nilsson, H.O., Bergstrom, M. *et al.* (1999) Evaluation of serology, <sup>13</sup>C-urea breath, and polymerase chain reaction of stool samples to detect *Helicobacter pylori* in Bangladeshi children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(1):31-36.

25. Celik, J., Su, B., Tirén, U. *et al.* (1998). Virulence and Colonization-Associated Properties of *Helicobacter pylori* Isolated from Children and Adolescents. *J. Infect. Dis.* **177**:247-252.
26. Clyne, M. and Drumm, B. (1996). The Urease Enzyme of *Helicobacter pylori* Does Not Function as an Adhesin. *Infect. Immun.* **64**(7):2817-2820.
27. Clyne, M., Labigne, A. and Drumm, B. (1995). *Helicobacter pylori* Requires an Acidic Environment to Survive in the Presence of Urea. *Infect. Immun.* **63**(5):1669-1673.
28. Corthés-Theulaz, I.E., Hopkings, S., Bachmann, D. *et al.* (1998). Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* phoP<sup>c</sup> Expressing urease A and B subunits. *Infect. Immun.* **66**(2):581-586.
29. Coudron, P.E. and Stratton, C.W. (1995). Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* **33**(4):1028-1030.
30. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M. *et al.* (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:5791-5795.
31. Cover, T.L. (1998). An Intracellular target for *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Trends Microbiol.* **6**(4):127-128.
32. Cutler, A.F., Havstad, S., Ma, C.K. *et al.* (1995) Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **109**(1):136-141.
33. Czinn, S.T. (1999) Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in pediatric patients. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(2):132-134.
34. Chong, S.K.F., Lou, Q., Asnicar, M.A. *et al.* (1995) *Helicobacter pylori* infection in recurrent abdominal pain in childhood: comparison of diagnostic tests and therapy. *Pediatrics* **96**(2):211-215.
35. Chong, S.K.F., Lou, Q., Fitzgerald, J.F. *et al.* (1996). Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **34**(11):2728-2730.
36. DeCross, A.J., Marshall, B.J., McCallum, R.W. *et al.* (1993). Metronidazole susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: Comparison of disk, broth and agar dilution methods and their clinical relevance. *J. Clin. Microbiol.* **31**(8):1971-1974.

37. Delvin, E.E., Brazier, J.L., Deslandres, C. *et al.* (1999) Accuracy of the [<sup>13</sup>C]-urea breath test in diagnosing *Helicobacter pylori* gastritis in pediatric patients. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(1):59-62.
38. Doig, P. and Trust, T.J. (1994). Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**(10):4526-4533.
39. Doig, P., Exner, M.M., Hancock, R.E.W. *et al.* (1995). Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **177**(19):5447-5452.
40. Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(4):720-741.
41. Dunn, B.E., Vakil, N.B., Schneider, B.G. (1997). Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infect. Immun.* **65**(4):1181-1188.
42. Eaton, K.A. and Krakowka, S. (1994). Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**(9):3604-3607.
43. Eaton, K.A., Cover, T.L., Tummuru, M.K.R. *et al.* (1997). Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **65**(8):3462-3464.
44. Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. *et al.* (1996). Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* **64**(7):2445-2448.
45. Enders, G., Brooks, W., von Jan, N. *et al.* (1995). Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins from other bacteria. *Infect. Immun.* **63**(7):2473-2477.
46. Ferrero, R.L., Thiberge, J-M., Huerre, M. *et al.* (1994). Recombinant antigens prepared from the urease subunits of *Helicobacter* spp.: evidence of protection in a mouse model of gastric infection. *Infect. Immun.* **62**(11):4981-4989.
47. Fescina, R., Simini, F., Belitzky, R. (1985). Difusión: Evaluación de los procedimientos diagnósticos, aspectos metodológicos. *Salud Perinatal* **2**(5):39-44.
48. Figueroa, G., Acuña, R., Troncoso, M. *et al.* (1997). *Helicobacter pylori* infection in Chile. *Clin. Infect. Dis.* **25**:983-989.

49. Fox, J.G., Batchelder, M., Marini, R. *et al.* (1995). *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *Infect. Immun.* **63**(7):2674-2681.
50. Franklin, C.L., Beckwith, C.S., Livingstone, R.S. *et al.* (1996). Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J. Clin. Microbiol.* **34**(12):2952-2958.
51. Furuta, T., Kamata, T., Takashima, M. *et al.* (1997). Study of transmission routes of *Helicobacter pylori* in relation to seroprevalence of hepatitis A virus. *J. Clin. Microbiol.* **35**(7):1891-1893.
52. Furuta, T., Taneko, E., Suzuki, M. *et al.* (1996). Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *J. Clin. Microbiol.* **34**(10):2421-2425.
53. Garner, J. and Cover, T.L. (1996). Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**(10):4197-4203.
54. Ghiara, P., Marchetti, M., Blaser, M.J. *et al.* (1995). Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, cagA and urease in a mouse model of disease. *Infect. Immun.* **63**(10):4154-4160.
55. Goldstone, A.R.; Quirke, P. and Dixon, M.F. (1996). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *J. Pathol.* **179**:129-137.
56. Goodwin, S.C. (1997). Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1023-102.
57. Goodwin, S.C. (1997). *Helicobacter pylori* gastritis, peptic ulcer, gastric cancer: clinical and molecular aspects. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1017-1019.
58. Gootz, T.D., Perez-Perez, G., Clancy, J. *et al.* (1994). Immunological and molecular characterization of *Helicobacter felis* urease. *Infect. Immun.* **62**(3):793-798.
59. Graham, D.Y. (1997). *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* **113**(6):1983-1991
60. Grubel, P., Hoffman, J.S., Chong, F.K. *et al.* (1997). Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **35**(6):1300-1303.
61. Guarner, J., Mohar, A., Parsonnet, J. *et al.* (1993). The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* **71**(2):297-301.

62. Handt, L.K., Fox, J.G., Dewhirst, F.E. *et al.* (1994). *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect. Immun.* **62**(6):2367-2374.
63. Handt, L.K., Fox, J.G., Stalis, I.H. (1995). Characterization of feline *Helicobacter pylori* and associated gastritis in a colony of domestic cats. *J. Clin. Microbiol.* **33**(9):2280-2289.
64. Heatley, R.V. and Walt, J.I. (1995). Gastritis y duodenitis pp.635-637. In: Haubrich, W., Schaffner, F. and Berk, J.E. (Ed.) *Gastroenterology* 5th Edn. W.B. Saunders Co. U.S.A.
65. Hildebrand, P. and Beglinger, C. (1997). Nondispersive infrared spectrometry: a new method for the detection of *Helicobacter pylori* infection with the <sup>13</sup>C-urea breath test. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1003-1005.
66. Huang, F.C., Chang, M.H., Hsu, H.Y. *et al.* (1999) Long-term follow-up of duodenal ulcer in children before and after eradication of *Helicobacter pylori*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(1):76-80.
67. Huang, J., O'toole, P. W., Doig, P. *et al.* (1995). Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**(5):1732-1738.
68. Huesca, M., Borgia, S., Hoffman, P. *et al.* (1996). Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect. Immun.* **64**(7):2643-2648.
69. Hunt, R.H. (1996). Management of peptic ulcer disease in the *H. pylori* era. *Gastroenterology Today* **6**(4):166-169.
70. Ito, Y.Y., Azuma, T., Ito, S. *et al.* (1997). Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **35**(7):1710-1714.
71. Johansen, H.K., Norgaard, A., Andersen, L.P. *et al.* (1995). Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers on antibody to *H. pylori*. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* **2**(2):149-155.
72. Jones, N., Bourke, B., Sherman, P.M. *et al.* (1997). Breath testing for *Helicobacter pylori* infection in children: A breath of fresh air. *J. Pediatr.* **131**(6):791-793.

73. Josenhans, C., Labigne, A. and Suerbaum, S. (1995). Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, flaA and flaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J. Bacteriol.* **177**(11):3010-3020.
74. Kalach, N., Briet, F., Raymond, J. *et al.* (1998) The <sup>13</sup>carbon urea breath test for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* in children: comparison with culture and determination of minimum analysis requirements. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **26**(3):291-296.
75. Kamisago, S., Iwamori, M., Tai, T. *et al.* (1996). Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect. Immun.* **64**(2):624-628.
76. Kansau, I., Raymond, J. and Bingen, E. (1996). Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res. Microbiol.* **147**:661-669.
77. Karita, M., Tummuru, M. R., Wirth, H-P. *et al.* (1996). Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* cagA expression. *Infect. Immun.* **64**(11):4501-4507.
78. Karvar, S., Karch, H., Frosch, M. *et al.* (1997). Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by immunoblot analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**(12):3058-3061.
79. Kehler, E. G., Midkiff, B. R. and Westblom, T. U. (1994). Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **32**(6):1597-1598.
80. Kelly, S.M., Pitcher, M.C.L., Farmery, S.M. *et al.* (1994). Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* **107**(6):1671-1674.
81. Khanna, B., Cutler, A., Israel, N.R. *et al.* (1998). Use caution with serologic testing for *Helicobacter pylori* infection in children. *J. Infect. Dis.* **178**:460-465.
82. Kosunen, T.U., Seppala, K., Sarna, S. *et al.* (1992). Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **339**:893-895.
83. Koumans, E.H., Johnson, R.E., Knapp, J.J. *et al.* (1998). Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture test: a performance review with clinical and public health considerations. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1171-1180.
84. Krakowka, S., Eaton, K. A. and Rings, M. (1995). Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**(6):2352-2355.



85. Kumagai, T., Malaty, H.M., Graham, D.Y. *et al.* (1998). Acquisition versus loss of *Helicobacter pylori* infection in Japan: results from an 8-year birth cohort study. *J. Infect. Dis.* **178**:717-721.
86. Kurata, J.H., and Nogawa, A.N. (1997). Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Helicobacter pylori* and smoking. *J. Clin. Gastroenterol.* **24**(1):2-17.
87. Kusters, J.G., Gerrits, M.M. and Van Strijp, J.A.G. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* **65**(9):3672-3679.
88. Labigne, A. and Reuse, H. (1996). Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infectious Agents and Disease* **5**(4):191-200.
89. Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
90. Lage, A.P., Godfroid, E., Fauconnier, A. *et al.* (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* **33**(10):2752-2756.
91. Lee, A. and Chen, M. (1994). Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: use a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine. *Infect. Immun.* **62**(8):3594-3597.
92. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and Shadony, H.J. (1985). Susceptibility test: Diffusion test procedures pp.978-998. Culture media pp.1102-1103,1088. In: Manual of Clinical Microbiology 4th Edn. American Society for Microbiology. U.S.A.
93. León B.R., Berendson S.R., Recavarren A.S. *et al.* (1997). Geographic factors probably modulating alternative pathways in *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal pathology: a hypothesis. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1013-1016.
94. Leverstein, M.A., van der Ende, A., Milligen, W.M. *et al.* (1993). Transmission of *Helicobacter pylori* via faeces. *Lancet* **342**:1419-1420.
95. Li, C., Ha, T., Chi, D.S. *et al.* (1997). Differentiation of *Helicobacter pylori* strains directly from gastric biopsy specimens by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis without culture. *J. Clin. Microbiol.* **35**(12):3021-3025.
96. Luqueño, M.V., Perea, M.L. and López, V.Y. (1994). *Helicobacter* y Bacterias Relacionadas pp.295-307. In: Giono, C.S., Escobar, G.A. and Valdespino, J.L. (Ed.) Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. INDRE, S.S. México.

97. Lizza, F., Contaldo, A., Imeneo, M. *et al.* (1999) Testing for serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated protein detects children with higher grades of gastric inflammation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **29**(3):302-307.
98. Lizza, F., Mancuso, M., Imeneo, M. *et al.* (1999) *Helicobacter pylori* infection in children with celiac disease: prevalence and clinicopathologic features. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(2):143-146.
99. Malaty, H.M., Engstrand, L., Pedersen, N.L. *et al.* (1994). *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. *Ann. Intern. Med.* **120**(12):982-986.
100. Manetti, R., Massari, P., Burrioni, D. *et al.* (1995). *Helicobacter pylori* cytotoxin: Importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies. *Infect. Immun.* **63**(11):4476-4480.
101. Meijer, B.C., Thijs, J.C., Kleibeuker, J.H. *et al.* (1997). Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **35**(1):292-294.
102. Mendall, M. A., Goggin, P. M., Molineaux, N. *et al.* (1992). Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* **339**:896-897.
103. Miller, P.H., Milh, M.A., Teneberg, S. *et al.* (1997). Binding of *Helicobacter pylori* to sialic acid-containing glycolipids of various origins separated on thin-layer chromatograms. *Infect. Immun.* **65**(6):2480-2482.
104. Miller, W.C. (1998). Editorial response: Can we do better than discrepant analysis for new diagnostic test evaluation?. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1186-1193.
105. Misewicz, G. and Harris, A. (1995). Diagnóstico pp.17-20. In: Manual Médico sobre *Helicobacter pylori*. Glaxo de México. Méx.
106. Mitchell, H.M., Hazell, S.L., Bohane, T.D. *et al.* (1999) The prevalence of antibody to CagA in children is not a marker for specific disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(1):71-75.
107. Mitchell, H.M., Hazell, S.L., Kolesnikow, T. *et al.* (1996). Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with a cagA-positive Strain of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **64**(4):1166-1172.
108. Mizote, T., Yoshiyama, H., and Nakazawa, T. (1997). Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect. Immun.* **65**(4):1519-1521.

109. Moayyedi, P., Chalmers, D.M. and Axon, A.T.R. (1997). Patient factors that predict failure of omeprazole, clarithromycin, and tinidazole to eradicate *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol.* **32**:24-27.
110. Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hausinger, R.P. (1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiol. Rev.* **59**(3):451-480.
111. Monteiro, L., Cabrita, J. and Mégraud, F. (1997). Evaluation of performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**(11):2931-2936.
112. Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, G.S. and Thompson, J.H. (1990). *Vibrionaceae* and *Campylobacter* pp.132-136. In: Medical Microbiology. Mosby Co. U.S.A.
113. Nakamura, H., Yoshiyama, H., Takeuchi, H. *et al.* (1998). Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect. Immun.* **66**(10):4832-4837.
114. Neiger, R., Dieterich, C., Burnens, A. *et al.* (1998). Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *J. Clin. Microbiol.* **36**(3):634-637.
115. Nomura, A.; Stemmeemann, G.N.; Chyou, P. H. *et al.* (1991). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among japanese americans in hawaii. *N. Engl. J. Med.* **325**:1132-1136.
116. Oksanen, K., Kainulainen, H., Ruuska, T. *et al.* (1999) Reverse transcription-polymerase chain reaction in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in finnish children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(3):252-256.
117. On, S.L.W. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**(3):405-422.
118. Osaki, T., Taguchi, H., Yamaguchi, H. *et al.* (1998). Detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples of gnotobiotic mice infected with *H. pylori* by an immunomagnetic-bead separation technique. *J. Clin. Microbiol.* **36**(1):321-323.
119. Pappo, J., Thomas, W.D., Kabok, Z. *et al.* (1995). Effect of oral immunization with recombinant urease on murine *Helicobacter felis* gastritis. *Infect. Immun.* **63**(4):1246-1253.
120. Parsonnet, J., Blaser, M. J. and Perez-Perez, G. I. (1992). Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* **102**:41-46.

121. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P. *et al.* (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**(16):1127-1131.
122. Parsonnet, J., Replogle, M., Yang, S. *et al.* (1997). Seroprevalence of *cagA*-positive strains among *Helicobacter pylori*-infected, healthy young adults. *J. Infect. Dis.* **175**:1240-1242.
123. Peek, R.M. and Blaser, M.J. (1997). Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. *Am. J. Med.* **102**:200-207.
124. Perez-Perez, G. Y., Gower, C. A. and Blaser, M.J. (1994). Effects of Cations on *Helicobacter pylori* Urease Activity, Release, and Stability. *Infect. Immun.* **62**(1):299-302.
125. Perez-Perez, G.I., Cutler, A.F. and Blaser M.J. (1997). Value of serology as a noninvasive method for evaluating the efficacy of treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1038-1043.
126. Perkins, S. E., Yan, L. L. Shen, Z. *et al.* (1996). Use of PCR and culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **40**(6):1486-1490.
127. Peura, D.A. (1995) *Helicobacter pylori*: A diagnostic dilemma and a dilemma of diagnosis. *Gastroenterology* **109**(1):313-315.
128. Phadnis, S. H., Parlow, M. H., Levy, M. *et al.* (1996). Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* **64**(3):905-912.
129. Piña, V.G. (1994). Frecuencia de *Helicobacter pylori* en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del Hospital de Infectología del Centro Médico la Raza. Tesis, Lic., México, UNAM, FES-C.
130. Quintana, E.M., Arias, M.L., Salas, P. *et al.* (1998). *Helicobacter pylori*: susceptibility to amoxicillin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, nitrofurantoin and metronidazole in Costa Rica. *Rev. Biomed.* **9**(2):92-96.
131. Ramírez, M.J.A., Rivas, S.S., Cervantes, B.R. *et al.* (1999) Enfermedad ácido péptica y *Helicobacter pylori* en niños. *Acta Pediatr. Méx.* **20**(1):23-29.
132. Ramirez-Ramos, A., Gilman, R.H., Leon-Barua, R. *et al.* (1997). Rapid recurrence of *Helicobacter pylori* infection in peruvian patients after successful eradication. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1027-1031.

133. Rauws, E.A.J. and Tytgat, G.N.J. (1990). Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **335**:1233-1235.
134. Recavarren, S., Gilman, R.H., Leon, R. *et al.* (1997). Chronic atrophic gastritis: early diagnosis in a population where *Helicobacter pylori* infection is frequent. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1006-1012.
135. Ricci, V., Ciacci, C., Zarrilli, R. *et al.* (1996). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric Epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of vacA and cagA. *Infect. Immun.* **64**(7):2829-2833.
136. Rieder, G., Hatz, R.A., Moran, A.P. *et al.* (1997). Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect. Immun.* **65**(9):3622-3630.
137. Robles, D., Dehesa, M., Sánchez, A. *et al.* (1993). Investigation of time and mode of infection by *Helicobacter pylori* in a Mexican population. *Gastroenterology.* **104**(4):A179
138. Rocha de Oliveira, A.M., Rocha, G.A., Queiroz, D.M.M. *et al.* (1999) Evaluation of Enzyme-Linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(2):157-161.
139. Roine, R. P., Salmela, K. S., Hook-Nikane, J. *et al.* (1992). Alcohol dehydrogenase mediated acetaldehyde production by *Helicobacter pylori* a possible mechanism behind gastric injury. *Life Sciences* **51**(17):1333-1337.
140. Roma, E., Panayiotou, J., Kafritsa, Y. *et al.* (1999) Upper gastrointestinal disease, *Helicobacter pylori* and recurrent abdominal pain. *Acta Paediatr.* **88**:598-601.
141. Roosendaal, A., Kuipers, E. J., Pena, A. S. and De Graaff, J. (1995). Recovery of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsy Specimens Is Not Dependent on the Transport Medium Used. *J. Clin. Microbiol.* **33**(10):2798-2800.
142. Rowland, M., Lambert, Y., Garmally, S. *et al.* (1997). Carbon 13-labeled urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J. Pediatr.* **131**(6):815-820.
143. Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M. *et al.* (1998). Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to vacA and cagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* **36**(4):944-948.
144. Rutigliano, V., Ierardi, E., Francavilla, R. *et al.* (1999) *Helicobacter pylori* and nonulcer dyspepsia in childhood: clinical pattern, diagnostic techniques, and bacterial strains. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(3):296-300.

145. Sakaki, N., Arakawa, T., Katou, H. *et al.* (1997). Relationship between progression of gastric mucosal atrophy and *Helicobacter pylori* infection: retrospective long-term endoscopic follow-up study. *J. Gastroenterol.* **32**:19-23.
146. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. (1994). Gastric and duodenal ulcers: An infectious disease? pp.273-278. *Bacterial pathogenesis, a molecular approach.* ASM Press, U.S.A.
147. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Gel electrophoresis of DNA pp.6.3-6.16. *In vitro* amplification of DNA by the polymerase chain reaction pp.14.5-14.34. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes pp.18.45-18.55, 18.64-18.66. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
148. Sarker, S.A., Mahalanabis, D., Hildebrand, *et al.* (1997). *Helicobacter pylori*: prevalence, transmission, and serum pepsinogen II concentration in children of a poor periurban community in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* **25**:990-995.
149. Sauv -Martin, H., Kalach, N., Raymond, J. *et al.* (1999) The rate of *Helicobacter pylori* infection in children with growth retardation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **28**(3):354-355.
150. Schembri, M. A., Lin, S. K. and Lambert, J.R. (1993). Comparison of Commercial Diagnostics Test for *Helicobacter pylori* Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**(10):2621-2624.
151. Skouloubris, S., Thiberge, J.M., Labigne, A. *et al.* (1998). The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect. Immun.* **66**(9):4517-4521.
152. Sobala, G. M., Crabtree, J. E., Pentith, J. A. *et al.* (1991). Screening dyspepsia by serology to *Helicobacter pylori*. *Lancet* **338**:94-96.
153. Solnick, J. V., O'rourke, J., Lee, A. *et al.* (1994). Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *Infect. Immun.* **62**(5):1631-1638
154. The Eurogast Study Group, U.K. (1993). An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* **341**:1359-1362.
155. The Gastrointestinal Physiology Working Group. Perú-Baltimore. (1990). *Helicobacter pylori* and gastritis in peruvian patients: relationship to socioeconomic level, age and sex. *Am. J. Gastroenterol.* **85**(7):819-823.
156. Thomas, J.E., Gibson, G.R., Darboe, M.K. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* **340**:1194-1195.

157. Tirén, U., Sandstedt, B. and Finkel, Y. (1999) *Helicobacter pylori* gastritis in children: efficacy of 2 weeks of treatment with clarithromycin, amoxicillin and omeprazole. *Acta Paediatr.* **88**:166-168.
158. Tomb, J.F., White, O., Keriavage, A.R. *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
159. Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G. *et al.* (1998) A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* **178**:1089-1094.
160. Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, L.C. (1992). Microbiology Highlights: Are ulcers an infectious disease? pp.398. In: Microbiology. Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. U.S.A.
161. Towbin, H., Staehelint and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:4350-4353.
162. Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M. G. *et al.* (1994). A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* **62**(8):3586-3589.
163. Tummuru, M. K. R., Cover, T. L. and Blaser, M. J. (1994). Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**(6):2609-2613.
164. Valkonen, K.H., Wadstrom, T. and Moran, A.P. (1994). Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect. Immun.* **62**(9):3640-3648.
165. Valkonen, K.H., Wadstrom, T. and Moran, A.P. (1997). Identification of the N-acetylneuraminyllactose-specific laminin binding protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**(3):916-923.
166. Van der Ende, A., Rauws, E.A.J., Feller, M. *et al.* (1996). Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **111**:638-647.
167. Van der Wouden, E.J., Van Zwet, A.A., Thijs, J.C. *et al.* (1997). Rapid increase in the prevalence of metronidazol-resistant *Helicobacter pylori* in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* **3**(3):385-389.

168. Vasquez, A., Valdez, Y., Gilman, R.H. *et al.* (1996). Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. *J.Clin. Microbiol.* **34**(5):1232-1234.
169. Veldhuyzen van Z. and Sherma, P.M. (1994). *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis duodenal ulcer, gastric cancer and nonulcer dyspepsia: a systematic overview. *Can. Med. Assoc.* **150**(2):177-185.
170. Wagner, S., Beil, W., Westermann, J. *et al.* (1997). Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* **113**:1836-1847.
171. Weel, J.F.L., van der Hulst, R.W.M., Gerrits, Y. *et al.* (1996). The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J. Infect. Dis.* **173**:1171-1175.
172. Westblom, T.U., Madan, E. and Midkiff, B.R. (1991). Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **29**(4):819-821.
173. Williamson, R., Pipkin, G.A., Dixon, J.S. *et al.* (1997). Approaches to the prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Yale J. Biol. Med.* **70**:7-18.
174. Wirth, H.P., Yang, M., Karita, M. *et al.* (1996). Expression of the human cell surface glycoconjugates lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to cagA status. *Infect. Immun.* **64**(11):4598-4605.
175. Wirth, H.P., Yang, M., Peek, R.M. (1997). *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology* **113**:1091-1098.
176. Witherell, H.L., Hansen, S., Jellun, E. *et al.* (1997). Risk for gastric lymphoma in persons with cagA+ and cagA- *Helicobacter pylori* infection. *J.Infect. Dis.* **176**:1641-1644.
177. Worst, D.J., Otto, B.R. and Graaff, J. (1995). Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect. Immun.* **63**(10):4161-4165.
178. Wu, M.S., Wang, J.T., Yang, J.C. *et al.* (1996). Effective reduction of *Helicobacter pylori* infection after upper gastrointestinal endoscopy by mechanical washing of the endoscope. *Hepato-Gastroenterol.* **43**:1660-1664.



179. Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F. *et al.* (1995). Analysis of Expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**(1):94-98.
180. Yokota, S., Amano, K., Hayashi, S. *et al.* (1997). Low antigenicity of the polysaccharide region of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides derived from tumors of patients with gastric cancer. *Infect. Immun.* **65**(9):3509-3512.
181. Yoshida, H., Hirota, K., Shiratori, Y. *et al.* (1998). Use of a gastric juice-based PCR assay to detect *Helicobacter pylori* infection in culture-negative patients. *J. Clin. Microbiol.* **36**(1):317-320.