

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



**Aislamiento e Identificación de
Campylobacter pylori en Pacientes
con Enfermedad Acido-Péptica.**

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

FALLA DE ORIGEN

presenta:

ANA BERTHA ZUÑIGA ORDOÑEZ

Asesor:

Q.F.B. MA. DEL SOCORRO PULIDO G.

Guadalajara, Jal. Febrero de 1990.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	<u>Pag.</u>
CAPITULO I. INTRODUCCION.....	1
CAPITULO II. GENERALIDADES.....	3
2.1. Aspectos históricos	
2.2. Taxonomía de <u>Campylobacter pylori</u>	
2.3. Aspectos microbiológicos de <u>Campylobacter pylori</u>	
2.3.1. Características morfológicas y coloniales	
2.3.2. Características bioquímicas y fisiológicas	
2.3.3. Características antigénicas	
2.3.4. Fisiopatogenia de las infecciones causadas por <u>Campylobacter pylori</u>	
2.4. Aspectos clínicos y epidemiológicos de las infecciones causadas por <u>Campylobacter pylori</u>	
CAPITULO III. MATERIAL Y METODO.....	18
3.1. Procedencia y selección de las muestras.	
3.2. Toma de la muestra.	
3.3. Metodología microbiológica.	
3.3.1. Microscopía.	
3.3.2. Primoaislamiento.	
3.3.3. Identificación bioquímica.	
3.4. Metodología histológica.	
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	33
CAPITULO V. CONCLUSIONES.....	35
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA.....	41

A DIOS:

A quien le debo todo.

A MIS PADRES:

Por su gran esfuerzo, apoyo, comprensión, cariño y afecto que me brindaron a lo largo de esta trayectoria.

A MIS HERMANOS:

Por su cariño y apoyo que me brindaron siempre.

A MIS MAESTROS:

Por habernos entregado sus conocimientos sin límites.

"Atesorar el conocimiento no es una virtud, sino egoísmo, enseñar y dar a conocer es agigantarse en el espíritu de una vocación sin paralelo".

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Por su apoyo, y por los momentos inolvidables que siempre pasamos. Deseándoles lo mejor y mucho éxito.

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

Los microorganismos pertenecientes al género Campylobacter han ocupado en los últimos años un lugar importante en la literatura médica (9).

Las primeras observaciones de bacterias espirilares en el estómago humano y de animales se remontan a finales del siglo pasado (3).

El hallazgo de estas bacterias a partir de biopsias gástricas ha despertado el comienzo de un capítulo apasionante para la microbiología y la gastroenterología. A estos microorganismos que se logran cultivar de la mucosa gástrica, se les incluye dentro del género Campylobacter (9).

A partir de los trabajos citados, son numerosas las aportaciones sobre la observación y/o el aislamiento de estos gérmenes espirilares en biopsias cuyo estudio histológico evidenciaba gastritis o sobre la investigación de anticuerpos séricos contra C. pylori en pacientes con úlcera péptica o gastritis, y también sobre la identificación antigénica de estas bacterias en tejido gástrico. Más recientemente se han publicado trabajos sobre la identificación rápida de estos microorganismos a partir de biopsias gástricas (3, 23).

En base a la bibliografía existente y a los escasos datos publicados al respecto en nuestro país, consideramos que tanto los aspectos epidemiológicos y patogénicos que son de gran importancia clínica, refuerzan el interés y la necesidad de efectuar un estudio sobre la incidencia de dichos microorganismos en individuos afectos de patología gástrica o duodenal procedentes de nuestro medio.

Debido a que C. pylori se ha encontrado asociado con enfermedad ácido péptica, es de gran importancia poder correlacionar otros estudios con el trabajo que se realizó para comprobar la incidencia del microorganismo en dichas enfermedades, así como el diseño microbiológico de un buen sistema para el aislamiento e identificación de dicha bacteria, tomando en cuenta lo siguiente:

- 1.- Comprobar la incidencia de este organismo asociado a enfermedad ácido péptica.
- 2.- Determinar el medio óptimo para su primoaislamiento tomando en cuenta otros estudios que han reportado su aislamiento en medio no selectivo (agar chocolate) y medio selectivo (medio de Skirrow).
- 3.- Evaluar como medio no selectivo el medio de agar chocolate suplementado y compararlo con el medio selectivo de Skirrow.

CAPITULO II

GENERALIDADES.

2.1. Aspectos históricos.

En 1963, Sebald y Veron propusieron el término Campylobacter (Campylo, curvada; bacter, bastón), para agrupar los hasta entonces denominados "vibriones microaerófilicos" que incluían diversas especies (2).

Según indica Kist, las primeras descripciones de Campylobacter se remontan a principios de siglo, cuando McFadyean y Stockman describen la presencia de microorganismos similares a vibriones en muestras de abortos epizoóticos ovinos (2).

En los años siguientes se suceden una serie de publicaciones que constatan la implicación de estos microorganismos en diversos cuadros patológicos en bovinos y en ganado porcino (2).

Actualmente la implicación de estos gérmenes en la etiopatogenia de las gastritis y de úlcera gastroduodenal se encuentra en discusión en todo el mundo (9).

Más recientemente, Warren y Marshal, observaron y asociaron etiológicamente dichos microorganismos a gastritis y úlcera péptica, relacionando dichas patologías con el aislamiento de Campylobacter. Sugirieron la posibilidad de que se tratase de una nueva especie del género, y emplearon el epíteto específico de pyloridis para designarlos. Tal proposición la basaron principalmente en el sitio anatómico de su primoaislamiento así como en las características morfológicas y de cultivo de estas bacterias, así como su contenido de guanina más citosina de su DNA. Así la taxonomía empleada para esta bacteria fue publicada de acuerdo a sinónimos y enfermedades asociadas con la especie (10).

La gastritis y la úlcera péptica son una gran causa de morbilidad que afecta a numerosos individuos todo el año. La etiología y patogenia de estas condiciones no son por completo extendidas en el presente. El término gastritis incluye un grupo de estados inflamatorios en el estómago diferenciando de acuerdo al área afectada, extensión del daño y tipo de células inflamatorias presentes. Las bases fisiopatológicas de la úlcera péptica no están enteramente claras, pero esta idea ha sido relacionada con un relativo balance en la producción de ácido y la resistencia de la mucosa que cubre el epitelio gástrico. El estrés y otros factores no conocidos son causas que afectan este balance relativo (4).

Las úlceras pépticas desarrollan cuando hay un desbalance entre la pepsina ácido-gástrica y la resistencia de la mucosa. Dicho balance puede perderse cuando se incrementa la secreción de pepsina-ácida, baja la resistencia de la mucosa o una combinación de las dos (8).

Con estos datos, cada vez existe una mayor evidencia de que C. pylori puede ser un patógeno importante en la etiología de las gastritis y de la úlcera gastroduodenal (9).

La investigación respecto al tratamiento de la úlcera péptica se ha enfocado al exceso de acidez. Recientemente los investigadores han empezado a examinar los factores que pueden debilitar las defensas del epitelio gástrico (8).

Uno de los probables factores es la infección por C. pylori. Esta bacteria tiene una capacidad única para modificar el ambiente del estómago e interfiere con la protección local de la mucosa contra el ácido. Esta ataca e inflama el epitelio gástrico, y como la digestión de la capa protectora de moco crea áreas de mucosa desnuda, el estado es ideal para ulcerogénesis (8).

Campylobacter pylori es el único organismo capaz de colonizar la mucosa gástrica humana normal; este se adhiere a la célula de la mucosa y causa inflamación. La superficie de la célula típicamente asume una forma de pedestal en el sitio de ataque. El siguiente paso es destrucción de la célula de moco protector, que conduce a la formación de la úlcera. La erradicación del organismo puede resultar en resolución de la gastritis, con una subsecuente curación de la úlcera y una baja incidencia de recaídas. Obviamente, C. pylori no es la causa de todos los tipos de gastritis, ni es cierto que la gastritis inducida solo por C. pylori es responsable de todos los síntomas reportados en pacientes infectados (8).

C. pylori se asocia con gastritis crónica activa que tiene cambios histológicos distintivos; puede o no coexistir con otras formas de gastritis (8).

La gastritis crónica se refiere solamente a la presencia de inflamación histológicamente probada, y no se acompaña necesariamente de síntomas dispépticos o anomalías macroscópicas de la mucosa gástrica (8).

Como se ha mencionado C. pylori es una causa conocida de gastroenteritis histológicamente demostrable. Sin embargo, la importancia de la presencia de esta bacteria en el estómago es incierta (1, 5).

Se ha reportado alrededor de un 20% de la población adulta que presenta problemas por C. pylori. Las personas infectadas por esta bacteria tienen más facilidad de desarrollar esta enfermedad (8).

La bacteria también se ha detectado en niños con dolor abdominal severo y en varios infantes con el síndrome de la falla de desarrollo (8, 28).

Como la aplicación de la información acerca de este organismo, queda bien establecido que C. pylori tiene una característica única que no se encuentra en otras campylobacterias (1, 5, 8).

Por ejemplo, tiene más de cinco flagelos envainados pendientes de un extremo del organismo, y la ultraestructura de la superficie parece ser diferente. Tiene un perfil proteínico peculiar en la electroforesis. Los componentes de pared celular y el DNA son también diferentes de otras especies de Campylobacter. Finalmente, los anticuerpos contra C. pylori no dan reactividad cruzada significativa con otras especies patogénicas de Campylobacter como C. jejuni (1, 5, 8).

C. pylori organismo que tiene algunas características típicas del género Campylobacter, por ejemplo, que es curvo o espiral, en forma de

S, bacilo gram negativo, que coloniza las células epiteliales del estómago secretoras de moco, oxidasa y catalasa positivas, y que requiere condiciones microaerófilas para su desarrollo (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13).

De acuerdo a la literatura universal, los pacientes varones con enfermedad ácido-péptica son más susceptibles a la colonización por C. pylori que las mujeres (7).

Otra característica muy importante se encuentra dentro de la batería bioquímica típica de Campylobacter pylori y que se ha reportado desde su descubrimiento, es la actividad de ureasa, encontrándose esta mil veces mayor que la de Proteus vulgaris y otras bacterias ureasa positiva (no publicado); tanto, que la ureasa está presente en nuestras de biopsia de tejido de pacientes con gastritis colonizados con el organismo, así, la prueba de la ureasa en la muestra, es una prueba diagnóstica confiable para la infección de C. pylori. Al respecto, Luck en 1926 y Fitzgerald en 1950 detectaron grandes cantidades de ureasa en tejido gástrico disecado (16).

En 1925 Luck y Seth sugirieron que la ureasa gástrica controlaba la hiperacidez gástrica promoviendo la hipótesis de la secreción de álcali. Otra fue que la enzima era parte de un mecanismo intercelular de protección de células mucosales contra el ácido gástrico. Cuando Glick encontró ureasa

en el estómago humano, notó una asociación entre la ureasa y la distribución de las células parietales, y la noción de un papel protector por la ureasa, se apoyó por la observación de Fitzgerald y Murphy de que la actividad enzimática era concentrada en la superficie de la mucosa y en la vecindad de las células oxínticas funcionales, tomando en cuenta que existe una diferencia entre la detección de ureasa en el tejido gástrico y de la bacteria (16).

Después de este período de intenso estudio de la ureasa gástrica y su origen, el interés disminuyó. Sin embargo el aislamiento de este nuevo organismo de la mucosa gástrica y de los reportes subsecuentes de la actividad de ureasa de éste, han estimulado el interés del papel de la ureasa en el ambiente gástrico mucosal (16).

En 1938, Doenges encuentra también microorganismos espirilares en estómagos estudiados post mortem, pero no logra su cultivo (3).

En relación con la patología humana, fue Levy quien informó que el hombre se puede ver afectado por este grupo de microorganismos, así como el carácter epidémico ocasional de los cuadros clínicos (2).

En 1940 Freedberg y Barron, usando técnicas de tinción de plata, encontraron espiroquetas en la mucosa gástrica de pacientes en quienes anteriormente habían tenido resección parcial por úlcera o carcinoma. Los organismos eran aislados infrecuentemente en ausencia de ulceración (1).

En 1979 J. R. Warren reportó organismos tipo Campylobacter en biopsias gástricas con tinción de plata.

Desde el aislamiento en 1982, de C. pylori a partir de biopsias gástricas por Marshall y Warren en un hospital australiano, publicado en la revista The Lancet en 1984 y que se había comunicado en 1983 al segundo congreso mundial sobre las infecciones por Campylobacter, ha desencadenado el inicio de un nuevo capítulo apasionante para la microbiología y para la gastroenterología acerca de su posible etiología en las gastritis y en la úlcera péptica (4, 6, 8, 9, 17, 28).

En 1984, Mc Multy y Watson, trabajando en un laboratorio especial reportaron la presencia de bacterias en espiral en gran abundancia en Gram teñidos de material de biopsias endoscópicas (15).

En 1985, Goodwin y colaboradores distinguen ultraestructuralmente a C. pylori de las otras especies del género por estudio cromatográfico en fase gaseosa de sus ácidos grasos (3).

2.2. Taxonomía y nomenclatura de C. pylori.

Bacterias aeróbicas/microaerofílicas, móviles helicoidales vibrioides.

Género Aquaspirillum

Género Spirillum

Género Azospirillum

Género Bdellovibrio

Género Vampirovibrio

Género Campylobacter; Especie pylori (14).

2.3. Aspectos microbiológicos de C. pylori.

2.3.1. Características morfológicas y coloniales.

El género Campylobacter consiste en un grupo bien definido de bacterias. Son bacilos finos, curvados en espiral, de 0.2 a 0.5 μ m de ancho y de 0.5 a 5.0 μ m de largo. Estos microorganismos pueden tener forma de cona, de S ó de ala de gaviota, y forma cadenas cortas u ocasionalmente largas. Las células pueden volverse esféricas o coloides, en especial en cultivos envejecidos. Son no esporulados, móviles mediante más de cinco flagelos envainados en uno de los extremos (1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 24).

2.3.2. Características bioquímicas y fisiológicas.

Un importante rasgo bioquímico de otras especies es

su rápida reacción a la ureasa y esta reacción ha sido utilizada para hacer un rápido diagnóstico presuntivo de las enfermedades ácido-péptica por inoculación del material de biopsia en medio de ureasa (1, 5, 6, 7, 8, 9, 13).

La bacteria hidroliza la urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ con la siguiente liberación de bicarbonato (H_2CO_3) y amonio (NH_4). Esta bacteria debe sostener un alto nivel de actividad metabólica modificando así el pH del estómago para lograr sobrevivir a la acidez original (8).

Otros rasgos también muy importantes dentro de estas características es que son catalasa positivos. La catalasa reduce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (8).

No fermentan ni oxidan los hidratos de carbono. Son bacterias gram negativas, indol positivas, producción de sulfídrico (H_2S) positivo, reducción de nitrato negativo, hidrólisis del hipurato negativo. (4,10,11, 12,18,19,22,23 26,27,28).

Requieren condiciones microaerofílicas para su desarrollo. (5% O_2 , 10% CO_2 , 85% N_2) con incubación a 37°C durante 6 días (3,4,5,13,24,27).

2.3.3. Características antigénicas.

Campylobacter pylori posee al menos 10 proteínas antigénicas de diferentes

tamaños, solamente el 80-90% de los pacientes infectados desarrollan anticuerpos contra la misma proteína (8).

Se ha desarrollado una técnica para detectar anticuerpos IgG por ELISA, aunque la cuantificación de estos no es útil para detectar la evolución de la enfermedad, ya que en aproximadamente 20% de la población adulta se detectan anticuerpos contra C. pylori asintóticamente (8).

Se ha desarrollado una prueba de anticuerpos séricos (ELISA), que pueden utilizarse como una medida a gran escala para la detección de Campylobacter pylori. Además de ser la herramienta epidemiológica útil, esta prueba será invaluable para checar a los miembros de la familia y contactos cercanos del paciente infectado, teniendo en cuenta que la reinfección puede ocurrir frecuentemente. Esta prueba presenta algunos problemas como el dar falsos-negativos en un rango del 10 al 20%, debido a las 10 proteínas antigénicas de diferentes tamaños, así como también el no diferenciar entre pacientes con infección activa y de aquellos que recientemente han eliminado a la bacteria, un inconveniente significativo tanto para la búsqueda como para evaluación post-tratamiento (8).

Finalmente, los anticuerpos de C. pylori no dan reactividad cruzada significativa con otras especies patógenicas de Campylobacter como C. jejuni (8).

Cuando se vieron anticuerpos IgG circulantes originados de infección intestinal, a pesar de que son indicativos de respuesta inmune, son probablemente de poca significancia a nivel de mucosa. Son quizá más relevantes los anticuerpos IgA, ya que ésta clase de anticuerpos están involucrados en cualquier reacción gástrica local (21).

Por medio de ELISA se ha demostrado significativamente incrementó en títulos de anticuerpo IgG e IgA en el grupo de pacientes que portan a la bacteria (21).

Los títulos de IgM fueron iguales tanto en el grupo de pacientes que tenían a la bacteria y los que no la presentaban. Cuando fueron examinados filtrados de C. pylori de diferentes pacientes estos parecieron ser antigenicamente diferentes. De este modo se explica la similitud en los niveles de IgM en ambos grupos el cual puede ser debido a los cambios por diferentes grupos antigénicos (21).

2.3.4. Fisiopatogenia de las infecciones causadas por C. pylori.

Campylobacter pylori tiene una capacidad única para modificar el ambiente

del estómago e interfiere con la protección local de la mucosa contra el ácido. En esta localización se protege del ácido gástrico por la capa rica de bicarbonato en el moco que sobreprotege el epitelio. Como el se adhiere solo a las células epiteliales gástricas secretoras de moco, usualmente no coloniza cualquier otra parte del tracto gastrointestinal. El papel de la bacteria en la enfermedad ulcero-duodenal puede explicarse por la tendencia de los pacientes de tener islotes de epitelio gástrico secretor de moco en la capa duodenal, en los cuales la bacteria se adhiere. Este germen se adhiere a la célula de la mucosa gástrica humana normal, y causa inflamación. La superficie de la célula típicamente asumen una forma de pedestal en el sitio de ataque. El siguiente paso es destrucción de la célula protectora de moco protector, que conduce a la formación de la úlcera (8).

Normalmente, el estómago está alineado con 0.2 mm. de capa de moco, el cual protege las células epiteliales del ácido segregado por las células parietales hacia el lumen. Durante la fase aguda de la infección, antes que los anticuerpos contra Campylobacter pylori se formen, se piensa que el organismo trabaja su camino debajo de la capa de moco que coloniza la superficie entera del estómago, incluyendo tanto el cuerpo y el antro. Cuando la bacteria digiere el moco, la capa protectora se adelgaza.

En algunas áreas, la capa de moco se erosiona completamente; el contacto de ácido con la mucosa produce indigestión o dispepsia. Posteriormente a la infección, el ácido está ausente o grandemente reducido, esto es debido probablemente a amonio generado por la bacteria, el cual neutraliza al jugo gástrico. También es posible que los organismos penetren hasta las glándulas gástricas del cuerpo del estómago y generen suficiente amonio para disminuir la secreción de ácido de la célula parietal (8, 20).

2.4. Aspectos clínicos y epidemiológicos de Campylobacter pylori.

Actualmente la implicación de estos gérmenes en la etiopatogenia de las gastritis y la úlcera gastroduodenal, se encuentra en discusión en todo el mundo. Sin embargo, cada vez existe una mayor evidencia de que Campylobacter pylori puede ser un patógeno importante en la etiología de las gastritis y de la úlcera gastroduodenal. La estrecha asociación entre el hallazgo de estos microorganismos y la presencia de gastritis se encuentra avalada por gran cantidad de trabajos procedentes de distintos países del mundo, además de la no desdeñable cantidad de publicaciones internacionales sobre Campylobacter pylori con gastritis y úlcera gastroduodenal (3, 4, 9).

En un estudio hecho de 75 pacientes sobre la asociación de Campylobacter pylori, con enfermedad ácido-péptica en Toronto, 34% tenían Campylobacter pylori, comparado con el 4% de pacientes sin enfermedad ácido-péptica. Los hombres con enfermedad ácido-péptica son más susceptibles a albergar C pylori que las mujeres (48:16). Esta diferencia en el sexo mostró que la úlcera gástrica se presenta en 9 de 12 hombres contra 2 de 12 mujeres que tenían cultivos positivos para Campylobacter pylori. Esta tendencia se presentó pero no fue estadísticamente significativa en la úlcera duodenal y la úlcera prepilórica (7).

La presencia de este organismo está asociada con gastritis histológicamente demostrable (1).

La mayoría de los pacientes remitidos a gastroscopías fueron por síntomas referidos al tubo digestivo superior (1).

Las úlceras pépticas desarrollan cuando hay un desbalance entre la pepsina ácido-gástrica y la resistencia de la mucosa (8).

El balance puede perderse cuando se incrementa la secreción de pepsina ácida, baja la resistencia de la mucosa o una combinación de las dos (8).

Por casi 50 años, la investigación y el tratamiento de la enfermedad de úlcera péptica se ha enfocado en el exceso de acidez (8).

Presumiblemente, C. pylori fue originalmente transmitido a humanos de una especie animal (8).

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO.

3.1. Procedencia y selección de muestras.

Este estudio se realizó en una población de pacientes bajo control gastroscópico con síntomas o enfermedad ácido-péptica practicadas por el departamento de Gastroenterología del Hospital Dr. Angel Leño.

Se evaluaron un total de 50 pacientes que presentaron los síntomas o enfermedad ácido-péptica, los cuales fueron sometidos a endoscopia, tomándoseles biopsias de antro y duodeno, lo más lejano posible al sitio de la lesión hasta completar un total de 100 muestras.

Los pacientes fueron seleccionados para búsqueda de Campylobacter pylori, se incluyeron éstos porque había enfermedad endoscópicamente visible; además se incluyeron pacientes sin evidencia endoscópica mismos que se seleccionaron para efectuar una correlación de la presencia o ausencia de la bacteria.

La edad de los pacientes fluctuó entre los 19 a los 86 años con una media de 47 años.

De los 50 pacientes con diagnóstico de enfermedad ácido-péptica, 23 corresponden al sexo femenino y 27 al sexo masculino.

3.2. Toma de la muestra.

Las biopsias fueron hechas por el cirujano gastroenterólogo mediante endoscopia de la mucosa antral y duodeno. Entre cada una de las tomas el endoscopio fue lavado y desinfectado para evitar la contaminación. En cada caso se tomaron un total de 4 biopsias de cada región, las cuales se mandaron al laboratorio de patología clínica, para cultivo y preparación de inprontas para tinción de Gram y otra para estudio histopatológico, cuidando que las tomas se hicieran a escasos milímetros de distancia de la lesión para no enmascarar la presencia de la bacteria .

3.3. Metodología microbiológica.

Estudio microbiológico.- De las 100 biopsias tomadas de antro y duodeno, se transportaron al laboratorio de patología clínica en alícuotas de solución salina isotónica (2ml) para ser procesadas en un tiempo de 2 hrs. después

de su colección o conservándolas en refrigeración a 4°C para procesarlas en un lapso no mayor de 4 hrs.

Una porción de cada biopsia se utilizó para hacer un frotis que subsecuentemente se tiñó por el método de Gran.

Por otra parte, las muestras se machacaron en pequeños morteros estériles, de donde se tomó una pequeña alícuota para el cultivo, sembrándose simultaneamente en el medio de Skirrow modificado que contiene agar Brucella, vanconicina 10mg/L, polinixina 250 microgranos/L, trinethoprin 5mg/L (Campylobacter Secktiussupplement. Merck 2249), 5% sangre de conejo y el medio de agar chocolate que contiene base de agar Mueller-Hinton, 5% de sangre humana, 1% isovitalex, 0.1% almidón, vanconicina 10mg/L, polinixina 250 microgranos/L, trinethoprin 5mg/L (Campylobacter Secktiussupplement. Merck 2249).

Las cajas ya estriadas se colocaron en jarras de anaerobiosis (sin catalizador para crear ambiente húmedo), se incubaron en condiciones microaerofílicas a 37°C, se proporcionó la microaerofilia con sobres generadores (Campypack-II) que proporcionan 5% de O₂, 10% CO₂, 85% N₂. Revisándoles cada tercer día hasta completar un total de 6 días de incubación (fig. 1).

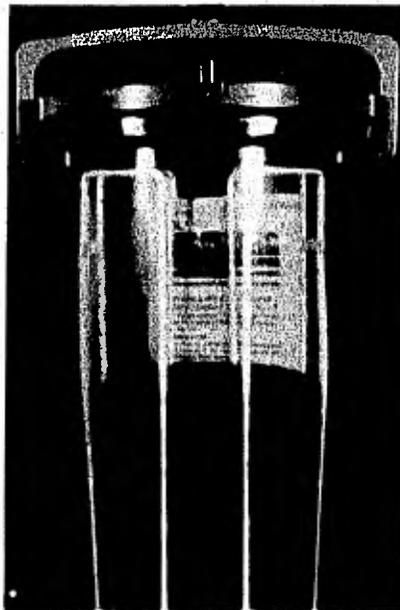


Fig. 1. Jarra de anaerobiosis sin catalizador
conteniendo un sobre generador (Carny-pack-II)
que proporciona 5% de O₂, 10% CO₂, 85% N₂,
conteniendo los medios de cultivo.

3.3.1. Microscopía.

Mediante el material obtenido de la biopsia, tanto de antro como de duodeno, se procedió a fijar cada uno de los especímenes en portaobjetos, una vez hecho esto se hizo la tinción por el método de Gram. Finalmente se observaron las inprontas al microscopio con el objetivo de inmersión (100x) identificando las características morfológicas típicas de Campylobacter sp., que son bacterias gram negativas, curvas en forma de S o espiral.

3.3.2. Prinoaislamiento.

Después del periodo de incubación a partir del tercer día que se obtenían las colonias características sospechosas del Campylobacter sp. se identificaron por su crecimiento y la forma de las mismas; que son incoloras, pequeñas (hasta 1 mm de diámetro), brillantes, enteras, grisáceas, no hemolíticas. Se resenbraron para su preservación e identificación bioquímica en medios de agar chocolate. (fig. 2 y 3).

3.3.3. Identificación bioquímica.

De los cultivos que resultaron positivos se practicó tinción de gram modificado (carbol fucsina) de las colonias sospechosas.



Fig. 2. Acercamiento de las colonias del Campylobacter pylori en el medio de agar chocolate.

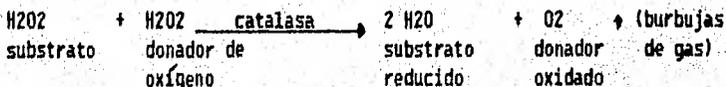


Fig. 3. Medio de agar chocolate que muestra a las colonias típicas del Campylobacter pylori.

Cuando la morfología de los tipos bacterianos correspondió a las características de Campylobacter se procedió a implementar las técnicas de una batería bioquímica completa para su identificación de especie, la cuales consistieron en las siguientes:

A) Producción de catalasa.

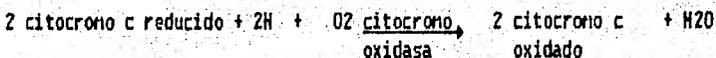
En un portaobjetos se depositaron unas gotas de peróxido de hidrógeno y se pusieron en contacto directo con la bacteria. Una rápida efervescencia indico producción de oxígeno gaseoso y una prueba positiva.



En la descomposición del peróxido de hidrógeno, una molécula actúa como substrato y la otra como un donador, el substrato reducido por átomos de hidrógeno es complementado por el donador resultando un substrato reducido y un donador oxidado con liberación de gas.

B) Prueba de citocromo oxidasa.

Una porción de la colonia en estudio se extendió sobre el área impregnada del reactivo para prueba de oxidasa. El desarrollo inmediato de un color rosa fucsia en la zona de extendido indica actividad de citocromo oxidasa y una prueba positiva.

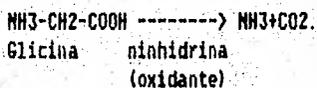


Electrones de citocromo c son tomados por átomos oxidasa; la citocromo oxidasa pasa electrones a la molécula de oxígeno. El oxígeno libre es necesario para la regeneración indirecta de citocromo c oxidasa.

La prueba realmente determina la presencia de citocromo c y es positiva solamente cuando la bacteria contiene citocromo c como una enzima respiratoria.

C) Prueba de hidrólisis del hipurato.

Se puso en contacto a la bacteria con el reactivo del hipurato de sodio para la detección de glicina usando ninhidrina que es un oxidante que desamina grupos alfa amino con liberación de NH₃ y CO₂. El amoníaco liberado reacciona con la ninhidrina residual dando un color púrpura.



La prueba es sensible y rápida con interpretaciones posibles en 2 hrs. de incubación. La reacción positiva da un color cafésoso naranja.

D) Prueba de la urea en medio líquido.

La bacteria a identificar se tomó con un asa estéril se inoculó el caldo de urea, dando una reacción rápida a los pocos minutos, alcalinizando el medio y dando una coloración rojiza indicando hidrólisis de la urea, siendo esta prueba positiva (fig. 4 y 5).



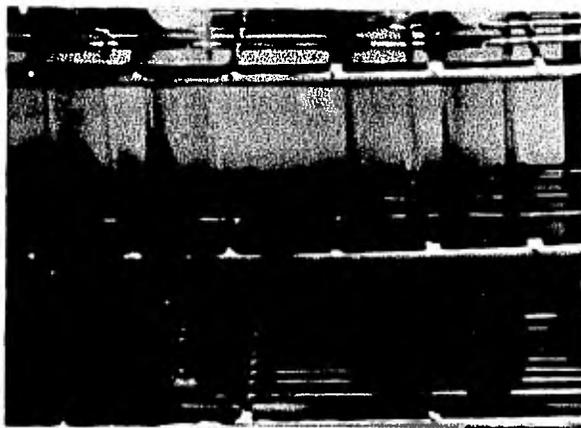


Fig. 4. Prueba de la ureasa que nos muestra la reacción positiva de la enzima que produce la bacteria contra un control negativo incoloro.

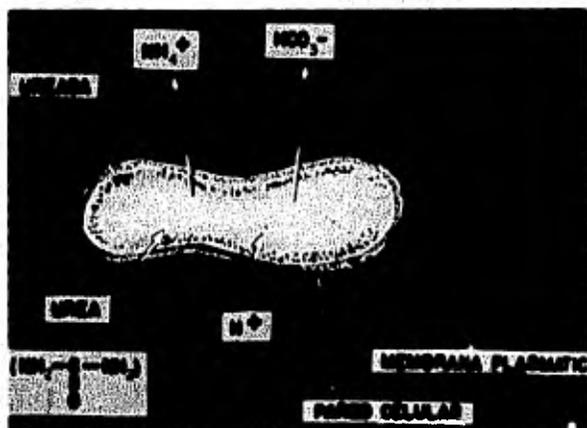


Fig. 5. Característica estructurales y bioquímicas del *C. pylori*.

E) Sensibilidad antimicrobiana.

Una vez obtenida la bacteria a identificar se procedio a resembrarlas en el medio de agar chocolate. Una vez estriada toda la caja, se colocaron discos de 30 ugr de Ac. nalidixico y Cefalotina, se incubaron las cajas a 37° C en condiciones microaerofílicas revisandolas al cuarto día de incubación, resultando un halo de inhibición a Cefalotina y resistencia de la bacteria a Ac. nalidixico (fig. 6).

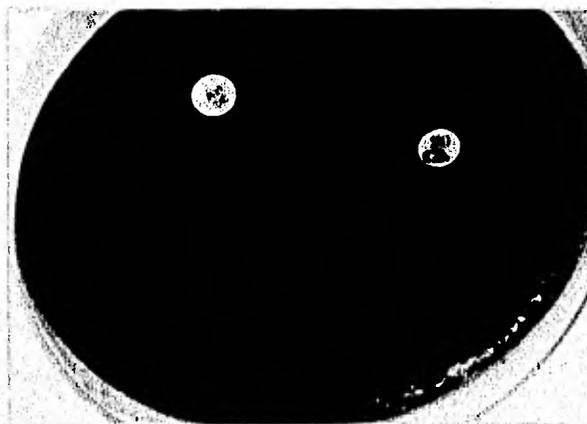


Fig. 6. Prueba de susceptibilidad a Ac.
Nalidixico y Cefalotina donde se observa
Resistencia y sensibilidad a éstos.

La prueba de Oxidasa se considera una prueba característica del género Campylobacter, previa comprobación morfológica.

La prueba de Catalasa es positiva, y agrupa a las especies de Campylobacter que mas comunmente se asocian con enfermedades en humanos.

La reacción positiva de la Urea solo se reporta para C. pylori.

La hidrólisis del hipurato solo es positiva para C. jejuni.

La sensibilidad antimicrobiana a Cefalotina y resistencia a Ac. nalidíxico es característica de C. pylori junto con C. hyointestinalis y C. sputorum subsp. sputorum; las dos últimas especies son catalasa negativas.

3.4. Metodología Histológica.

Se procesaron 100 biopsias de tejido gástrico y duodenal obtenidas por endoscopia, fijadas en 5 ml de formaldehído al 10% y embebidas en parafina, procesadas en forma automática con el procedimiento de 12 hrs de rutina.

Del procedimiento anterior se hicieron cortes semifinos de 5 micras de grosor y se tiñeron por separado cada uno de los especímenes con:

- A.- Hematoxilina y Eosina.
- B.- PAS (Acido Peryódico de Schiff).
- C.- Warthin-Starry (tinción de plata).

De los cortes hechos de las biopsias teñidas con hematoxilina y eosina se hizo hincapié en la identificación de los siguientes parámetros.

1.- Inflamación.

a).- Grado.

b).- Tipo

2.- Cambios epiteliales.

3.- Secreción de moco (cuantitativo).

4.- Metaplasia intestinal.

5.- Presencia de bacterias.

Aquellas teñidas con PAS se utilizaron para confirmar si había secreción de moco, considerándola:

A).- Normal.

B).- Disminuido.

C).- Aumentado.

Finalmente los cortes teñidos con Warthin-Starry se usaron exclusivamente para confirmar la presencia de la bacteria en el tipo de mucosa presente.

CAPITULO IV

RESULTADOS.

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

El aislamiento de la bacteria se correlacionó con el tipo de enfermedad ácido-péptica.

De los 50 pacientes con el diagnóstico de enfermedad ácido-péptica, 8 de 23 (35%) mujeres se les aisló al organismo comparado con 18 de 27 (67%) hombres.

Campylobacter pylori, se encontró en 26 de 50 (52%) endoscopias revelando enfermedad ácido-péptica.

De los pacientes que presentaron úlcera péptica uno era gástrica y once duodenal (Tabla 1).

Tabla. 1 Tipos de enfermedad ácido-péptica correlacionando la presencia de la bacteria con el diagnóstico endoscópico y cultivo.

Tipo de gastritis	Total	Presencia de la bacteria	Ausencia de la bacteria
Úlcera péptica	12	9 (75%)	3 (25%)
Gastritis antral y/o difusa	25	14 (56%)	11 (44%)
Gastritis fúndica	3	1 (33.3%)	2 (66.6%)
Normales	10	2 (20%)	8 (80%)
Total	50	26 (52%)	24 (48%)

La bacteria se aisló más en el medio selectivo de (Skirrow), se encontró que era el medio donde se aislaba más fácilmente desde el tercer día de incubación, mientras que el medio no selectivo (agar chocolate), se aisló pero fue más difícil obtener su crecimiento a partir del tercer día de incubación necesitando mantenerse nuevamente hasta el cuarto o quinto día, incluso hasta no llegar a aislarla en el medio no selectivo.

Las características coloniales de las bacterias que crecieron en los medios correlacionaban con las características pertenecientes al género Campylobacter ya descritas en la literatura. Las biopsias que se tomaron a los 50 pacientes, 27 (54%) resultaron positivas al método por tinción de Gram. Se correlacionó las pruebas positivas por el método de Gram con el cultivo microbiológico y el estudio histopatológico.

Se encontraron 37 muestras positivas de las cuales 28 (75.7%) fueron de antro, mientras que solamente 9 (24.3%) correspondieron a duodeno.

Estudio histopatológico.

Se tomaron en cuenta los mismos parámetros de edad y sexo que se siguió en el estudio microbiológico. Campylobacter pylori fue positivo en 27 (54%) pacientes que presentaron la enfermedad péptica anatómica, mas 3 negativas por histopatología, pero positivas por cultivo 30 (60%).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

Debe utilizarse como medio de primoaislamiento el medio selectivo de Skirrow (modificado) por las siguientes razones:

Se observa crecimiento colonial en menor tiempo, generalmente al tercer día de incubación y además número mayor de colonias desarrolladas razones por las cuales se puede confiar en este medio de primoaislamiento para una buena identificación de la bacteria y con la subsecuente comprobación morfológica.

La batería bioquímica de identificación de especies fue la adecuada, práctica, accesible y de bajo costo, razones por las cuales podría recomendarse para su utilización en los laboratorios de rutina, pero se considera que se puede abreviar con seguridad dicho esquema utilizando solo las siguientes pruebas: Morfología característica por tinción de Gram, Catalasa positiva, Citocromo oxidasa positiva, Ureasa positiva.

A mayor grado de inflamación mayor número de acúmulos, bacterianos observándose su morfología característica:

bacilos gran negativos, curvos o en forma de S en el frotis directo de la muestra conjuntamente con un mayor desarrollo en los medios de cultivo.

Respecto a las pruebas de sensibilidad a ácido nalidíxico y cefalotina, concluimos por esta experiencia que no son pruebas accesibles para la diferenciación de especies de Campylobacter, debido al tiempo prolongado para la observación de resultados, además de un alto riesgo de contaminación.

Los casos negativos reportados por histopatología, pero que resultaron positivos por microbiología tenían un grado de inflamación que se observaba solo de leve a moderada.

Todos los casos reportados negativos tanto por histopatología como por microbiología tenían: a) inflamación nula o leve o b) - inflamación severa pero en esos casos invariablemente con metaplasia intestinal (7 casos).

Todos los casos positivos tanto como histopatología como por microbiología mostraron disminución de las secreciones de moco en grado de dos cruces a cuatro cruces.

En dos casos reportados por histopatología se encontró displasia severa.

Se utilizó sangre de conejo preferentemente a la humana y de borrego por las siguientes razones:

- a.- Esta ampliamente documentado que un alto porcentaje de la población posee anticuerpos séricos contra C. pylori, y la presencia de estos en un medio de cultivo podría causar la inhibición del mismo.
- b.- Desde un 50 hasta un 100% de los borregos pueden tener infección o colonización por alguna especie de Campylobacter, por lo que sería muy probable la presencia de anticuerpos contra este género.

Los posibles casos de falsos negativos encontrados se listan en seguida:

Pretratamiento con Lidocaina.

Cimetidina dada antes de la biopsia.

Pacientes que tomaron preparaciones de antibióticos con bismuto.

Tabletas de cimetidina o ranitidina en el estómago.

Endoscopio contaminado con gluteraldehído.

Muestra de biopsia que contienen tejido pero no de epitelio antral.

Muestras guardadas a temperatura ambiente por más de tres horas.

Incubadora sin suficiente humedad.

No se utilizó el equipo de 5 antibióticos (Campylobacter Selective Supplement (Blaser-Wang) Oxoid. Code SR 981, porque incluye como parte del stock de antibióticos a Cefalotina, que inhibe a Campylobacter pylori y por ende no lo aislaríamos en el primoaislamiento.

RESUMEN.

El trabajo estuvo dirigido a un grupo de 50 pacientes que presentaron síntomas de enfermedad ácido-péptica desde el punto de vista clínico, los cuales fueron sometidos a endoscopia y biopsia de antro y duodeno.

Dichas muestras fueron colocadas en solución salina estéril para su transporte y almacenaje en el Laboratorio antes de su proceso. En término no mayor de 4 hrs se machacaron en mortero estéril y al resultado de esto se le sometió a la metodología microbiológica en evaluación.

De este modo se evaluaron los medios de Skirrow y agar chocolate modificado mismo donde fueron sembradas las muestras e incubadas en atmósfera microaerofílica a 37° C por 6 días.

A las colonias sospechosas desarrolladas en los medios de cultivo de primoaislamiento se les efectuó perfil bioquímico consistente en: Tinción de Gram, Oxidasa, Catalasa, Ureasa, Hidrólisis del hipurato, Sensibilidad a Ácido Nalidíxico y Cefalotina.

De acuerdo a los resultados obtuvimos :

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Que la enfermedad ácido-péptica se presentaba en mayor porcentaje en hombres que en mujeres (67:35).

La bacteria se encontro en 26 de 50 (52%) endoscopías revelando enfermedad ácido-péptica.

Las biopsias que resultaron positivas por el método de Tinción de Gram fueron 27 (54%).

De un total de 37 muestras positivas de las cuales solo 28 (75.7%) fueron de antro, mientras que solamente 9 (24.3%) correspondieron a duodeno.

El medio donde se obtuvo un mayor crecimiento de la bacteria fue el medio selectivo de (Skirrow), pudiendo aislar a la misma desde el tercer día de incubación.

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

El estudio histopatológico se llevó a cabo en forma paralela tomando en cuenta los mismos parámetros socioeconomicos del estudio microbiológico.

C. pylori fue positivo en 27 (54%) pacientes que presentaron enfermedad péptica anatomo patológica, mas 3 negativas por histopatología pero positivas por cultivo 30 (60%).

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA.

1. Jones D. M., Lessells A. M., Eldridge Joan. Campylobacter LIQUE ORGANISMS ON THE GASTRIC MUCOSA; culture, histological, and serological studies. J. Clin Pathol. 37:1002-1006., 1984.
2. Martín Luengo F. y Rodríguez González I. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y PATOGENICOS DE LAS CAMPILOBACTERIOSIS. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. Vol. 5, Num. 4, Pag. 193-194, Abril 1989.
3. Pastor Molas J., Torrente González M. M., et al. MICROORGANISMOS ESPIRILARES DE TIPO Campylobacter EN MUCOSA GASTRICA. Enf. Infec y Microbiol. Clin. Vol. 5, Num 4, Pag 223-225, Mayo 1987.
4. Buck Georges E., Courley Willian K., Lee Won k., Subrananyan Kalyanan, et al. RELATION OF Campylobacter pyloridis TO GASTRITIS AND PEPTIC ULCER. The Journal of Infectious diseases. Vol. 153, Num 4, Pag. 664-669, April 1986.
5. Buck George E. and Smith John S. MEDIUM SUPPLEMENTATION FOR GROWTH OF Campylobacter piloridis. Journal of Clinical microbiology. Vol. 25, Num 4, Pag 597-599, April 1987.
6. Kraiden Sigud, Bohnen John, et al. COMPARISON OF SELECTIVE AND NONSELECTIVE MEDIA FOR RECOVERY OF Campylobacter pylori FROM ANTRAL BIOPSIES. Journal of Clinical Microbiology. Vol 25, Num 6, Pag. 1117-1118, June 1987.
7. Bohnen J. M. A, Md, Frcsc; Kraiden S, et al. Campylobacter pyloridis IS ASSOCIATED WITH ACID-PEPTIC DISEASE IN TORONTO. The Canadian Journal of Surgery. Vol. 29, Num 6, Pag. 442-444, November 1986.
8. Marshall Barry J. PEPTIC ULCER; AN INFECTIOUS DISEASE? Hospital Practice. Pag 87-96, August 15, 1987.
9. López Brea M. y Jiménez M. L. Campylobacter pyloridis Y PATOLOGIA GASTRODUODENAL. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. Vol. 5, Num 4, Pag. 236-239. Abril 1987.

10. Lennette, Balows, Hausler, Shadomy. MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA. 4ta. edición. Edit Panamericana. Pag. 383-391.
11. Koneman, Allen, Dozell, Summers, DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Edit. Panamericana, 1985, Pag. 248-249.
12. Finegold-Martin. Bailey-Scott. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Edit. Panamericana. 6ta. edición. Pag. 293-295.
13. PATHOGENESIS OF Campylobacter INFECTIONS. Seminar 87th Annual Meeting. ASM. Atlanta, Georgia. U.S.A. 1987.
14. Bergey's MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Edit. Williams & Wilkins. Baltimore, U.S.A. 1984.
15. Goodwin CS, Blincow ED, Warren JR, Waters TE, Sanderson CR, Easton L. EVALUACION OF CULTURAL TECHNIQUES FOR ISOLATING Campylobacter pyloridis FROM ENDOSCOPIC BIOPSIES OF GASTRIC MUCOSA. J. Clin. Pathol. 38: Pag. 1127-1131, 1985.
16. Stuart L., Hazekka Adrian Lee. HYPOTHESIS. Campylobacter pyloridis, UREASE, NITROGEN ION BACK DIFFUSION AND GASTRIC ULCERS. The Lancet, Pag., 15-17, July 1986.
17. Megraud Francis, Bonnet Françoise, Garnier Monique, and Lanouliatte Nerve. CHARACTERIZATION OF Campylobacter pyloridis BY CULTURE, ENZYMATIC PROFILE, AND PROTEIN CONTENT. J. Clin. Microbiology. Vol. 22, Num. 6, Pag. 1007-1010, December 1985.
18. Queiroz Dulciene M. A. , Mendes Edilberto M. and Rocha Sifone A. INDICATOR MEDIUM FOR ISOLATION OF Campylobacter pylori. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 25, Num. 12, Pag. 2378-2379, December 1987.
19. Morgan Donna R. , Freedman Raymond, Depew Charles E., and Kraft William G. GROWTH OF Campylobacter pylori IN LIQUID MEDIA. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 25, Num. 11, Pag. 2123-2125, November 1987.
20. Hazell Stuart L. , Lee Adrian, Brady Lynette, and Hennessy Williams. Campylobacter pyloridis AND GASTRITIS: ASSOCIATION WITH INTRACELLULAR SPACES AND ADAPTATION TO AN ENVIRONMENT OF NICUS AS IMPORTANT FACTORS IN COLONIZATION OF THE GASTRIC EPITHELIUM. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 153, Num. 4, Pag. 658-663, April 1986.

21. Rathbone S. J., Wyatt L. I., Worsley B. W., Trejdosiewicz L. K., Heatley R. V., M.S. Losowsky. IMMUNE RESPONSE TO Campylobacter pyloridis. The Lancet, Pag. 1217, May 1985.

22. Bolton J. F., Holt D. M., Hutchinson D. M. UREASE POSITIVE THERMOPHILIC CAMPYLOBACTERS. The Lancet, Pag. 1217-1218, Mayo 25, 1985.

23. Steer Howard W., Mewell Diane G. IMMUNOLOGICAL IDENTIFICATION OF Campylobacter pyloridis IN GASTRIC BIOPSY TISSUE. The Lancet, Pag. 38, July 6, 1985.

24. Goodwin Stewart, Blincoe Elizabeth, Armstrong John, McColuch Ross, Collins David. Campylobacter pyloridis IS UNIQUE: GLO-2 IS AN ORDINARY Campylobacter. The Lancet, Pag. 38-39, July 6, 1985.

25. Kaldor Jakov, Tee Wee, McCarthy Peter, Watson Jan, Dwyer Brian. IMMUNE RESPONSE TO Campylobacter pyloridis IN PATIENTS WITH PEPTIC ULCERATION. The Lancet, Pag. 921, April 20, 1985.

26. Marshall Barry J., Warren J. Robin. UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION. The Lancet. Pag. 1311-1314. June 16, 1984.

27. Hazell S. L., Borody T. J., Gal A. and Lee A. Campylobacter pyloridis GASTRITIS I; DETECTION OF UREASE AS A MARKER OF BACTERIAL COLONIZATION AND GASTRITIS. The American Journal of Gastroenterology. Vol. 82, Num. 4, Pag. 292-296, April 1987.

28. Kilbridge Peter M., MD; Barret Dahis Beverly, MD; Czinn Steven J, MD. Campylobacter pylori ASSOCIATED GASTRITIS AND PEPTIC ULCER DISEASE IN CHILDREN. AJDC. Vol. 142, Pag. 1149-1152, November 1988.