

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

COMPARACION DE UN TEST SEROLOGICO DE ELISA VRS BIOPSIA
GASTRICA PARA LA DETECCION DE *Helicobacter pylori*



Informe de Tesis

Presentado por

ERIKA SUZZETTE CORDON LEMUS

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, Noviembre de 2000

DL
00
T(2040)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA:	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
SECRETARIO:	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I:	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
VOCAL II:	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
VOCAL III:	Dr. Federico Adolfo Richter Martínez
VOCAL IV:	Br. César Alfredo Flores López
VOCAL V:	Br. Manuel Anibal Leal Gómez

ACTO QUE DEDICO

A DIOS Y A LA VIRGEN MARIA

A MI MADRE:

Zoila Gloria Lemus Méndez

Con agradecimiento especial por su infinito amor y apoyo.

A MIS HIJOS:

Erick Alberto y Katherine Sofía Lima Cerdón

Con todo mi amor.

A MIS HERMANOS:

Eddy Alexis y José Jacobo

Con fraternal cariño

A MI ESPOSO:

Alberto Lima García

Con amor.

A MIS AMIGOS, especialmente a:

Rina Orellana

Claudia Aldana

Berta Lidia Recinos

Maritza Vidal

Maury Iboy

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Lic. Rafael Pratdesaba Zea por su asesoría

Al Laboratorio Clínico de Hospital Privado Bella Aurora, por sus instalaciones, ayuda y colaboración para la realización de este trabajo de tesis.

Al Doctor Alejandro Hernández Monroy, por proporcionarme los resultados de las endoscopías realizadas en este estudio.

A todas las personas que me instruyeron desde el inicio de mi carrera ya que hicieron posible mi formación profesional, especialmente al Lic. Jorge Pérez Folgar y a Oscar Velásquez.

INDICE

I.	Resumen.....	01
II	Introducción.....	03
III.	Antecedentes.....	04
	A. Generalidades.....	04
	B. Epidemiología.....	06
	C. Patogenicidad.....	09
	D. Sintomatología.....	18
	E. Diagnóstico de Infecciones por <i>H. pylori</i>	19
	1. Exámenes No Invasivos.....	19
	2. Exámenes Invasivos.....	22
	F. Tratamiento para la erradicación de <i>H. pylori</i>	25
IV.	Justificación.....	31
V.	Objetivos.....	32
VI.	Hipótesis.....	33
VII.	Materiales y Métodos.....	34
	A. Universo de Trabajo.....	34
	B. Recursos.....	34
	C. Metodología.....	36
	D. Diseño de la investigación.....	40
VIII.	Resultados.....	43
IX.	Discusión de resultados.....	45
X.	Conclusiones.....	48

XI.	Recomendaciones	49
XII.	Referencias.....	50
XIII.	Anexos.....	58

I. RESUMEN

El principal propósito de este estudio fue comparar un método de ELISA para la cuantificación de anticuerpos séricos IgG anti *H. pylori* IgG, con la coloración de Giemsa de biopsias gástricas en la cual se observó la presencia de bacilos curvos característicos de *H. pylori*.

Se estudiaron un total de cincuenta pacientes, entre los quince y setenta y cinco años de edad, que asistieron a una clínica médica privada, realizando un análisis comparativo, mediante la técnica de kappa para determinar la concordancia entre ambos métodos.

A cada paciente inicialmente se le extrajo cinco ml de sangre para la titulación de anticuerpos séricos anti *H. pylori*; posterior a la toma de muestra sanguínea se le realizó un estudio gastroscópico del que se obtuvieron biopsias gástricas para demostrar la presencia o ausencia de bacilos curvos característicos de *H. pylori*.

La titulación de anticuerpos séricos se realizó en el laboratorio clínico de un hospital privado, utilizando un juego de reactivos comercial marca Orgenics con la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti *H. pylori*, los cuales fueron interpretados manualmente mediante una escala de lectura.

La biopsia gástrica fue tomada en el departamento de endodiagnos del mismo hospital y enviada a un laboratorio privado de patología, en donde se determinó la presencia de *H. pylori* mediante la coloración de Giemsa, siendo éste nuestro estandar de referencia.

De los cincuenta pacientes estudiados, 28 obtuvieron un título positivo de anticuerpos séricos (56%); el resto obtuvo un resultado negativo (22 pacientes, 44%). De la biopsia gástrica efectuada, 31 pacientes obtuvieron un resultado positivo para *H. pylori* (62%) y a los 19 restantes (38%) no se les detectó la presencia de bacilos curvos.

Estos resultados indican que en un 94% de la totalidad de las muestras analizadas, las dos metodologías concordaron de forma satisfactoria, demostrando para el método de ELISA una sensibilidad del 90% y especificidad de 100%.

Se concluye entonces que el método de ELISA para la cuantificación sérica de anticuerpos anti *H. pylori* puede ser utilizado por el médico como una ayuda diagnóstica para la detección de gastritis y/o úlcera gástrica, siendo éste un análisis no invasivo y de bajo costo, que puede brindar resultados confiables y rápidos al paciente.

II. INTRODUCCION

Helicobacter pylori es un microorganismo Gram negativo, causante principal de gastritis crónica y úlcera péptica. El nicho natural de esta bacteria es el estómago humano, localizándose principalmente en el antro y ocasionalmente en duodeno, donde puede permanecer por muchos años. Una vez que este microorganismo ha colonizado, se origina el proceso inflamatorio con la infiltración de polimorfonucleares, lo que produce cambios a nivel celular y consistencia del moco gástrico (1).

El 90 por ciento de los pacientes con úlcera duodenal y 70 por ciento con úlcera gástrica están infectados con *H. pylori*. Esto obliga la búsqueda intensa de esta bacteria en casos similares.

La respuesta inmune humoral a la infección por *H. pylori* se mide por los niveles de inmunoglobulina en suero. Entre los métodos empleados para la detección de anticuerpos IgG está la cuantificación sérica por el método de ELISA, el cual tiene la ventaja de ser una prueba serológica rápida, no invasiva, sensible y específica para la detección de *H. pylori*. Un estudio realizado en Houston, Texas, comparando el método de ELISA vrs. prueba del aliento, demostró una especificidad del 100 por ciento y sensibilidad de 98.7 por ciento para ambas pruebas (9). En Guatemala no se han realizado estudios comparativos para el método de ELISA.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la concordancia entre los resultados obtenidos en la cuantificación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* en suero por el método de ELISA y los resultados obtenidos en la biopsia gástrica para que dicho método pueda ser utilizado por el gastroenterólogo como una ayuda diagnóstica y de seguimiento a los pacientes con gastritis y/o úlcera gástrica.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades:

Helicobacter pylori es un organismo espiral, el cual fue reportado por primera vez en estómago de animales en 1893 (1). Durante los años de 1940 se encontraron espiroquetas en la mucosa gástrica de pacientes con úlceras gástricas o cáncer. En 1975 se realizaron otros estudios relacionados con la bacteria, pero fallaron en la identificación de los organismos que observaron, por lo que asumieron que eran contaminantes endoscópicos (1).

En 1983, tres grupos separados alrededor del mundo, reportaron sincrónicamente la presencia de bacterias espirales en pacientes con gastritis crónica y ulceración péptica (1,2). Warren y Marshall de Australia, realizaron un estudio gastroscópico de pacientes, notando la similitud entre esos organismos y el género *Campylobacter* (2). En 1985, éstas bacterias curvas fueron nombradas por Goodwin y colaboradores como *Campylobacter pyloridis*, aunque más tarde lo cambiaron a *C. pylori* por correcciones gramaticales (2-4). Un nuevo trabajo manifestó diferencias bioquímicas y ultraestructurales entre el género *Campylobacter* y otras especies de bacterias, por lo que decidieron que *C. pylori* debería ser miembro de un nuevo género (1,4). En 1989, se tomó la decisión por acuerdo internacional que este organismo representaba en su totalidad un nuevo género, llamado *Helicobacter*, estudiaron las diferencias genéticas, bioquímicas, microbiológicas y enzimáticas de *H. pylori*, *H. mustelae* y *H. felis* (Anexo No. 1) (4,5).

H. pylori es una bacteria Gram negativo, flagelada, de forma helicoidal que mide de 2.5 a 5.0 μm de largo y 0.5 a 1.0 μm de ancho. Presenta flagelos unipolares, bipolares o laterales, con vaina y protuberancia en sus extremos. Las colonias son translúcidas, no pigmentadas que miden de 1 a 2 mm de diámetro. Su crecimiento es óptimo en una atmósfera que contenga el 5 por ciento de O_2 , el 10 por ciento de CO_2 y el 85 por ciento de N_2 . Las colonias son oxidasa positivo, catalasa positivo, indol negativo, reducción de nitratos negativo, hidrólisis de hipurato negativo y fermentación de glucosa negativo (Anexo No. 2). Los medios de cultivo utilizados para su aislamiento son el agar infusión cerebro corazón (BHI), agar Columbia y agar de Mueller Hinton complementados principalmente con sangre de caballo y polienriquecimiento (4). Si el cultivo es para aislamiento primario, se deben adicionar los siguientes antibióticos: polimixina, anfotericina, vancomicina y trimetoprim sulfametoxazol (4,6). Es susceptible a eritromicina, tetraciclina, penicilina, gentamicina, cefalotina, clindamicina, ciprofloxacina y otros antibióticos; también es susceptible a las sales de bismuto. Es resistente a las sulfonamidas, ácido nalidíxico y trimetoprim-sulfametoxazol (Anexo No. 3) (6).

La bacteria se caracteriza por su alta actividad de ureasa, en la cual se localizan importantes determinantes antigénicos, así como por la proteína externa inmunodominante 128 kDa (*CagA*) y la citoxina *VatA*. Las cepas de *H. pylori* son muy diversas y difieren de acuerdo a la expresión del antígeno *CagA* (Catoxine associated gene A). La mayoría de estas bacterias que están asociadas con enfermedades gástricas severas contienen el gen *CagA*. Otro fenómeno observado es la presencia de la toxina *VatA* (Vacuolization toxin A), vacuolizada por la bacteria y

presente en todas las cepas, aunque no en todas se expresa. Los estudios muestran que la expresión de este subgrupo de factores virulentos de cepas están asociados con enfermedades graves. Sin embargo, la cepa *CagA* positiva puede variar ampliamente entre áreas geográficas (7).

El Instituto para la Investigación Genómica, publicó un reporte sobre la dilucidación de las piezas y la secuencia del genoma de *H. pylori* el cual cuenta con 1.6 millones de pares de bases (1590 genes) en un cromosoma circular. Este hallazgo ayudará al mejor entendimiento de la biología de la bacteria y muy probablemente conducirán a la elaboración de una vacuna que evite su acción y propagación (7).

B. Epidemiología:

La infección por *H. pylori* es cosmopolita, afectando a más del 60 por ciento de la población humana en los países industrializados y porcentajes incluso más altos en los países en vías de desarrollo (4,7).

La frecuencia creciente de infecciones que ocurren dentro de familias, con la edad y con el hacinamiento, indican que *H. pylori* es transferida por contacto directo. Todas las áreas del mundo reportan aumento en la infección con la edad, y ciertos grupos étnicos son de mayor riesgo que otros. Por ejemplo, habitantes de Africa e Hispanoamérica tienen altos rangos de infección, comparados con americanos caucásicos (4). En los países en vías de desarrollo, las incidencias en poblaciones indígenas aumentan también con la edad, habiendo un bajo riesgo en la infancia (menor del 10 por ciento) (8). La prevalencia de la infección varía considerablemente según raza, edad y nivel socioeconómico (8,9). Aunque existen varias formas de

realizar el diagnóstico, en la mayoría de los estudios poblacionales se utilizan pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos específicos circulantes (IgG). La seropositividad fluctúa de 0.7 por ciento en aborígenes australianos a 80 por ciento o más en India, Argelia y otros países en vías de desarrollo, donde tanto niños como adultos tienen prevalencias de infección mucho más elevadas y se infectan más precozmente que poblaciones comparables de países desarrollados (10,11). Con toda probabilidad, la infección ocurre predominantemente en la infancia. La asociación con la edad podría atribuirse tanto a una infección continua durante la vida adulta como a un efecto de cohorte, relacionado con un riesgo decreciente de infección en la infancia a medida que las condiciones de vida y el saneamiento ambiental han mejorado (12,13).

En Chile, en un estudio poblacional recientemente finalizado se determinó la seropositividad para *H. pylori* en 1815 niños y jóvenes de Santiago y Punta Arenas (14). A los 5 años de edad, el 50 por ciento del grupo socioeconómico bajo y el 18 por ciento del grupo más alto están ya infectados. Entre los 25 y 35 años, la prevalencia alcanzó al 70 por ciento en los grupos socioeconómicos bajo y medio y 40 por ciento en el grupo socioeconómico más alto. Otros estudios realizados en Chile, sugieren también una alta prevalencia de infección por *H. pylori* en población asintomática (15). La relación, demostrada en una población peruana (11), entre el riesgo de infección y la fuente de origen del agua para la bebida, el reciente aislamiento en deposiciones, la aglomeración intrafamiliar y la aparente correlación, demostrada en población chilena, entre el riesgo de infección y el consumo de vegetales y mariscos crudos, sugieren fuertemente una transmisión fecal-oral. Recientes estudios indican que la transmisión

ocurre de persona a persona, pues *H. pylori* ha sido detectado en muestras provenientes de la cavidad oral (16-18).

H. pylori esta presente en esputo, sudor, heces de personas infectadas y aún en agua de uso doméstico, por lo tanto, en la transmisión de esta bacteria están involucradas tanto la ruta oral como la fecal (18).

El factor socioeconómico es probablemente otro determinante epidemiológico de esta infección (19). En general, las poblaciones de baja condición socioeconómica aparecen con un riesgo alto, en comparación con poblaciones con nivel socioeconómico alto. La transmisión feco-oral es más importante en las condiciones socioeconómicas bajas (7,19,20).

Los estudios epidemiológicos más recientes han demostrado que las infecciones por *H. pylori* son la causa principal de gastritis y úlcera péptica. También existen evidencias, cada vez más contundentes, que lo asocian estrechamente con el desarrollo de cáncer gástrico, cuya incidencia ha disminuido pero sigue siendo el segundo tipo más común de neoplasias malignas, más frecuente en varones que en mujeres (17,19).

H. pylori ha sido implicado desde su aislamiento en 1982, en diversas condiciones gastrointestinales y para 1992 fue clasificada como agente carcinogénico (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer IARC - 1994). Los estudios de seguimiento sugieren que los mecanismos autoinmunes del hospedero por *H. pylori* inducen atrofia gástrica, una lesión avanzada asociada al cáncer del estómago. Las variaciones en su prevalencia están ligadas a la tasa de adquisición de la infección durante la infancia (21). En los países en desarrollo, la infección se

adquiere en edades tempranas y permanece durante el resto de la vida, mientras que en países desarrollados la infección se produce en edades maduras y aumenta conforme transcurre la vida. Aunque la infección es altamente prevalente (aproximadamente 80 por ciento de acuerdo a diversos estudios a nivel mundial), sólo una pequeña fracción de los infectados desarrolla cáncer gástrico, lo que nos lleva a reflexionar sobre la necesidad de investigar los cofactores de infección por esa bacteria (22-24).

C. Patogenicidad:

Una década después de su redescubrimiento, existe un entendimiento razonable de la historia natural de la infección por *H. pylori* (25). Después de la ingestión, hay un período de proliferación bacteriana intensa e inflamación gástrica. *H. pylori* se encuentra con mayor frecuencia en el antro gástrico; debido a la presencia de metabolitos y factores de crecimiento tales como urea y hemina requeridos por el microorganismo. Es extremadamente móvil en el moco y se adhiere a las fibras de mucoproteína del mismo y a las uniones intercelulares de las células del epitelio gástrico (25,27,29).

Esta bacteria posee una gran actividad sobre las células parietales del estómago, lo que induce la producción de gran cantidad de ácido clorhídrico. Además, la potente enzima ureasa que produce, degrada la mucina del moco gástrico y libera gran cantidad de amonio sobre la superficie de la mucosa gástrica provocándole daño (26). Presenta una citotoxina asociada a proteínas, la cual puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad gastroduodenal; contiene también fosfolipasa A2 que eleva las

concentraciones de lisolecitina citotóxica en los estómagos de los pacientes; proteasa y lipasa extracelular que degradan glicoproteínas y lípidos de la mucosa gástrica (27,28).

Los síntomas relacionados al tracto superior gastrointestinal pueden estar transitoriamente presentes y la respuesta inmune toma por lo menos una semana en desarrollar (29). Concomitante con la gastritis intensa está la hipoclorhidia, la cual puede durar meses. Si los modelos animales y las inferencias a la infección en la infancia humana son relevantes, la carga fecal de *H. pylori* es máxima durante este período, facilitando la transmisión a nuevos hospederos (29,30). La respuesta inflamatoria puede reducirse al estado estable de menor grado (gastritis difusa superficial crónica), el pH normal gástrico es restaurado y la persona infectada se vuelve asintomática. Este resultado persiste por años o décadas y aparece para predominar en la población. Un bajo número de personas infectadas desarrollan úlcera péptica, y una porción muy pequeña desarrolla linfoma gástrico. Sin embargo, en muchos hospederos, hay una progresión gradual del proceso inflamatorio que afecta las estructuras glandulares gástricas y su metaplasia intestinal concomitante puede considerarse como lesiones premalignas por el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (29,31). El desarrollo de gastritis atrófica también puede llevar a una declinación progresiva en la población numérica de *H. pylori*. La asociación con hipoclorhidia puede facilitar ambas colonizaciones gástricas por otro organismo entérico y proveer una oportunidad final de transmisión fecal (31).

1. Persistencia de *Helicobacter pylori*:

La mayoría de organismos de *H. pylori* viven libremente en la capa mucosa del estómago, una pequeña porción aparecen adheridos a las células epiteliales, y muy pocos invaden el tejido. De esta manera *H. pylori* es el principal organismo luminal y persiste en el pH bajo y enzimas digestivas presentes. Además, *H. pylori* debe mantenerse con el peristaltismo y con el continuo moco que libera la capa mucosa y las células epiteliales. La supervivencia de esta bacteria se ve implicada en dos factores. Primero, esencialmente no compite con otros microorganismos en el estómago. Segundo, el reconocimiento de la respuesta humoral y celular de *H. pylori*, es aparentemente inefectiva (25,27).

2. Cómo induce la inflamación *H. pylori*?

Una cuestión crítica es como *H. pylori*, induce la inflamación en la mucosa gástrica. El análisis es complicado si se observa que la inflamación gástrica se ve afectada de una manera diferente en cada persona, con variaciones marcadas en la extensión del estómago y no correlaciona directamente entre la densidad local de colonización bacteriana y la extensión de la naturaleza de la respuesta inflamatoria (25,26). Ahora se sabe que *H. pylori* interactúa con las células epiteliales gástricas. Las células epiteliales expresan moléculas clase II las cuales ayudan en la presentación de antígenos de *H. pylori* y expresan citocinas IL-8 que contribuyen a la estimulación de la respuesta inflamatoria.

Aunque *H. pylori* no está presente en la lámina propia, el antígeno y la ureasa que libera si puede detectarse. Esta bacteria libera productos extracelulares que

reclutan las células inflamatorias: monocitos/macrófagos y neutrófilos: estas células activan la liberación de mediadores, incluyendo interleucinas, TNF-alfa y peróxido. Biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* muestran un número aumentado de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células plasmáticas y linfocitos, además aumentan la expresión de citocinas como TNF-alfa, IL-6, IL-1beta, IL-8 e IL-10. La respuesta inflamatoria persiste por la duración de la infección; el tratamiento antimicrobiano para la erradicación de *H. pylori* alivia la inflamación (28).

La respuesta local de la mucosa gástrica en la colonización por *H. pylori* es causada tanto por la respuesta humoral como celular. La respuesta humoral se mide por medio de anticuerpos séricos, y por otros estudios a través de las reacciones serológicas como ELISA e INMUNOBLOT. Aunque la respuesta inmune es muy completa, local o general, específica o inespecífica, el tipo de infección ocasionado por *H. pylori* es de tipo persistente y eventualmente reincidente. En efecto, las bacterias recubiertas de anticuerpos pueden sobrevivir muy bien y también multiplicarse, puesto que éstos anticuerpos no destruyen, pero pueden sensibilizar a las bacterias para la fagocitosis (opsonización) o ayudar para que el complemento pueda actuar, aunque puede ser que en ambos casos la respuesta sea ineficaz a nivel gástrico. (25, 28)

3. Enfermedades gastroduodenales producidas por *H. pylori*

a) **Gastritis Crónica Activa:** Esta infección, usualmente dura toda la vida y es el producto de una inflamación aguda de la mucosa gástrica con la aparición de la

respuesta serológica contra la bacteria. Fuera de tratamiento, la gastritis por *H. pylori* es una enfermedad crónica. En la mayoría de las personas, la gastritis progresa lentamente (por años o décadas) o permanece virtualmente inactiva (25,29,32,33).

La atrofia de la mucosa (gastritis atrófica) implica un daño de las glándulas normales, siguiendo una alteración de la secreción gástrica, que incluye ácidos, pepsinógeno, factores intrínsecos y gastrina. El examen histológico de la mucosa gástrica en biopsia del antrum y cuerpo muestra estos cambios en funciones secretorias del estómago (22,25).

La gastritis atrófica puede aparecer de tres distintos tipos: la atrofia ocurre en el antrum (gastritis antral con atrofia, gastritis atrófica tipo B), en el cuerpo (gastritis del cuerpo con atrofia; gastritis atrófica tipo A) o en el antrum y el cuerpo simultáneamente (pangastritis con atrofia de antrum y cuerpo; gastritis atrófica tipo AB). Estos tres tipos son relativamente comunes y su prevalencia aumenta con la edad (34,35). La gastritis tipo A, que se encuentra presente en el 90 por ciento de los pacientes con anemia perniciosa. La mucosa del cuerpo y el fondo gástrico presentan una marcada atrofia glandular y epitelial, la secreción de ácido clorhídrico, pepsinógeno y factor intrínseco están marcadamente disminuidas o ausentes y los niveles de gastrina en suero están elevados. En estos pacientes se encuentran también anticuerpos séricos anti mucosa gástrica; ello refleja el carácter autoinmune de la enfermedad. *H. pylori* no es comúnmente hallado en pacientes con gastritis tipo A (35,36,37).

En la gastritis tipo B, el antro es típicamente normal mientras que el fundus se observa de una manera variable. Las células G en el antro se encuentran reducidas y los niveles de gastrina están entre el rango normal. Los anticuerpos anti-mucosa gástrica circulantes están ausentes en suero (36,39).

El factor de iniciación principal de la gastritis, es la adquisición de *H. pylori* y la fácil progresión de la gastritis es debido a la persistencia de la bacteria. Esta progresión pasa a atrofia, sin embargo, aparece menos dependiente sobre el organismo y puede deberse a otros factores que pueden ser genéticos, macroambiente (dieta, sal, drogas, humo, alcohol) o microambiente (reflujo duodenogástrico, sobrecrecimiento de bacterias intraluminal, formación intragástrica de compuestos nitrosos) (32,37).

La prevalencia de gastritis crónica en la población general es muy dependiente de la edad. Si bien la gastritis es común en el mundo, hay variación considerable en la prevalencia y es mínima en jóvenes y grupos de mediana edad. La infección es particularmente frecuente en poblaciones o subpoblaciones con estado socioeconómico bajo (36,39).

La gastritis inducida por *H. pylori* es un factor importante de riesgo en la etiología multifactorial de la úlcera péptica y cáncer gástrico. Esta causa una cascada de reacciones que dañan la mucosa gástrica y el epitelio. Los mecanismos específicos se desconocen; algunos son probablemente relacionados a reacciones bacterianas, los cuales son influenciados por varios factores de virulencia y otros

que son consecuencia de inflamación de la mucosa y atrofia (40). El riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico en pacientes con gastritis por *H. pylori* son:

- El riesgo de la úlcera péptica y el cáncer gástrico es bajo en individuos con estómago normal.
- El riesgo de úlcera péptica es aproximadamente diez veces mayor, y el riesgo de cáncer gástrico aproximadamente dos veces más alto en pacientes con gastritis no atrófica con *H. pylori* positivo que en aquellos con estómago normal.
- Estos riesgos se incrementan dos o tres veces más cuando hay atrofia en el antrum; mientras que en la presencia de atrofia del cuerpo, el riesgo de cáncer gástrico sigue alto, pero de la úlcera péptica disminuye gradualmente a cero.

b) Úlcera Gástrica: La ulceración resulta del rompimiento de la barrera de la mucosa gástrica. La actividad de la ureasa por el microorganismo es el factor capaz de romper esta barrera y con ello se inicia el proceso ulceroso (40).

c) Úlcera Duodenal: La asociación entre úlcera duodenal y *H. pylori* ha sido confirmada en estudios provenientes de todo el mundo, aunque en un grado menor, la misma asociación existe en el caso de la úlcera gástrica antral (41). Resulta difícil explicar por qué tan pocos individuos desarrollan la enfermedad, si *H. pylori* es tan frecuente. Es posible que existan cepas de *H. pylori* más ulcerogénicas que otras, como por ejemplo las que producen una toxina que induce la aparición de vacuolas en células en cultivo, llamada toxina vacuolizante. En un estudio de

pacientes con *H. pylori*, el 100 por ciento de los pacientes con úlcera duodenal y únicamente el 61 por ciento de aquellos sin úlcera tenían anticuerpos contra esta toxina (41,42). Sin embargo, los estudios sobre toxinas derivadas de *H. pylori* han producido resultados variables: algunos han postulado que la toxina corresponde a la ureasa producida por la bacteria (31) y otros que el efecto tóxico depende de la generación local de amonio (43). Es posible que todas las cepas tengan igual potencial ulcerogénico y que el efecto final de la infección dependa de la densidad local de *H. pylori* o de otros factores del hospedero, incluyendo las características de la respuesta inflamatoria inducida por el microorganismo. Tampoco está claro cómo se produce una úlcera duodenal si *H. pylori* se localiza preferentemente en el antro gástrico. Se han postulado mecanismos gástricos, especialmente la demostrada hipergastrinemia e hiperpepsinogenemia tipo I inducida por *H. pylori*, que favorecerían la hipersecreción de ácido y la aparición de úlcera duodenal. Sin embargo, el efecto real de la bacteria sobre la secreción de ácido gástrico es discutido. El 90 por ciento de los pacientes con úlcera duodenal tienen áreas de metaplasia favorecida por hipersecreción de ácido. En el 50 por ciento de los pacientes con úlcera duodenal estas áreas de metaplasia están colonizadas por *H. pylori* (21). Una vez colonizado el duodeno, *H. pylori* podría inducir úlcera a través de la inflamación o por la liberación de toxinas (43-45).

d) Cáncer Gástrico: La gastritis crónica puede ser una lesión precancerosa en el estómago humano. El 10 por ciento de los pacientes con gastritis tipo A,

desarrollan carcinoma gástrico. Algunos piensan que puede existir una asociación similar con la gastritis tipo B, pero aún no se ha demostrado (44,45)

Los genes del sistema HLA influyen sobre la susceptibilidad a un gran número de enfermedades, entre ellas, algunas neoplasias. Trabajos previos realizados en cáncer gástrico han obtenido resultados heterogéneos y poco claros, incluso contando con factores de tipo no genético como la presencia de *H. pylori*. El alelo HLA-DQAI *0501 es el más común en pacientes de cáncer gástrico y el incremento de la susceptibilidad de la infección por *H. pylori* puede ser, el mecanismo a través del cual se explicaría la asociación HLA-DQAI *0501 y el carcinoma gástrico (76).

D. Sintomatología:

H. pylori es una bacteria que coloniza el estómago y es capaz de dañarlo, ya sea a través de la producción de sustancias que directamente lo lesionan, como son enzimas y citotoxinas, o bien, desencadenando una serie de eventos inmunológicos, los cuales tienen como finalidad destruir a la bacteria; sin embargo, este objetivo no se logra realmente y lo único que ocasiona esta respuesta inmune es incrementar el daño tisular provocado por el *H. pylori*. A la lesión gástrica producida por estos mecanismos se le denomina gastritis, la cual puede complicarse con la formación de úlceras o bien, alterando el movimiento del esófago y duodeno (43,45,46).

La infección por *H. pylori* se manifiesta de muy diversas maneras, sobre todo, en la población pediátrica. Los síntomas característicos de la gastritis son dolor abdominal tipo ardoroso en la parte media superior del abdomen, náusea, vómito o agruras. Cuando predomina el vómito y las agruras, entonces la entidad se denomina enfermedad por reflujo gastroesofágico (21). En pediatría no siempre es tan obvia esta enfermedad pues los niños muy pequeños no pueden expresar sus molestias y si no tienen síntomas evidentes como son vómito o regurgitación, no es posible precisar lo que les sucede. Los episodios de reflujo gastroesofágico pueden ser muy frecuentes y prolongados, pero no ser evidentes porque sólo llegan a la parte media o inferior del esófago y a pesar de que pueden provocar dolor a este nivel, si el paciente es muy pequeño, probablemente lo único que manifieste sean síntomas inespecíficos como llanto constante, rechazo al alimento, con consecuente falta de incremento de peso y talla, lo que ocasiona frecuentemente confusión tanto en los padres como en el médico (21,47,48).

Por otro lado, la enfermedad por reflujo gastroesofágico también puede manifestarse exclusivamente con síntomas respiratorios como son tos crónica de predominio nocturno, asma o neumonías de repetición. Cuando la infección por *H. pylori* se complica con la formación de úlceras ya sea en estómago o en duodeno pueden presentarse además de los síntomas anteriores, sangrado de tubo digestivo, el cual puede evidenciarse por vómito con sangre fresca, o bien, con evacuaciones de coloración negruzca muy mal olientes y disminuidas de consistencia, características dadas por alto contenido de sangre proveniente de estómago o duodeno; si el sangrado es muy intenso puede complicarse con anemia. Finalmente también se ha observado que existen pacientes infectados con *H. pylori* que están libres de síntomas; sin embargo, se ha sugerido que éstos en algún momento de su vida presentarán alguna molestia (49,50).

E. Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*:

1. Exámenes no invasivos:

a) **Serología:** Los métodos empleados para la detección de anticuerpos son la aglutinación, la fijación de complemento y el ELISA. Este último, es el de elección para la detección de anticuerpos séricos específicos contra *H. pylori*. Los antígenos que se han empleado incluyen bacterias completas, bacterias formiladas, sonicado de la bacteria, proteínas de superficie extraídas con glicina ácida y ureasa, de todos ellos el antígeno extraído con ureasa es el más específico (98.7 por ciento), actualmente se dispone de métodos comercializados que tienen una buena aceptación (6).

Los métodos serológicos son particularmente utilizados para investigar el status de infección de un gran número de individuos en estudios epidemiológicos. En individuos no tratados y con infección de *H. pylori*, los niveles de anticuerpos están elevados establemente. Después de la erradicación, los niveles de IgG tienden a disminuir aproximadamente a la mitad de los niveles observados antes del tratamiento. Bajos niveles de IgG pueden persistir después de la erradicación, lo que permite evaluar objetivamente al paciente comparando muestras pre y post tratamiento (44, 51).

Recientemente se han desarrollado sistemas de colección de saliva y exudados de encías para medir anticuerpos IgG por el método de ELISA. En el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ, México) se trabaja actualmente en la estandarización de esta técnica en exudados de encías para determinar su concordancia con la detección de anticuerpos contra *H. pylori* en suero y establecer su valor diagnóstico (14,44).

La resolución espontánea de la infección por *H. pylori* parece ser un evento muy infrecuente. Mediante la técnica de ELISA se detectan anticuerpos IgG o IgA dirigidas contra varios antígenos específicos del *H. pylori* (51,52). La sensibilidad y especificidad superan el 90 por ciento y la erradicación se asocia a una lenta pero progresiva caída en los títulos, de modo que la mayoría de las pruebas serán negativas seis meses ó un año después de una erradicación efectiva. Estudios limitados sugieren que la reinfección se asocia a una nueva elevación de los títulos de anticuerpos. Las pruebas están disponibles comercialmente y han sido ampliamente utilizadas, especialmente en estudios epidemiológicos poblacionales (44,51).

b) **Pruebas en aire espirado (Breath Tests):** Utilizando C13, no radiactivo pero mucho más caro, o C14, que puede ser leído en un contador de centelleo, se detecta la descomposición de la urea marcada ingerida por el paciente, por la ureasa del *H. pylori*. La sensibilidad y especificidad son comparables a la serología, con la ventaja de poder confirmar la erradicación cuatro semanas después de terminada la terapia, sin necesidad de repetir la endoscopia. Falsos negativos pueden ocurrir en pacientes que toman omeprazol, antibióticos, preparaciones con bismuto o cirugía previa en el estómago (6).

La prueba con C13 origina un isótopo más estable y puede ser usado en niños y mujeres embarazadas, pero el equipo de detección es más caro que el utilizado para C14. La sensibilidad de la prueba es de aproximadamente 97 por ciento y tiene una especificidad de 80 por ciento cuando se compara con la histología (6,51).

c) **Detección de antígeno *H. pylori* en heces: nuevo método diagnóstico:**

Los métodos actuales de diagnóstico y control de erradicación de la infección por *H. pylori* a pesar de tener en general un buen rendimiento, presentan diversos inconvenientes como requerir endoscopia, tener una baja disponibilidad o una escasa especificidad. Es deseable disponer de un método diagnóstico no invasivo, aceptable para el paciente, disponible en la mayoría de los laboratorios, reproducible y barato. La detección de antígeno *H. pylori* en heces (AgHp) por el método de ELISA podría ofrecer estas ventajas en un único método (52).

La detección de AgHp en heces es un método diagnóstico rápido, cómodo, fácil y con una sensibilidad y especificidad aceptable. Además tiene ventajas sobre el test

del aliento ya que es más sencillo, barato y accesible para cualquier laboratorio. En pacientes tratados, un AgHp negativo indica erradicación exitosa (51,52).

2. Exámenes invasivos:

a) **Prueba de ureasa en biopsia antral:** Constituye el método más rápido y práctico para detectar el *H. pylori* en pacientes sometidos a endoscopia. La ureasa producida por esta bacteria convierte la urea a amonio y CO₂, lo que modifica el pH del medio y provoca el cambio de color que define la reacción como positiva. El viraje ocurre generalmente dentro de la primera hora, pero puede retrasarse hasta el día siguiente. Su sensibilidad y especificidad son comparables a las de los métodos anteriores cuando las muestras se toman en forma apropiada, aunque deben mantenerse las mismas precauciones que para las pruebas en aire espirado. Un problema adicional lo constituye la posibilidad de falsos positivos debido a pinzas de biopsia o endoscopios contaminados. Si bien las técnicas de desinfección habitual debieran eliminar este riesgo, se ha comprobado por la reacción de polimerasa en cadena (PCR) la persistencia de DNA del *H. pylori* en endoscopios después de un lavado, la cual desaparece después de 10 minutos en glutaraldehído (54,55).

b) **Histopatología:** Esta técnica aún constituye el estándar de oro para definir la presencia o ausencia de *H. pylori*, tiñendo la muestra con Giemsa. La muestra debe tomarse en mucosa antral sana, evitando la región prepilórica y la parte más baja de la curva menor. Es de utilidad en el diagnóstico inicial, aunque por su costo ha sido

reemplazada por la prueba de ureasa en biopsias, la serología. En la confirmación de la erradicación, se prefieren las pruebas en aire espirado por su carácter no invasivo (54).

H. pylori puede ser observado mediante la técnica de Hematoxilina – Eosina, pero es mejor identificada con las técnicas de Giemsa o con la técnica de Warthin-Starry o la técnica de plata de Steiner (59). La tinción de Giemsa emplea como colorante fundamental, una mezcla de tiancánicos catódicos, como el azul A, B y azul de metileno, que colorean el núcleo, mientras que la eosina para coloración citoplasmática, estas sustancias están disueltas en alcohol metílico. Su fundamento está en la disociación controlada de las sales de eosinato, que ocurre por la mezcla de Giemsa con agua destilada. La cromatina nuclear adopta la tinción azul violácea algo distinta a la habitual para los colorantes tiancánicos y que recibe la denominación de efecto Giemsa (59).

c) Cultivo: Actualmente no tiene un papel importante en el diagnóstico, debido a su lentitud y a que en muchos laboratorios su sensibilidad es menor a la de la histología, aunque es útil en pacientes en los que el tratamiento no ha logrado erradicación para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos y orientar la terapia posterior (45,59).

H. pylori puede cultivarse en medios selectivos y/o agar chocolate, presenta colonias traslúcidas, no pigmentadas, de una dimensión de 1 a 2 mm. de diámetro. Algunas cepas presentan una leve hemólisis beta. Su crecimiento óptimo es a 37°C por cinco días en un ambiente microaerofílico proporcionado en jarra anaeróbica sin catalítico ni indicador (59). La metodología utilizada para el aislamiento de *H. pylori* es independiente del tipo de muestra, sea esta una biopsia de mucosa gastrointestinal,

moco o jugo gástrico. Los medios selectivos que pueden utilizarse para su aislamiento son el de Skirrow, Butzler y Campy-Bap. A la mayoría se les adiciona un suplemento antibiótico a fin de disminuir la competencia de otras bacterias que inhiban el crecimiento de *H. pylori* en el medio de cultivo. No es recomendable utilizar un medio no selectivo para cultivar esta bacteria, las muestras inoculadas son incubadas en un ambiente microaerofílico estricto (58,59).

Para la identificación final de *H. pylori* se deben seguir los siguientes criterios:

- La aparición de colonias muy pequeñas, traslúcidas no pigmentadas con un diámetro de 1 a 2 mm en los medios de aislamiento.
 - La movilidad y morfología de la bacteria en el campo oscuro.
 - La morfología con la coloración de Gram modificado (fucsina 1 por ciento), en la cual se presenta como un bacilo Gram negativo, curvo y corto.
 - La hidrólisis de la urea es positiva.
 - La oxidasa es positiva.
 - La catalasa es positiva.

Existe un conjunto de pruebas de identificación rápidas propuestas por API BioMérieux (RAPIDEC-pylori) que analiza ureasa, fosfatasa alcalina, GGT y nitrato reductasa, pruebas que permiten un diagnóstico certero.

i. **Conservación de cepas:** Se ha descrito la utilización de diversos medios para la conservación y viabilidad de cepas de *H.pylori*, consistentes en la utilización de diferentes tipos de sangre, leche descremada, conservadores comerciales y caldos de cultivo con glicerol a diferentes concentraciones,

variando su almacenaje de -20°C hasta -196°C . Recientemente se describió la utilización de mucina de cerdo al 10% para la conservación de cepas de *H. pylori*, como opción al uso de líquido comercial de criopreservación o suero fetal bovino a -70°C y -193°C (6). Se ha recomendado la liofilización sin congelamiento, evitando el daño en el proceso tradicional causado por el congelamiento y la desecación, al utilizar una solución de ácido L-glutámico al 20 por ciento. En estas condiciones las cepas de *H. pylori* conservan su viabilidad por 7 años a -20°C (6,62). En el Departamento de Infectología del INNSZ, la conservación de *H. pylori* se realiza utilizando BHI/glicerol al 15 por ciento o caldo nutritivo/suero de caballo al 75 por ciento a -70°C , observando una mayor recuperación en este último en cepas aisladas desde 1988 (6).

d) Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR): Por su sensibilidad y especificidad podría transformarse en el método estándar futuro, aunque la ubicuidad de *H. pylori* puede generar problemas por falsos positivos. La posibilidad de estudiar diversos tipos de muestras, incluyendo tejido fijado en parafina, le abre importantes perspectivas en estudios retrospectivos y prospectivos. Esta técnica puede ser utilizada para encontrar muy bajas cantidades de un agente infeccioso presentes en muestras clínicas por medio del incremento de la cantidad de secuencias de nucleótidos específicos que contienen un determinado organismo, por síntesis directa de DNA (61,62).

F. Tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori*:

1. Uso de terapia antibiótica:

En la actualidad, el tratamiento de primera línea que debe indicarse a pacientes con úlcera gástrica o úlcera duodenal es objeto de polémica. Mientras algunos sostienen que la erradicación debe indicarse sólo en casos seleccionados basados en la efectividad del tratamiento antisecretor y los problemas que aún persisten en relación con la terapia antibiótica, otros plantean que la erradicación debe intentarse en todos los pacientes con úlcera péptica y con demostración de la presencia de *H. pylori*, considerando en la práctica la enfermedad ulcerosa como una enfermedad infecciosa más. En una reciente reunión de consenso del National Institutes for Health se recomendó esta última postura (65,66).

La multitud de esquemas de tratamiento que se han empleado con la intención de erradicar a *H. pylori* desafía los intentos de sistematización y refleja probablemente la existencia de problemas no resueltos. Los más relevantes son:

- a) La efectividad *in vitro* de múltiples antibióticos, incluyendo eritromicina, amoxicilina, fluoroquinolonas y nitrimidazoles, no se correlaciona con la actividad *in vivo* lo que obliga a usar terapias combinadas (66).
- b) Resistencia a antibióticos (nitroimidazoles): problema de importancia variable, que alcanza hasta 30% en países occidentales, pero que puede ser mucho más alto en algunos grupos seleccionados. En una comunicación reciente, al estudiar inmigrantes de Bangladesh en Londres se comprobó que 21 de 22 (95 por ciento), con cultivo positivo para *H. pylori* en la mucosa gástrica antral, presentaban resistencia *in vitro* al metronidazol (67).
- c) Efectos colaterales: se puede observar desde coloración de las deposiciones y prótesis dentales, debidos al bismuto, hasta dispepsia, rash cutáneos y colitis

pseudomembranosa atribuibles a la terapia antibiótica, presentes hasta en 30 por ciento de los pacientes.

- d) Baja adhesión al tratamiento: determinada por la frecuencia de efectos colaterales y por la necesidad de utilizar varios medicamentos en múltiples dosis diarias.

La adhesión al tratamiento y la resistencia al metronidazol son los factores que tienen mayor influencia en la tasa de erradicación (68).

El método estándar en el tratamiento de la infección por *H. pylori* está constituido por la así llamada "triple terapia" (69). Esta comprende el uso de subcitrato de bismuto (o puede sustituirse por subsalicilato), tetraciclina (o amoxicilina) y metronidazol (o tinidazol) en dosis diarias múltiples durante dos a cuatro semanas y constituye el esquema más utilizado hasta ahora, logrando tasas de erradicación entre 80 y 90 por ciento. La efectividad se reduce sustancialmente si existe resistencia al metronidazol, lo que se correlaciona con el antecedente de su uso. En la mayor parte de los casos se mantiene la administración de algún bloqueador H₂, constituyéndose verdaderamente una "cuadruple terapia". La relativa complejidad de este esquema ha estimulado el desarrollo de esquemas alternativos (68,69).

La principal y más reciente modificación ha sido la introducción del omeprazol. *in vitro*, este presenta un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *H. pylori*, pero *in vivo* no es capaz de lograr erradicación. Sin embargo, este efecto inhibitorio directo y el aumento del pH intragástrico podrían aumentar la susceptibilidad del *H. pylori* y mejorar la actividad de los antibióticos. Su introducción permite prescindir del bismuto y del bloqueador H₂ y su rápido efecto permite lograr un control completo de los

síntomas antes de agregar la antibioticoterapia, origen de la mayoría de los efectos colaterales. La combinación de omeprazol 40 mg/día y amoxicilina 2 g/día ha obtenido resultados variables entre 50 y 90 por ciento de erradicación, lo que parece relacionarse inversamente con la prevalencia de la infección en la población asintomática. Los resultados también dependen de la dosis de omeprazol y de la duración de la terapia. La información disponible sugiere que el esquema omeprazol (20-80 mg/día), amoxicilina (1.5-2.25 g/día) y metronidazol (1.2-1.5 g/día) durante una a dos semanas es tan eficaz y más simple que el esquema triasociado original, al menos en el corto plazo (69,70).

La duración del tratamiento ha sido tan variable como las drogas y las dosis empleadas. Dos semanas de tratamiento antibiótico obtienen tasas de erradicación comparables a cuatro semanas, aún en casos de resistencia *in vitro* a nitroimidazoles y podría bastar con una semana cuando se confirma la sensibilidad a estos últimos (68,69).

Dada la ubicuidad de la infección por *H. pylori* y las dificultades que representa su tratamiento es difícil diferenciar entre una erradicación y una supresión transitoria, bajo los niveles de detección de las pruebas diagnósticas habituales. Se considera erradicación a la ausencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica antral al menos cuatro semanas después de suspendida la terapia antibiótica y el omeprazol. La certificación de erradicación depende de las mismas técnicas utilizadas para el diagnóstico, la técnica más recomendable es la prueba de urea en aire espirado, por su costo, simplicidad y rápido viraje, a diferencia de la serología. Debido a los falsos negativos se han desarrollado técnicas aún más sensibles, como la PCR. Otras técnicas tales como la digestión con endonucleasas de los productos amplificados (RFLP), permiten la

diferenciación entre diversas cepas y podrían distinguir entre reinfección (debida eventualmente a una cepa distinta) o recidiva (la misma cepa) (68,69).

Las terapias actuales para combatir las infecciones causadas por *H. pylori* se basan en el uso de antibióticos que, bien llevadas, tienen una eficacia de 90 por ciento. Por otro lado, las infecciones por *H. pylori* están muy ligadas a condicionantes socioeconómicos; en grandes familias que viven en condiciones de hacinamiento, la frecuencia de la infección es hasta de 85 a 90 por ciento. Las desventajas del empleo de antibioticoterapia son la falta de apego al tratamiento y la aparición de cepas resistentes. Por esta razón, una vacuna sería de gran utilidad (69).

2. Identificación de antígenos de *H. pylori*:

Los modelos modernos de desarrollo de vacunas incluyen la identificación de antígenos obtenidos de formas purificadas, no tóxicas. Los antígenos se buscan entre los factores involucrados en la colonización e inducción de la enfermedad. A la fecha, entre los primeros se han identificado: una ureasa bacteriana, que al hidrolizar urea produce amoníaco y bióxido de carbono que amortiguan el ácido gástrico y flagelos que se necesitan para la movilidad del microorganismo en la mucosa gástrica y moléculas de adhesión que unen la bacteria al epitelio gástrico (72,73).

3. Intentos en la producción de vacunas:

En modelos animales (ratones) algunos investigadores han probado con éxito una vacuna oral preparada con bacterias lisadas de la especie *H. felis* mezcladas con el toxoide colérico. Estas pruebas demuestran que el toxoide colérico, así como las

toxinas elaboradas por *Escherichia coli*, no son muy inmunogénicas cuando se administran por vía oral sino que también confieren inmunidad contra los antígenos coadministrados (74).

Este modelo en el que se mezcla toxoide con diversos antígenos obtenidos de las cepas tipo I de *H. pylori* como ureasa, VacA purificado, VacA recombinante y CagA, entre otros, brinda buenos resultados en ratones, es decir, produce inmunización contra *H. pylori* (26,74).

La pregunta que aún permanece sin respuesta es: ¿servirá la vacunación oral contra *H. pylori* en humanos? La vacunación oral en ratones ha sido exitosa y ha conferido inmunidad contra *H. pylori*. Estos resultados son alentadores, pero debe tenerse en cuenta que existen diferencias significativas entre el sistema inmune del humano y el de ratones. Este tipo de inquietudes sólo tendrán respuesta cuando se realicen pruebas clínicas con voluntarios humanos (74).

IV. JUSTIFICACIONES

Helicobacter pylori es un microorganismo que ha sido reportado en la superficie de la mucosa gástrica de los humanos, ocasionando la gastritis crónica activa tipo B y predisponiendo a la producción de úlceras pépticas.

En Guatemala, la gastritis es muy frecuente, la cual reincide con síntomas bien definidos. Se sabe que el 70 por ciento de la población guatemalteca sufre de una infección gástrica asociada a *H. Pylori* (75), por lo que es de suma importancia realizar investigaciones para implementar metodologías inmunológicas específicas para el diagnóstico de gastritis asociada a *H. pylori*.

Los métodos actuales de diagnóstico de la infección de *H. pylori* incluyen métodos invasivos (endoscopía y biopsias gástricas), el no invasivo pero radiactivo examen de respiración ureica y la detección serológica. En las biopsias, los organismos pueden ser detectados microscópicamente por la producción de ureasa y por aislamiento a través de cultivos. Sin embargo, los métodos invasivos son dolorosos y requieren múltiples muestras, debido a la distribución desigual de las colonias de *H. pylori*.

En este estudio se evaluará el método de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* IgG en suero como una prueba diagnóstica de laboratorio.

V. OBJETIVOS

- A. Evaluar el método de ELISA para la determinación de anticuerpos séricos anti-*Helicobacter pylori* IgG marca Orgenics como una prueba diagnóstica de laboratorio.

- B. Establecer la concordancia del método de ELISA para la cuantificación de anticuerpos séricos anti-*Helicobacter pylori* contra la coloración de Giemsa obtenida de biopsia gástrica durante endoscopia.

VI. HIPOTESIS

El método ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG séricos anti-*Helicobacter pylori* marca Orgenics concuerda en un 90% con los resultados de la biopsia efectuada por el gastroenterólogo, por lo que puede utilizarse como ayuda diagnóstica en pacientes con gastritis y/o úlcera gástrica.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo:

Pacientes que asistieron a consulta de una clínica médica privada.

1. Muestra:

50 personas comprendidas entre 15 a 75 años de edad. El criterio utilizado para poder incluir a un paciente en el estudio fue que presentara uno o más síntomas gástricos: dolor en la parte alta del abdomen, náuseas, vómitos de sangre roja (hematemesis) o de sangre parcialmente digerida (de color café), heces de un color negro alquitranado (melena). Se excluyeron de este estudio a pacientes con tratamiento o diagnóstico previo de gastritis y/o úlcera gástrica.

B. Recursos:

1. Recursos humanos:

- Investigadora: Erika Suzzette Cordón Lemus
- Asesor: Lic. Rafael Pratdesaba Zea
- Personal profesional y técnico del departamento de Endodiagnosís del Hospital Privado Bella Aurora.

2. Recursos institucionales:

- Clínica Médica Privada de Dr. Alejandro Hernández Monroy
- Laboratorio Clínico de Hospital Privado Bella Aurora
- Departamento de Endodiagnosís del Hospital Privado Bella Aurora.
- Laboratorio de Patología del Dr. Hernán Molina Kirch.

3. Recursos materiales:

a) Equipo

- Centrífuga
- Refrigerador
- Cronómetro
- Computadora

b) Materiales

- Jeringas descartables de 5 cc.
- Tubos de ensayo
- Palillos
- Algodón
- Guantes desechables
- Pipeta automática de 5 a 50 ul
- Pipeta automática de 100 ul
- Tips amarillos
- Viales de reacción

c) Reactivos

- Kit comercial para la cuantificación de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* marca Orgenics.

C. Metodología

1. Determinación de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* IgG por el método de ELISA.

a) **Preparación de las muestras.** Previo a realizar la endoscopia al paciente se le extrajo asépticamente 5 cc de sangre los cuales fueron procesados en el Laboratorio Clínico. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 3,000 RPM, se separó el suero en un vial de reacción y se procedió a efectuar la prueba.

b) **Procedimiento.**

i. **Preparación de la bandeja de desarrollo** Se incubó la bandeja de desarrollo en una incubadora a 37°C por 20 minutos.

Se cubrió la mesa de trabajo con papel absorbente, para luego ser desechado como desecho biocontaminante al concluir la prueba.

Se mezcló los reactivos sacudiendo la bandeja de desarrollo.

ii. **Predilución de muestras y controles** Para cada muestra y control, se vertió 100 ul de diluyente en un tubo de reacción.

A cada tubo se agregó 10 ul de la muestra o del control positivo o negativo suministrados en el kit. Se mezcló por inversión.

iii. **Procedimiento de la prueba** Se pipeteó 25 ul de la muestra prediluida. Se perforó la cubierta de aluminio del pocillo de la fila A con el perforador y se vació la muestra en el fondo del pocillo. Se mezcló la solución vaciando y rellenando el pocillo. Se hizo el mismo procedimiento para controles.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila A donde están muestras y controles.

Se mezcló retirando e insertando el peine varias veces.

Se dejó incubando el peine en la fila A por exactamente 30 minutos. Luego se absorbió el líquido adherido a las puntas de los dientes apoyándolos sobre un papel absorbente limpio, sin tocar la superficie frontal del peine.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila B y se agitó por 2 minutos. Se retiró el peine y se absorbió el exceso de líquido.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila C y se incubó por 20 minutos. Se retiró el peine y absorbió.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila D y se agitó por 2 minutos. Se absorbió.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila E y se agitó por 2 minutos. Se absorbió.

Se insertó el peine en el pocillo de la fila F e incubó por 10 minutos. Se absorbió.

Se insertó el peine de nuevo en el pocillo de la fila E. Después de un minuto, se retiró el peine y dejó secar al aire.

iv. Validación de la prueba Para demostrar que los resultados fueron válidos, debieron cumplirse las siguientes tres condiciones:

El Control Positivo debió producir dos puntos en el diente del peine.

El Control Negativo debió producir un punto superior (Control Interno). El punto inferior no debió aparecer o aparecer tenuemente, sin afectar la interpretación de los resultados.

Cada muestra analizada debió producir un punto superior (Control Interno). Si cualquiera de las tres condiciones no se cumplió, los resultados no fueron válidos y las muestras y controles debieron ser reexaminados.

v. Interpretación de resultados Los resultados tanto de los controles como de las muestras debieron leerse con la escala de lectura (CombScale) que viene incluida en el kit (Anexo No. 6).

Se calibró el CombScale.

Se leyeron los resultados sin cambiar la posición calibrada de la regla, comparando la intensidad de color de cada punto inferior con la intensidad de color más parecida en la escala de color. Se registró el valor que apareció en la ventana sobre esa intensidad como el título aproximado de anticuerpos IgG contra *Helicobacter pylori* para la muestra correspondiente (Anexo No. 6).

2. Coloración de Giemsa: obtenida a través de endoscopia.

a) Procedimiento de endoscopia: (se realizó en la unidad de endodiagnos del Hospital Privado Bella Aurora).

Antes de la realización de la endoscopia, el paciente requirió de la siguiente preparación:

El estómago debe estar completamente vacío. No debe haber comido o tomado, incluyendo agua, aproximadamente seis horas antes del examen. Es conveniente informar al médico de los actuales medicamentos así como alergias varias días antes del examen y si tiene otras enfermedades importantes como condiciones

cardíacas o pulmonares que pueden requerir atención durante el procedimiento. Después del exámen, el paciente no debe comer ni beber alimentos durante la siguiente hora.

Previo a realizar el procedimiento, el paciente se adormeció por un corto período de tiempo, administrándole un anestésico local e intravenoso que le ayudó a relajarse durante la prueba. El médico insertó un tubo de fibra óptica flexible (con su propio lente y fuente de luz) en el estómago del paciente a través de la boca; de esta forma se visualizó el esófago, estómago y la parte superior del intestino delgado (duodeno) pudiendo el medico detectar la presencia de inflamación, úlceras o tumores del esófago, estómago o duodeno.

El médico decidió si era necesario obtener biopsias (pequeñas muestras de tejido) de zonas sospechosas de la mucosa del tracto gastrointestinal. Estas biopsias fueron enviadas al médico patólogo para su análisis.

Finalmente el tubo fue removido lentamente a medida que la mucosa fue examinada. El examen tomó de tres a quince minutos. Después de la prueba el paciente se quedó en observación hasta que la mayor parte de los efectos de los medicamentos desaparecieron. Pudo sentir molestia e inflamación en la garganta después del procedimiento.

3. Estudio de la Biopsia gástrica: (se realizó en el Laboratorio de Patología del doctor Hernán Molina Kirch).

La biopsia gástrica fue enviada al Laboratorio de Patología en frascos con formalina al 40% con su respectiva identificación.

Inicialmente se realizó un análisis macroscópico del espécimen, en donde se observó el número de fragmentos, tamaño y coloración. Luego se colocó la biopsia en papel filtro para ser tratada en un procesador de tejidos y así evitar que la muestra se desintegrara. Posteriormente se colocó en parafina líquida para hacer el bloque de parafina y se realizaron los cortes con micrótopo. Se colocó la muestra en portaobjetos y se calentó en un horno para que se terminara de adherir. Se coloreó con giemsa por 15 minutos y luego se observó al microscopio para evaluar la presencia o ausencia de bacilos curvos característicos de *Helicobacter pylori*. La cantidad de bacilos fue reportada por medio de cruces, en donde una cruz significó escasos bacilos, dos cruces regular cantidad y tres cruces o más abundantes bacilos curvos.

D. Diseño de la investigación:

a) **Muestreo:** El muestreo para este estudio se realizó de forma intencional, ya que se incluyeron a los pacientes que asistieron a consulta con el médico gastroenterólogo y que reunían los criterios de inclusión. Comprendió un total de 50 personas de ambos sexos comprendidos entre los 15 y 75 años de edad. El número de pacientes se determinó mediante la fórmula:

$$n = pqz^2 / d^2$$

en donde, n= tamaño de la muestra

p= porcentaje de pacientes con *H. pylori* positivo

q= porcentaje de pacientes con *H. pylori* negativo

z= valor del nivel de confianza

d= Límite de error establecido

b) **Manejo de la variable:** La variable fue la infección por *H. pylori* y la demostración de los resultados se realizó así:

Método de ELISA: Positivo: Título de anticuerpos IgG mayor o igual a 20 U/L.

Negativo: Título de anticuerpos menor a 20 U/L.

Biopsia (Giemsa): Positivo: Presencia de bacilos curvos.

Negativo: Ausencia de bacilos curvos.

c) **Análisis de resultados:** Se realizó una comparación de los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos séricos anti-*Helicobacter pylori* realizados por el método de ELISA y de la coloración de Giemsa (que se tomó como método standar de oro) obtenida de biopsias realizadas por endoscopia, para determinar la concordancia entre los dos métodos, utilizando la metodología de Kappa.

Para determinar la sensibilidad, especificidad, concordancia y prevalencia del método de ELISA se utilizaron las fórmulas siguientes:

Sensibilidad: $\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$

Especificidad: $\frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}}$

Concordancia:

$\frac{4 [(\text{verd. pos.}) (\text{verd. neg.})] - (\text{falsos pos.} - \text{falsos neg.})}{[2(\text{verd. pos.}) + \text{falsos pos.} + \text{falsos neg.}] [2(\text{verd. neg.}) + \text{falsos pos.} + \text{falsos neg.}]}$

Para determinar si la concordancia fue adecuada se utilizó el criterio de Fleiss:

Menor de 0.45 = No concordancia

0.45 - 0.65 = Concordancia intermedia

Mayor de 0.65 = Concordancia adecuada.

VIII. RESULTADOS

Se estudiaron un total de cincuenta pacientes entre los quince y setenta y cinco años de edad, que asistieron a una clínica médica privada. Las dos metodologías en estudio se realizaron por separado, la biopsia gástrica en el Laboratorio de Patología y la titulación de anticuerpos en el Laboratorio Clínico.

A. Determinación de anticuerpos IgG anti-*Helicobacter pylori* por el método de ELISA:

A los 50 pacientes se les realizó en el laboratorio clínico una titulación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* por el método de ELISA. Este método indica que un título mayor o igual a 20 U/ml es un resultado positivo; abajo de 20 U/ml indica que no hay presencia de anticuerpos anti-*H. pylori*. De los 50 pacientes, 28 obtuvieron un título positivo de anticuerpos séricos (mayor de 20 U/ml). A los 22 pacientes restantes no se les detectó títulos específicos para *H. pylori* (menor de 20 U/ml).

Titulación (U/ml)	No. pacientes
Menor de 20	22
20	3
40	7
60	5
80	7
120	3
Mayor de 120	3
Total	50

B. Biopsia gástrica realizada por endoscopia:

A la biopsia gástrica se le realizó una coloración de Giemsa para determinar la presencia de bacilos curvos de *H. pylori*, la cual fue reportada desde una cruz hasta tres cruces dependiendo de la cantidad de bacilos encontrados en la muestra, en donde:

+ : escasos bacilos curvos característicos de *H. pylori*

++: regular cantidad de bacilos curvos

+++: abundantes bacilos curvos

De los 50 pacientes, 31 obtuvieron un resultado positivo para *H. pylori* en la biopsia gástrica realizada y a los 19 restantes no se les detectó la presencia de bacilos curvos.

Biopsia	No. pacientes
Negativo	19
+	7
++	5
+++	19
Total	50

Al tabular los resultados obtenidos de las dos metodologías se determinó la concordancia entre ambas técnicas obteniendo los siguientes resultados (Anexo 10):

Valor de kappa:	0.881
Intervalo de confianza:	0.741 – 1.00
Sensibilidad:	90 %
Intervalo de confianza:	84.97 – 99.67%
Especificidad:	100%
Intervalo de confianza:	64.03 – 96.41%
Prevalencia:	62%

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

De las 50 muestras analizadas por las dos metodologías, 28 manifestaron concordancia entre ambos métodos, es decir, que se les detectó tanto la presencia de anticuerpos séricos IgG anti-*H. pylori* como la presencia de bacilos curvos característicos de *H. pylori* en el resultado de la biopsia gástrica. En tres pacientes no concordaron los resultados obtenidos (biopsia gástrica positiva con anticuerpos séricos negativos). La razón de esto pudo ser que en una fase temprana de la infección las bacterias de *H. pylori* colonizan la mucosa gástrica, empiezan a recubrirse por anticuerpos específicos y se inicia la respuesta humoral local, por lo que en estos tres pacientes, en los que se reporta únicamente una cruz de bacilos curvos en la biopsia, probablemente se encontraban en esta fase temprana de la infección y los niveles de anticuerpos aún no eran detectables ó eran de tipo IgM. (Anexo No. 10).

De las muestras en las que las dos metodologías concordaron, se manifestó un comportamiento directamente proporcional, esto quiere decir que si en una muestra el resultado de la titulación de anticuerpos fue de 20, en la biopsia fue reportada una cruz; en una titulación de anticuerpos de 40, la biopsia reportaba dos cruces; de 60 en adelante la biopsia reportó tres cruces (Anexo No. 8 y 9). Es importante tomar en cuenta que todas las bacterias recubiertas de anticuerpos que colonizan la mucosa pueden sobrevivir muy bien y multiplicarse, puesto que estos anticuerpos no destruyen a la bacteria, pero sí pueden sensibilizarla para la fagocitosis (25, 28).

El valor de kappa (que es un índice de concordancia entre dos técnicas de análisis) tiene un resultado de 0.881 y un intervalo de confianza de 0.741 - 1.00, lo

cual indica según el criterio de Fleiss que la concordancia es adecuada entre ambas técnicas (Anexo No. 10).

Es importante mencionar que si en la endoscopia el médico puede determinar cambios en la mucosa gástrica (inflamación, ulceraciones, etc) y determinar mediante la biopsia la presencia de *H. pylori*; éste es un método invasivo que requiere múltiples muestras, debido a la distribución desigual de la bacteria, además del alto costo de la misma (Anexo No. 11). En estos casos, el médico puede elegir otras metodologías como ELISA, tomando en cuenta que dependiendo de la titulación de anticuerpos de una muestra así será la extensión de la infección; de esta manera, puede dar el tratamiento adecuado a su paciente (Anexo No. 5). En individuos no tratados y con infección de *H. pylori*, los niveles de anticuerpos permanecen elevados establemente. Después del tratamiento, los niveles de IgG tienden a disminuir aproximadamente a la mitad de los niveles observados antes del tratamiento. Bajos niveles de IgG pueden persistir después de la erradicación, lo que permite realizar una evaluación más objetiva comparando muestras pre y post tratamiento (44, 51).

Un estudio realizado en Houston, Texas, demostró para la metodología de ELISA una especificidad del 100% y sensibilidad de 98.7%, comparándolo con la prueba del aliento (9). Actualmente, en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, están estandarizando la técnica de ELISA en exudados de encías para determinar su concordancia con la detección de anticuerpos contra *H. pylori* en suero y establecer su valor diagnóstico (44). En el presente se obtuvo una sensibilidad del 90% y una especificidad de 100%, por lo que se demuestra que el método de ELISA

para la cuantificación de anticuerpos séricos anti-*H. pylori* puede utilizarse como ayuda diagnóstica para la detección de gastritis y/o úlcera gástrica (Anexo No. 10).

IX. CONCLUSIONES

- A. Se determinó para una muestra como la del estudio que el método de ELISA marca Orgenics tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad de 100% para la detección de anticuerpos séricos anti-*H. pylori*.
- B. La hipótesis formulada para esta investigación es válida, pues los resultados concordaron en un 94% de los casos estudiados.
- C. La titulación de anticuerpos fue directamente proporcional a la cantidad de cruces de bacilos característicos de *H. pylori* reportados en la biopsia gástrica.
- D. El método de ELISA es un análisis no invasivo y de bajo costo, que puede brindar resultados confiables y rápidos al paciente para la detección de gastritis y/o úlcera gástrica por lo que puede ser utilizado por el gastroenterólogo como una ayuda diagnóstica.
- E. Se determinó que la prevalencia de gastritis y/o úlcera gástrica de los pacientes en estudio fue de un 62%.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda que en Guatemala se sigan realizando estudios relacionados a esta bacteria, pues su porcentaje de infección en la población es alto, según estudios realizados se sabe que el 70% de la población guatemalteca sufre de una infección gástrica asociada a *H. pylori*.

- B. Se recomienda realizar estudios que incluyan cultivo, aislamiento y susceptibilidad antibiótica para *Helicobacter pylori*, ya que en Guatemala los médicos se basan en estudios realizados en otros países.

XII. REFERENCIAS

1. Hunter W. *et al.* A study of the natural history of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1989; 96:A 224.
2. Warren JR, Marshal BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-5.
3. McNulty CAM, Watson DM. Spiral bacteria of gastric antrum. *Lancet* 1984; 1:1066-9.
4. Thompson LM, Smibert RM, Johnson JJ. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Bacteriol* 1988; 38: 190-200.
5. Romaniuk PH, *et al.* *Campylobacter pylori* the spiral bacterium associated with human gastritis, is no a true *Campylobacter* spp. *J Bacteriol* 1987; 169: 2137-2141.
6. Giono M, Cerezo S, *et al.* Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. INDRE, S.A., México 1994; 637: 295 - 309.
7. Mal U, Borsch G, Opferkuch W. Route of infection in *Campylobacter pylori* (CP) disease. *Gastroenterology* 1989; 96: A314.
8. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New England J Med* 1991; 324: 1043 - 1048.
9. Graham DY, Malaty HM, *et al.* Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology* 1991; 100: 1495 - 1501.
10. Blaser MJ. Epidemiology and pathophysiology of *Campylobacter pylori* infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12(1): 99 - 106.

11. Klein PD, Graham DY, *et al.* Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* 1991; 337: 1503.
12. Mendall MA, Goggin PM, *et al.* Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 1992; 339: 896 – 897.
13. Cullen DJ, Collins BJ, *et al.* When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* 1993; 34: 1681 – 1682.
14. Hopkins RJ, Vial PA, *et al.* Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: Vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis* 1993; 168: 222 – 226.
15. Figueroa G, Acuña R, *et al.* Respuesta de anticuerpos IgG en pacientes colonizados por *Helicobacter pylori*. *Rev Med Chile* 1990; 118: 1195 – 1200.
16. Thomas JE, Gibson G, *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. *Lancet* 1992; 340: 1194 – 1195.
17. Drumm B, Pérez-Pérez GI, *et al.* Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N England J Med* 1990; 322: 359 – 362.
18. Lee A, Fox JG, *et al.* Transmission of *Helicobacter* spp: a challenge to the Dogma of faecal-oral spread. *Epidemiol Infect* 1991; 107: 99 – 109.
19. Ramirez – Ramos, A. *et al.* *Helicobacter pylori* and gastritis in peruvian patients; relationship to socioeconomic level, age, and sex. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 819 – 823.
20. Malaty HM, *et al.* *Helicobacter pylori* in Hispanics: Comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic status. *Gastroenterology* 1992; 103: 813 – 816.

21. Blecker B, Hauser B, *et al.* Symptomatology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Paediatrica* 1996; 85: 1156 – 1158.
22. Cohen M, Cueto E, Drut R. Infección gástrica por *Helicobacter pylori*: Una enfermedad del adulto que comienza en la niñez. *Gastroenterology* 1992; 102: 744 – 745.
23. Daskalopoulos G, *et al.* Relationship of patient's country of origin to endoscopic frequency of *Campylobacter pyloridis* gastritis. *Gastroenterology* 1987; 92: A1363.
24. Megraud C, *et al.* *Campylobacter* sp. Infection – evidence for a worldwide distribution and high prevalence in developing countries. *Gastroenterology* 1989; 96: A338.
25. Blaser MJ, Chyou PH, Nomina A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; 96: 33 – 36.
26. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest*, 1994; 94: 4 – 8.
27. Peek RM, Miller GG, *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 28 – 32.
28. Cover TL, Blaser MJ, *et al.* Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 1066 – 1073.
29. Hazell SL, Lee A, *et al.* *Campylobacter pyloridis* and gastritis: Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986; 153: 658 – 663.

30. Defize J, Goldie J, Hunt RH. Inhibition of acid production by *Campylobacter pylori* in isolated pig parietal cells. *Gastroenterology*, 1989; 96: A114.
31. Tytgat GNJ, Raws EAJ. *Campylobacter pylori* and its role in peptic ulcer disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1990; 19: 183 – 192.
32. Rauws EAJ, *et al.* *Campylobacter pyloridis* – associated chronic active antral gastritis. *Gastroenterology*; 1988; 94: 33 – 40.
33. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273.
34. Talley NJ, Blaser MJ, *et al.* Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: Comparison of enzyme – linked immunosorbent assays: *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 1635 – 1640.
35. Czinn SJ, Dahms BB, *et al.* *Campylobacter* – like organisms in association with symptomatic gastritis in children. *J Pediatric* 1986; 109: 80 – 83.
36. Genta RM, Hammer HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: Frequency, distribution, and response to triple therapy. *Human Pathol* 1993; 24: 577 – 583.
37. Leung KM, Hui PK, *et al.* *Helicobacter pylori* – related gastritis and gastric ulcer: a continuum of progressive epithelial degeneration. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 569 – 574.
38. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273 – 1275.
39. Rocha GA, Queiroz DM, *et al.* *Helicobacter pylori* acute gastritis: histological, endoscopic, clinical, and therapeutic features. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 1592 – 1595.

40. Matsui K, et al. *Campylobacter pylori* and gastric ulcer: Histopathology. *Gastroenterology* 1989; 96: A328.
41. Goodwin CS. Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori* and the "leaking roof" concept. *Lancet* 1988; II: 1467 - 1469.
42. Moss S, Meyer -Wyss B, et al. Influence of *Helicobacter pylori*, Sex and Age on Serum Gastrin and Pepsinogen concentration in subjects without symptoms and patients with Duodenal Ulcers. *Gut* 1993; 34: 752 - 756.
43. Alper J. Ulcers as an infectious disease. *Science*, 1993; 260: 159 - 160.
44. Moss S, Calam J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut* 1992; 33: 289 - 292.
45. Bousquet U. Ulceras Gástrica y Duodenal. *Gaz Med* 1991; 98 - 99.
46. Strauss RM, et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with dyspeptic symptoms in patients undergoing gastroduodenoscopy. *Am J Med* 1990; 89: 464 - 469.
47. Bourke B, Jones N, Sherman P. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children. *Pediatric Infect Dis J* 1996; 15 1 - 13.
48. Canadrel S. *Campylobacter pyloridis* in children. *Lancet* 1996; 2: 735 - 736.
49. Kuipers EJ, Lundell L, et al. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *NEJM* 1996; 16: 1018 - 1022.
50. Macartur C, Saunders N, Feldman W. *Helicobacter pylori* Gastroduodenal disease, and recurrent abdominal pain in children. *JAMA* 1, 1995; 9: 729 - 734.

51. Veenandaal RA, Peña AS, *et al.* Long term serological surveillance after treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1991; 32: 1291 – 1296.
52. Marshall B, Surveyor I. Fifteen minute urea –C14 breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *Gastroenterology* 1987; 92: A1518.
53. Romero M, Bernal S, *et al.* Detección de antígeno *Helicobacter pylori* en heces: Nuevo método diagnóstico para el manejo de la infección por *Helicobacter pylori*. *Comunicaciones Orales SAPD*, 1996: 1 – 2.
54. Deltenre M. *et al.* Assessment of four modalities of urease test in the diagnosis and follow up of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *Gastroenterology* 1989; 96: 117.
55. Boero M, *et al.* Evaluation of a new rapid urease test for *Campylobacter pylori* in comparison to clo-test and quick-campyl test. *Gastroenterology* 1989; 96: A48.
56. Boon E, Mathilde. *Microwave cookbook of pathology*. Second Revised Edition. Leinden 1989: 1-3.
57. Corominas JM, *et al.* Utilidad de la microondas en el laboratorio de Anatomía Patológica. *Patología*, 1987; 20: 4.
58. Alonso MJ. Modificación de la técnica de Ziehl Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización de microondas. *Patología* 1996; 29: 1.
59. Krajden S, *et al.* Comparison of selective and non selective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1117 – 1118.
60. Goodwin CS, *et al.* Evaluation of cultural technique for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopses of gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1985; 38: 1127 -1131.

61. Valentine JL, Arthur RR, *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 689 – 695.
62. Ho SA, Hoyle JA, *et al.* Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2453 – 2459.
63. Graham DY, Lew GM, *et al.* Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long – term recurrence of gastric and duodenal ulcer. *Ann Int Med* 1992; 116: 705 – 708.
64. Marshall BJ, *et al.* Prospective double – blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1988; 2: 1437 – 1441.
65. Rauws EA, Tytgat GN. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990; 335: 1233 – 1235.
66. Graham DY, Borsch GMA. The who's and when's of therapy for *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1552 – 1554.
67. Banatuala N, *et al.* 95% Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* infection in a Asian Community. *Gastroenterology*, 1993; 104: 437.
68. Graham DY, *et al.* Factors influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy. *Gastroenterology*, 1992; 102: 493 – 496.
69. Graham DY. Treatment of Peptic Ulcers caused by *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med* 1993; 328: 349 – 350.
70. Schaulferberger H, *et al.* The dose & frequency of omeprazole are important in treating *Helicobacter pylori* with dual therapy. *Gastroenterology* 1993; 104: A186.
71. Megaud F, *et al.* Polymerase chain reaction for routine *Helicobacter pylori* diagnosis. Is it worthwhile or superflous technique? *Gastroenterology* 1993; 104: A742.

72. Goodman SN, Berlin JA. The use of predicted confidence intervals when planning experiments and the misuse of power when interpreting results. *Ann Intern Med*, 1994; 121: 200 – 206.
73. Mohamed AM, *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori*: a meta – analysis. *Gastroenterology*, 1994; 106: A142.
74. Sellman S. Vaccine strategies for prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol & Hepatol*, 1995; 65: 506 – 511.
75. Vettorazi, MC. Detección de *Helicobacter pylori* en biopsias gastrointestinales y correlación con microbiota gástrica autóctona. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 76p.

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1

Especies del Género *Helicobacter*:

Género y especie	Hospedero	Localización
<i>Helicobacter pylori</i>	Hombre	Estómago
<i>Helicobacter mustelae</i>	Rata y ratón	Intestino delgado
<i>Helicobacter felis</i>	Gato	Estómago
<i>Helicobacter nemestrinae</i>	Cerdo y mono	Estómago
<i>Helicobacter acinonyx</i>	Leopardo	Estómago
<i>Helicobacter cinaedi</i>	Hombre	Intestino delgado
<i>Helicobacter fenelliae</i>	Hombre	Intestino delgado
<i>Helicobacter rappini</i>	Carnero y perro	Estómago
	Hombre	Intestino delgado

Tomado de: Giono M, Cerezo S, et al. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales, INDRE, S.A. (6).

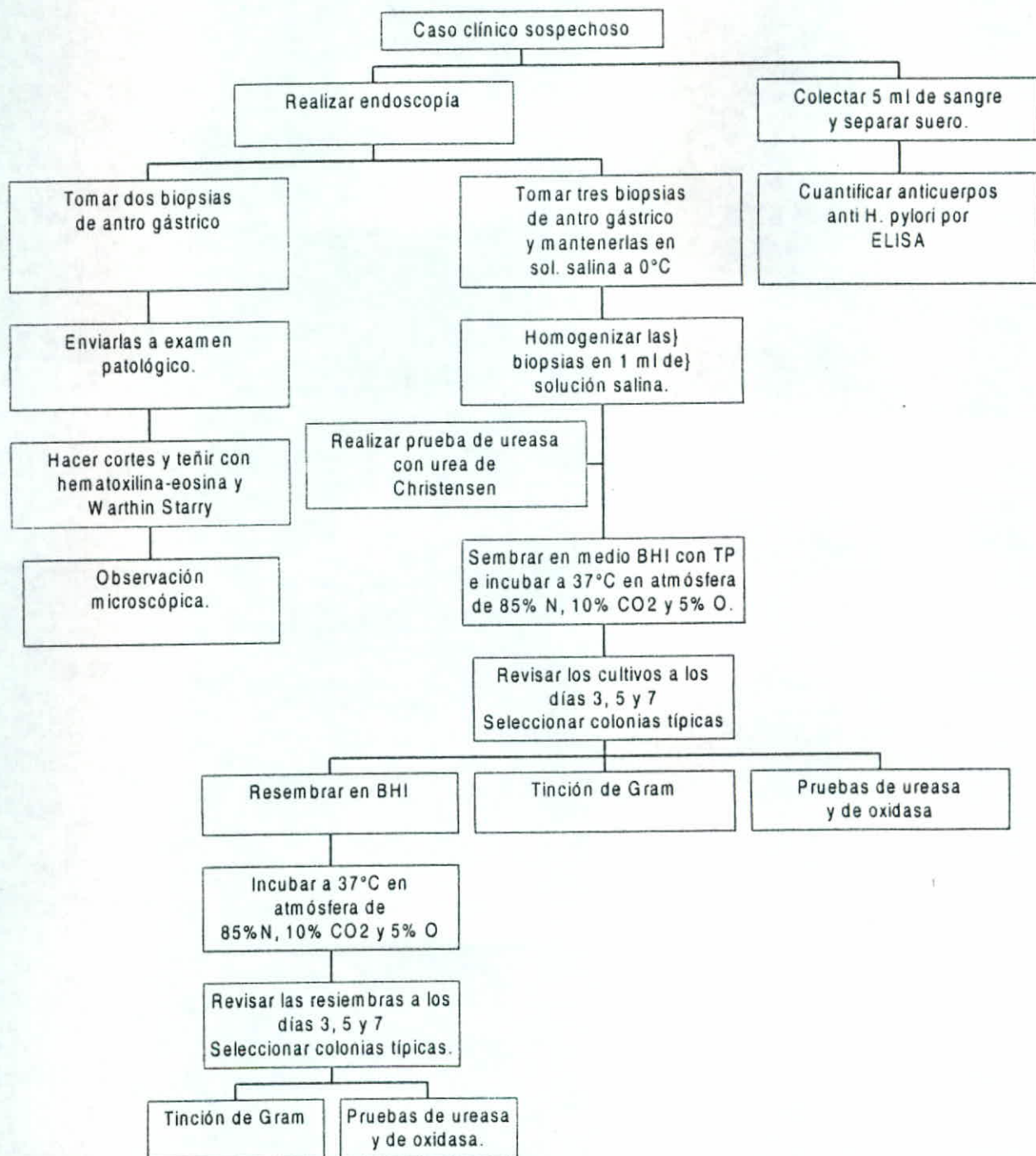
ANEXO No. 2

Pruebas bioquímicas de diferenciación del género *Helicobacter* y otros géneros afines

Características	Campylobacter jejuni NCTC 11341	Helicobacter pylori NCTC 11637	Helicobacter mustelae NCTC 12032	Wollinella succinogenes NCTC 11488	Helicobacter rappini NCTC 1893
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+
Ureasa	-	+	+	-	+
Hidrólisis de hipurato	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	-	+	+	-
Fosfatasa alcalina	D	+	+	-	-
D-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 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: Giono M, Cerezo S, *et al.* Diagnóstico de Infecciones Gastrointestinales. INDRE, S.A. (6

ANEXO No. 3

Identificación de *Helicobacter pylori*

Tomado de: Giono M, Cerezo S, *et al.* Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales, INDRE, S.A. (6).

ANEXO No. 4

Medios de cultivo útiles para el aislamiento de

Helicobacter pylori

Medios sólidos con Sangre de caballo*	Medios líquidos con suero de caballo	Medios sólidos sin sangre de caballo
Caldo BHI** con 10% d/agar	Caldo BHI	Agar Columbia
Agar Brucella	Caldo Mueller-Hinton	Hemina
Agar Mueller-Hinton	Caldo Brucella	Rojo fenol
Agar Skirrow	Caldo soya-tripticasa	Isovitalex
Agar Columbia		Urea
Agar Campylobacter modificado		Agar Columbia
Agar chocolate		Carbón activado
Agar base GC***		Piruvato de sodio
		Hemina

* Sangre o suero de caballo al 10%

** BHI: Infusión de cerebro y corazón

*** GC: gonococos

Tomado de: Giono M, Cerezo S, *et al.* Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones
Gastrointestinales, INDRE, S.A. (6).

ANEXO No. 5

Comparación de resultados de Anticuerpos séricos anti *H. pylori* vrs. Biopsia gástrica y Diagnóstico Médico

Numero de paciente	Resultado Ac. <i>H. pylori</i> (U/ml)	Resultado Biopsia (en cruces)	Diagnóstico Médico
1	120	+++	GSA ^a , severa ^d
2	Menor de 20	Negativo	Duodenitis no erosiva
3	Menor de 20	Negativo	Normal
4	80	+++	GSA, moderada ^c
5	40	+	GSA, leve ^b
6	Menor de 20	Negativo	Colitis aguda inesp.
7	40	++	GSA, moderada
8	60	+++	GSA, moderada
9	Menor de 20	Negativo	Reflujo gastroduodenal
10	80	+++	GSA atrófica, severa
11	Menor de 20	Negativo	Normal
12	Menor de 20	Negativo	Normal
13	60	+++	GSA, moderada
14	Menor de 20	+	GS, leve
15	Menor de 20	Negativo	Adenoma tubular
16	Menor de 20	Negativo	Duodenitis
17	40	++	GSA, moderada
18	60	+++	GSA, severa
19	20	+	GSA, moderada
20	Menor de 20	+	GS, leve
21	Menor de 20	Negativo	Normal
22	80	+++	GS atrofica, mod.
23	60	+++	GSA, moderada
24	Menor de 20	Negativo	Duodenitis
25	Menor de 20	Negativo	Normal
26	40	++	GSA, moderada
27	20	+	GSA, leve

Numero de paciente	Resultado Ac. H. pylori (U/ml)	Resultado Biopsia (en cruces)	Diagnóstico Médico
28	40	+++	GSA, moderada
29	40	++	GSA, moderada
30	120	+++	GSA, severa
31	Menor de 20	Negativo	Normal
32	40	++	GSA, leve
33	80	+++	GSA, moderada
34	Menor de 20	+	GSA, leve
35	20	+	GSA, leve
36	Menor de 20	Negativo	Duodenitis
37	Menor de 20	Negativo	Normal
38	Menor de 20	Negativo	Reflujo gastroduodenal
39	60	+++	GSA, severa
40	80	+++	GSA, severa
41	80	+++	GSA, moderada
42	Menor de 20	Negativo	Normal
43	Menor de 20	Negativo	Normal
44	120	+++	GSA atrófica, severa
45	Menor de 20	Negativo	Normal
46	80	+++	GSA, severa
47	Mayor de 120	+++	GSA, severa
48	Mayor de 120	+++	GSA, severa
49	Mayor de 120	+++	GSA atrófica, severa
50	Menor de 20	Negativo	Normal

- a: **GSA: Gastritis superficial Activa**
b: **Leve: Infiltración neutrófila presente en acinos de lámina propia**
c: **Moderada: Infiltración neutrófila presente en aprox. 50% de acinos**
d: **Severa: Infiltración neutrófila obvia en 75% de acinos**

- ANEXO No. 6

**Escala de lectura para los resultados de la cuantificación de anticuerpos séricos
anti-*Helicobacter pylori* IgG.**

El nivel de anticuerpos IgG anti *H. Pylori* en cada muestra puede ser evaluado comparando la intensidad del color del punto inferior en cada diente, con la escala de color en el CombScale proporcionado en cada kit comercial.

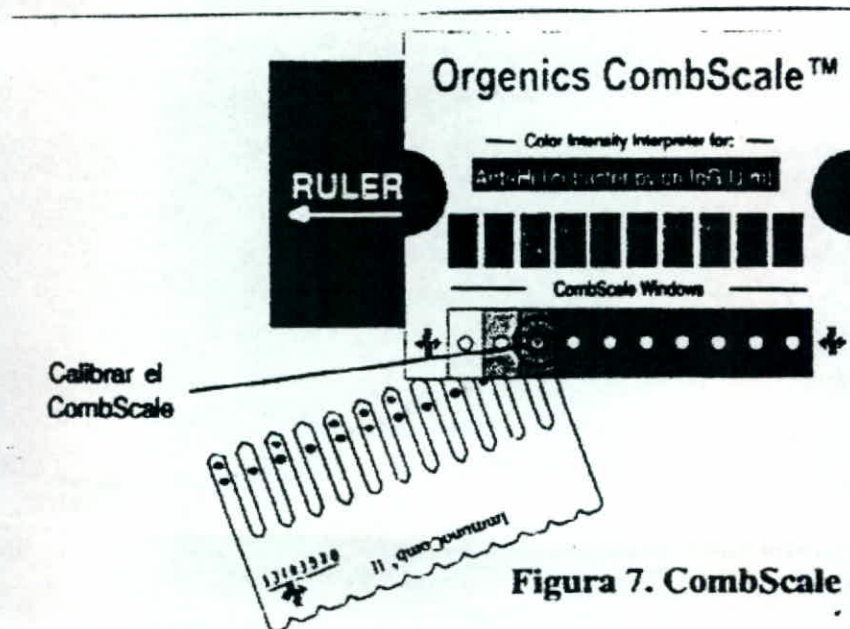
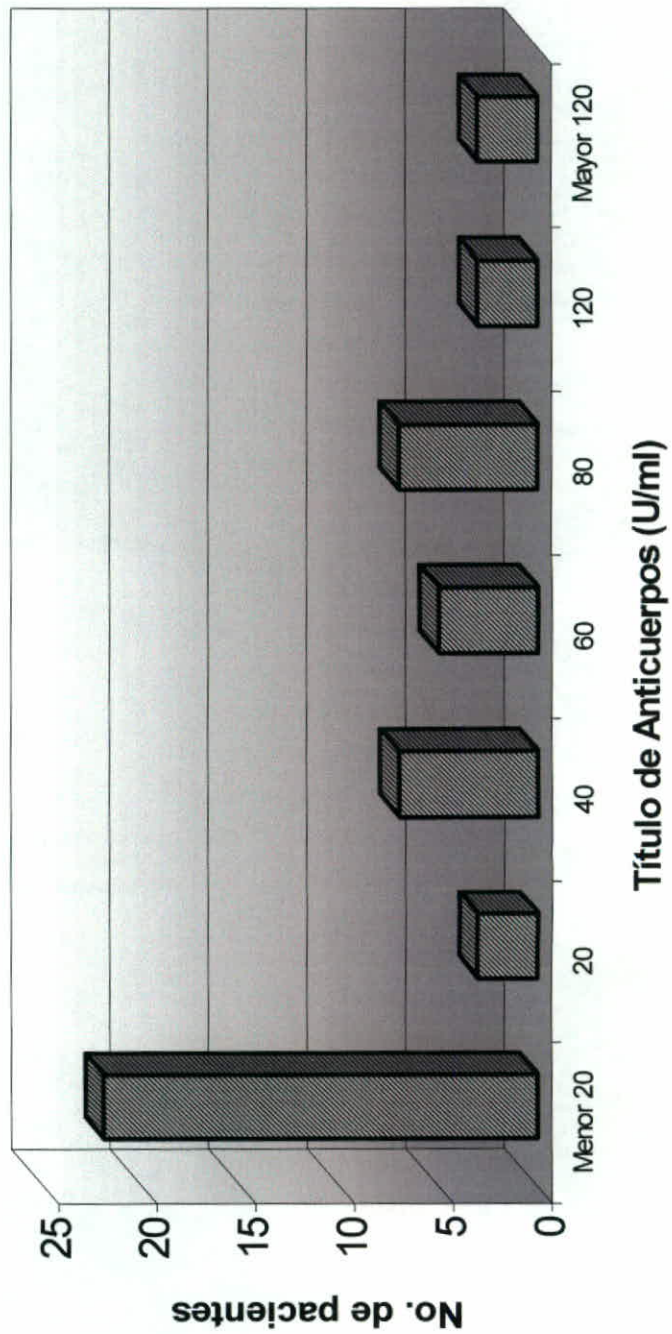


Figura 7. CombScale

Tomado de: Kit comercial de Determinación cuantitativa de anticuerpos IgG anti-*Helicobacter pylori*. InmunoComb II. Orgenics.

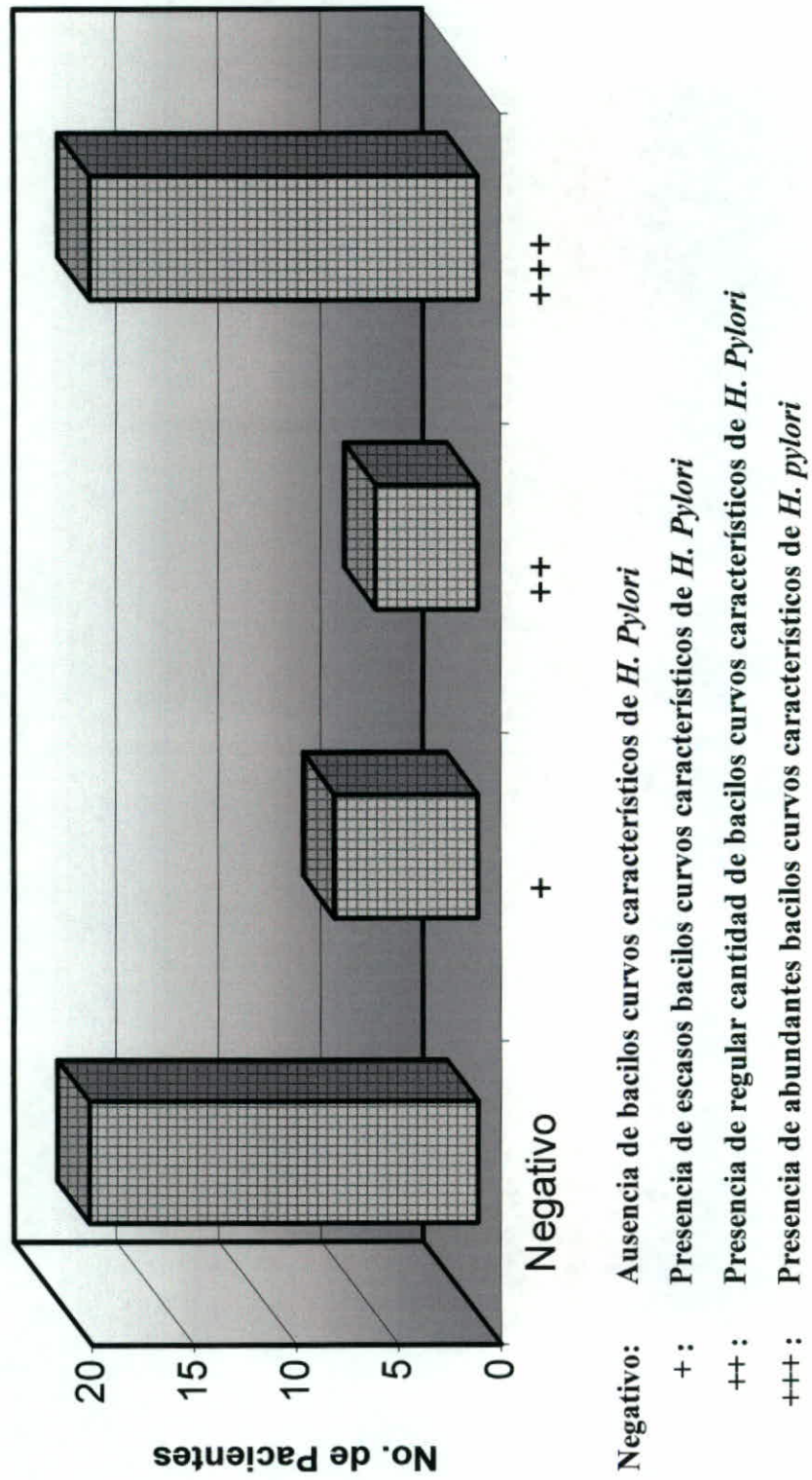
ANEXO No. 7

Gráfica No. 1: Resultados de la determinación de anticuerpos séricos IgG por el método de ELISA



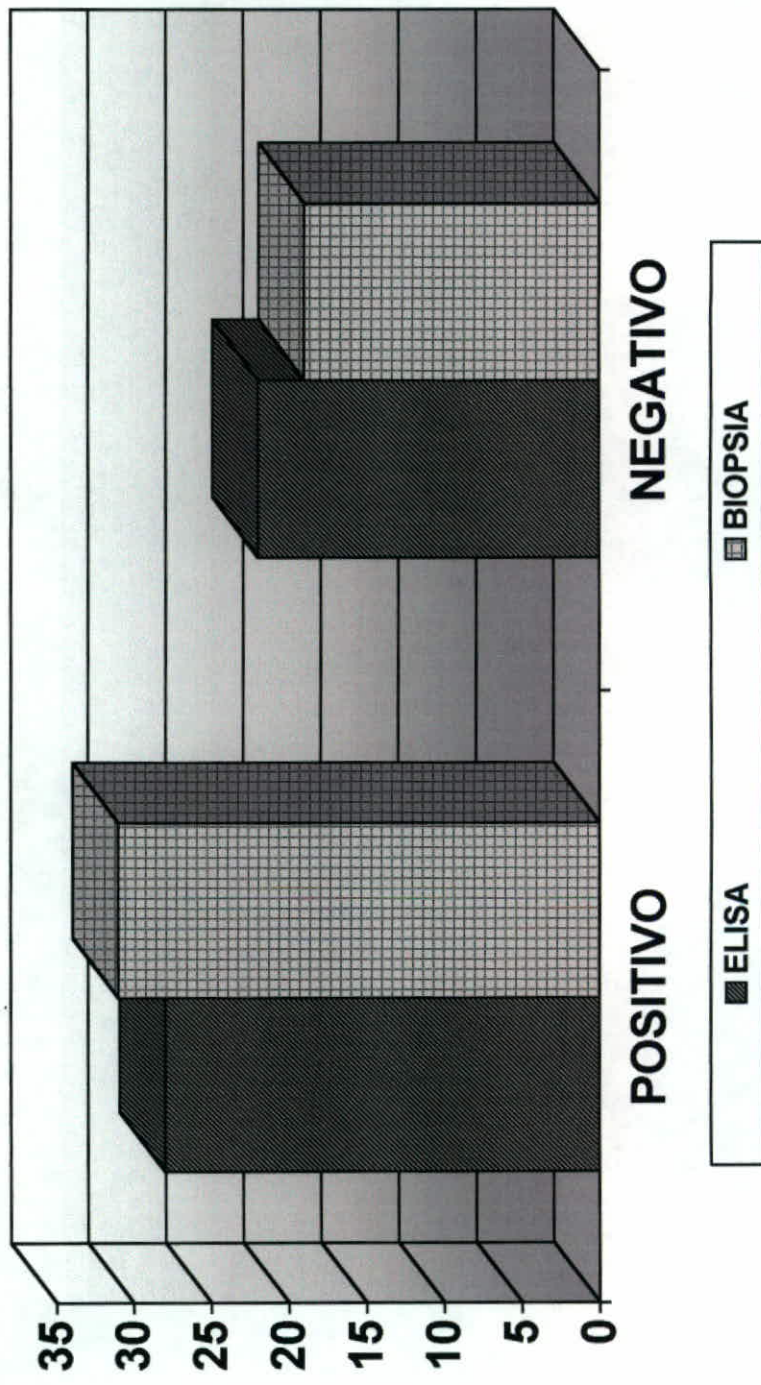
ANEXO NO. 8

Gráfica No. 2: Resultados de la Biopsia Gástrica, reportada en cruces



ANEXO No. 9

Gráfica No. 3: Comparación de resultados: Determinación de anticuerpos séricos IgG por el método de ELISA vrs. Biopsia gástrica



ANEXO No. 10

**Concordancia entre Determinación de anticuerpos séricos anti-*Helicobacter pylori*
por el método de ELISA vrs. Biopsia gástrica**

		METODO ELISA		TOTALES MARGINALES
		POSITIVO	NEGATIVO	
BIOPSIA	POSITIVO	28	3	19
	NEGATIVO	0	19	19
TOTAL		28	22	50

Cálculos:

$$A = \text{verdaderos positivos} = 28$$

$$B = \text{falsos positivos} = 0$$

$$C = \text{falsos negativos} = 3$$

$$D = \text{verdaderos negativos} = 19$$

$$\begin{aligned} \text{Sensibilidad} &= A/A + C \\ &= 28/28 + 3 \\ &= 90\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Especificidad} &= D/D + B \\ &= 19/19 + 0 \\ &= 100\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Concordancia} &= 4(AD - BC) - (B - C) / (2A + B + C) (2D + B + C) \\ &= 4[(28 \times 19) - (0 \times 3)] - (0 - 3) / (2 \times 28 + 0 + 3) (2 \times 19 + 0 + 3) \\ &= 4(532 - 0) - (-3) / 59 \times 41 \\ &= 2131 / 2419 \\ &= 0.881\end{aligned}$$

PARA FLEISS:

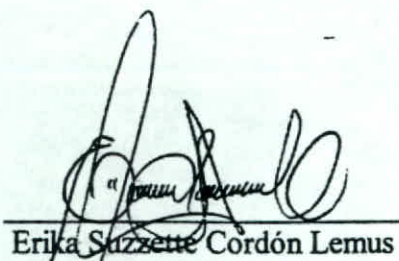
Menor de 0.45 = No Concordancia

0.45 - 0.65 = Concordancia Intermedia

Mayor de 0.65 = Concordancia adecuada

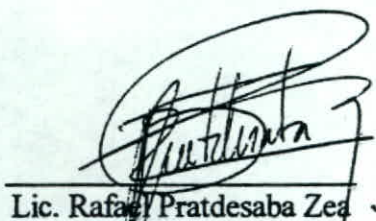
Anexo No. 11**Precios de endoscopia y anticuerpos séricos****(Hospital Privado Bella Aurora)**

Precio de endoscopia (quetzales)	Precio de anticuerpos séricos (quetzales)
2,000.00	55.00



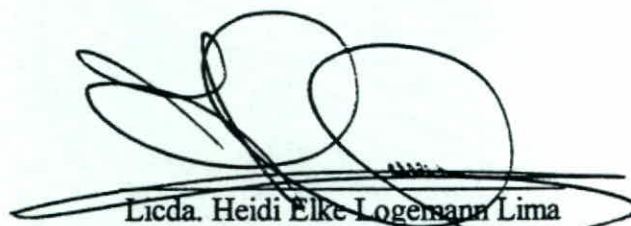
Erika Suzzette Córdon Lemus

TESISTA



Lic. Rafael Pradesaba Zea

ASESOR



Licda. Heidi Elke Logemann Lima

DIRECTORA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

DECANA