

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LA
TÉCNICA DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE
HELICOBACTER PYLORI EN HECES Y SU ASOCIACIÓN
CON EL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO**

LUZBETH MARTHA PATRICIA VALDEZ CASASOLA

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background, a golden crown at the top, and a golden lion rampant on the right. Below the shield are two green mountains. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin motto "SIBI ET OMNIBUS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTITANENSIS" in a serif font.

**EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LA
TÉCNICA DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE
HELICOBACTER PYLORI EN HECES Y SU ASOCIACIÓN
CON EL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO**

Informe de Tesis

Presentado por

LUZBETH MARTHA PATRICIA VALDEZ CASASOLA

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva, Soto, M.A.	Secretario
Licda Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Por ser el ser la luz que guía mi camino y la fuente inagotable de toda la sabiduría en cada etapa de mi vida. Es un honor formar parte de las filas de su ejército.

A MIS PADRES: Dr. Carlos Jorge Valdez Kunze y Marta Elizabeth Casasola de Valdez. Dos héroes en mi vida que me han motivado a llegar a este momento, gracias por ser mi guía, mi fuente de inspiración y quienes me han apoyado incondicionalmente en todos los aspectos de mi vida. Gracias por motivarme a ser mejor cada día alcanzando mis sueños, metas y propósitos. Este logro alcanzado no sería posible si ustedes no hubieran estado a mi lado dándome palabras de aliento y diciéndome que todo me es posible. Las palabras no pueden expresar todo mi amor y gratitud, siempre los amaré.

A MI HERMANO: Ing. Luis Alberto Valdez Casasola por ser mi cómplice en todo momento de mi vida, por las sonrisas compartidas, las palabras de aliento y ser mi ayuda cuando más lo he necesitado. Gracias por estar siempre a mi lado y brindarme tu amor incondicional.

A MIS ABUELITOS: Luis Valdez por su amor y sus oraciones constantes para mi vida. Clara Luz Kunze, Alberto Casasola y Marta Morales con amor eterno que desde el cielo celebran junto a mi este momento.

A MIS TIOS Y PRIMOS: Con amor por todos los momentos compartidos. En especial a Isabel Valdez, Héctor Casasola y Alejandro Casasola quienes dejaron una huella invaluable en mi durante el tiempo que tuve el privilegio de disfrutar de su alegría.

A MIS SOBRINOS: Con todo mi amor y como ejemplo de perseverancia y esfuerzo.

A MIS AMIGOS: A cada uno de ustedes por compartir a mi lado, y por el apoyo brindado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A la Gloriosa Tricentenario Universidad de San Carlos de Guatemala: Centro de estudios que me brindo las herramientas necesarias para ejercer mi vida profesional. Especialmente a la Escuela de Química Biológica.

A mi Asesor: MSc. Gerardo Arroyo por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación y amistad brindada.

A MSc . Vivian Matta: Por su apoyo en la elaboración de la presente investigación.

A mi Revisora: Licda. Karla Lange por su revisión y asesoramiento en la presente investigación.

INDICE

Tema	No de página
I. Resumen	2
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. Definición	5
B. Historia	5
1. Primeras evidencias	5
2. Redescubrimiento y caracterización	6
3. Origen del nombre	6
4. Implicación en patogénesis	6
C. Características generales	7
D. Patogénesis	8
E. Epidemiología	8
1. Aspectos básicos	9
2. Factores de riesgo	10
3. Epidemiología en Guatemala	13
F. Patogenia y patología	14
G. Inmunología	20
H. Fisiopatología	21
I. Diagnóstico	25
J. Tratamiento	29
IV. Justificación	34
V. Objetivos	35
VI. Hipótesis	36
VII. Materiales y métodos	37
A. Universo y muestra	37
1. Universo	37
2. Muestra	37
B. Recursos	38
C. Materiales	38
D. Metodología	39
E. Diseño experimental	41
VIII. Resultados	43
IX. Discusión de resultados	47
X. Conclusiones	50
XI. Recomendaciones	51
XII. Referencias	52
XIII. Anexos	56

I. RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es de distribución cosmopolita y ha adquirido mucha importancia en las últimas décadas, debido a su asociación con patologías gástricas que incluyen varios tipos de gastritis y cáncer de estómago.

Con el objetivo de establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba para detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces y comparar los resultados con los de la técnica estándar de oro (estudio histológico), en una población de pacientes con sintomatología gastrointestinal sugestiva de infección por *H. pylori*, como una alternativa no invasiva y de menor costo para el diagnóstico de esta infección, se realizó el presente estudio.

Se estudiaron 75 pacientes que acudieron a una clínica privada para evaluación endoscópica y diagnóstico de infección por *H. pylori* en muestras fecales, ninguno refería haber tomado antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, ni compuestos con sales de bismuto. A todos ellos se les practicó una endoscopia gastrointestinal con la finalidad de obtener muestras para estudio histológico, y determinación de antígeno de *H. pylori* en muestra fecal para estudiar la presencia de este antígeno.

El estudio reveló que 47 (62.7%) de los 75 pacientes estudiados (índice de confianza del 95%) mostraron estar infectados por *H. pylori* tanto por la determinación de antígeno de *H. pylori* en heces como en biopsia y únicamente 2 de los 75 pacientes mostraron ser positivos únicamente en biopsia, no se encontró ningún resultado falso positivo en la determinación de antígeno de *H. pylori* en heces.

La prueba para determinación de antígeno de *H. pylori* además de buena sensibilidad (95.9%) y especificidad (100%) que ha manifestado en este estudio, aporta ventajas sobre las otras técnicas invasivas, por su simplicidad en la obtención de la muestra, realización de la técnica, rapidez en la obtención de los resultados y bajo costo económico para la población guatemalteca.

II. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de la mucosa gástrica causada por *Helicobacter pylori* han adquirido un papel importante en las últimas décadas, debido a su asociación con patologías tales como gastritis y cáncer de estómago, las cuales pueden llegar a comprometer la vida del paciente si no son tratadas a tiempo.

H. pylori es una bacteria Gram negativo, con forma de espiral, flagelada, que infecta la mucosa del estómago humano, causando severos daños a la misma como úlceras y gastritis.

Conocer la epidemiología de la infección es de suma importancia, ya que permite obtener datos sobre la población que es afectada frecuentemente por esta bacteria, debido a que la misma no tiene distinción de edad, raza ni género. De igual manera se han identificado factores de riesgo que se asocian a la infección por *H. pylori*, entre los cuales se encuentran ocupacionales como profesionales de la salud, médicos veterinarios, personal de limpieza entre otros. También factores genéticos, un decreciente nivel económico, higiénico, y sanitario se pueden asociar con la infección.

Existen varios métodos por los cuales se puede diagnosticar la presencia de la bacteria en la mucosa gástrica, entre los cuales se encuentran métodos directos o invasivos, que incluyen la biopsia obtenida por endoscopia, cultivo, histología, test de ureasa, PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), y tipificación molecular mediante PCR-RFLP (Técnica de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar fragmentos de ADN y después cortarlos con enzimas de restricción visualizándolos con luz UV); y los métodos indirectos o no invasivos, que prescinden de la biopsia, tales como serología (para anticuerpos IgG, IgM, IgA), prueba de urea en aire espirado y la detección de antígenos de *H. pylori* en heces. Sin embargo la enfermedad en la mayoría de pacientes infectados es asintomática, por lo que el diagnóstico nunca se realiza y por ende tampoco se recibe el tratamiento adecuado.

El presente trabajo tiene el propósito de evaluar la técnica para la determinación de antígeno de *H. pylori* en heces para correlacionar los resultados obtenidos por esta

técnica con el diagnóstico histopatológico en pacientes que acuden a una clínica privada y con ello poder utilizarla como una técnica no invasiva confiable, certera y de menor costo en comparación con el estándar de oro.

Para realizar la presente investigación, se colectaron muestras de heces de pacientes que acudieron a una clínica privada para la realización de endoscopia gástrica determinando la presencia y correlación de las pruebas diagnósticas en los pacientes atendidos.

III. ANTECEDENTES

A. Definición

Helicobacter pylori es una bacteria que infecta las células epiteliales mucosecretoras del epitelio estomacal humano es responsable de la mayoría de úlceras gástricas y gastritis crónica. Este organismo puede debilitar la cubierta protectora del estómago y el duodeno, permitiendo que los jugos digestivos irriten el revestimiento de estas porciones del aparato digestivo aunque en muchos casos los sujetos infectados nunca llegan a desarrollar ningún tipo de sintomatología (1).

Esta bacteria vive exclusivamente en el estómago humano, siendo el único microorganismo conocido que puede subsistir en un ambiente tan extremadamente ácido (1).

B. Historia

1. Primeras evidencias

En 1875, científicos alemanes descubrieron bacterias con forma espiralada dentro del epitelio del estómago humano. Estas bacterias no podían ser cultivadas y por consiguiente este descubrimiento se olvidó en aquel momento y sería hasta 1892, que el investigador italiano Giulio Bizzozero describió una serie de bacterias espirales que vivían en el ambiente ácido del estómago de perros (2).

Años más tarde, en 1899 el profesor Walery Jaworski de la Universidad de Jagiellonian en Cracovia investigó sedimentos de lavados gástricos obtenidos de humanos, encontrando bacterias alargadas, pero mucho más importante unas bacterias con una forma de espiral muy característica a las cuales llamó *Vibrio rugul*. Convirtiéndose así en el primer investigador en sugerir la participación de este microorganismo en enfermedades gástricas. Aunque este trabajo fue incluido en el "Manual de Enfermedades Gástricas", no tuvo impacto relevante debido a que estaba escrito en polaco (2).

2. Redescubrimiento y caracterización

Esta bacteria fue redescubierta en 1979 por el patólogo australiano Robin Warren, quien en investigaciones posteriores (a partir de 1981) junto a Barry Marshall, aisló este microorganismo de las mucosas de estómagos humanos y fue el primero que consiguió cultivarla. En el trabajo original, Warren y Marshall afirmaron que muchas de las úlceras estomacales y gastritis se encontraban causadas por la colonización del estómago por esta bacteria y no por estrés o condimentos irritantes en los alimentos como se sostenía hasta entonces (2).

3. Origen del nombre

En 1983 Warren y Marshall comunican sus observaciones con tinciones de plata de biopsias y cultivos de estas bacterias para las que proponen el nombre de *Campylobacter pilorico* (CLO). En 1985, Marshall se infecta personalmente con el microorganismo que denomina *Campylobacter pilorico*, desarrollando un cuadro de gastritis. A partir de esta fecha, son numerosas las publicaciones que aparecen en las que se comunican la presencia del *Campylobacter pilorico* en las muestras de biopsias gástricas. En 1989, los estudios de secuenciación del ARN ribosómico pusieron de manifiesto que el *Helicobacter pylori* que hoy día se reconoce como la especie de mayor interés en las gastropatías, era distinto del género *Campylobacter* (2).

4. Implicación en patogénesis

La comunidad médica fue muy reticente en reconocer el hecho de que esta bacteria fuese la causante tanto de úlceras estomacales como de gastritis, ya que creía que las bacterias no podían sobrevivir por mucho tiempo en el medio ácido del estómago. Se empezó a cambiar de idea con base en estudios posteriores que reafirmaron esta idea, incluyendo uno, en el que Marshall bebió un cultivo de *Helicobacter pylori*, desarrollando una gastritis y recobrando la bacteria de su propio revestimiento estomacal; con esto, satisfizo tres de los cuatro postulados de Koch (3).

Marshall y Warren descubrieron que los antibióticos eran efectivos para el tratamiento de la gastritis al mismo tiempo que los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (National Institutes of Health) reportaron en 1994 que las úlceras gástricas

más comunes son las causadas por *Helicobacter pylori*. Estos investigadores, recomendaron el uso de antibióticos, siendo incluidos en el régimen de tratamiento. En 2005, Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus trabajos acerca de esta bacteria (3).

Antes de comprobarse la implicación de *H. pylori* en enfermedades estomacales, las úlceras estomacales eran tratadas con medicamentos que neutralizaban la acidez lo que provocaba que muchas veces estas reaparecieran después de tomar el tratamiento. El tratamiento tradicional de la gastritis eran las sales de bismuto (subcitrato de bismuto coloidal o subsalicilato de bismuto) que a menudo era efectivo, pero su efectividad disminuía con un uso prolongado, además se desconoce el mecanismo de acción de este fármaco y aún no está claro, como antibiótico. Actualmente, muchas úlceras son tratadas de forma efectiva utilizando antibióticos contra *H. pylori* (3).

Mientras *H. pylori* sigue siendo la bacteria conocida más importante que habita en el estómago humano, algunas especies más del género *Helicobacter* han sido ahora identificadas en otros mamíferos y en algunas aves y se ha comprobado que algunas de estas pueden infectar a humanos. Existen especies de *Helicobacter* que son capaces de infectar el hígado de ciertos mamíferos y de causar por tanto diversas enfermedades hepáticas (4).

C. Características generales

H. pylori es una bacteria Gram negativo de forma espiral, que mide alrededor de 2.5 a 3.5 micrómetros de largo y de 0.5 a 1.0 micrómetros de diámetro, con cuatro a seis flagelos polares en un extremo, los que le proporcionan mayor movilidad en un medio viscoso. Es una bacteria microaerófila, es decir que requiere Oxígeno pero a más bajas concentraciones de las encontradas en la atmósfera, usa Hidrógeno y metanogénesis como fuente de energía. Es oxidasa y catalasa positiva (5).

Con su flagelo y su forma espiral, la bacteria "taladra" literalmente la capa mucosa del estómago y después puede quedarse suspendida en la mucosa gástrica o adherirse a

células epiteliales. *H. pylori* produce adhesinas, las cuales se unen a lípidos y carbohidratos asociados a la membrana citoplásmica del epitelio gástrico. (5).

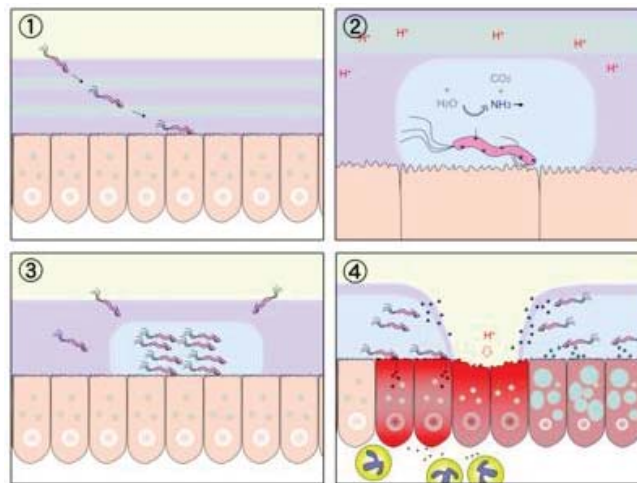
D. Patogénesis

Los mecanismos de patogénesis de *Helicobacter* incluyen:

- *H. pylori* penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la capa mucosa epitelial gástrica.
- Produce amoníaco a partir de la urea para neutralizar el ácido gástrico.
- Migración de *H. pylori* al foco de infección y su proliferación.
- Se desarrolla la ulceración gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte de las células mucoepiteliales del estómago causando la patogénesis (6).

(Figura 1)

Figura 1. Mecanismo de patogénesis de *Helicobacter pylori*



Fuente: Pueyo A.M. *et al.* Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*.
Rev. Anales. 2003, vol. 21, no. 2, pp. 39-56.

E. Epidemiología

Desde su descubrimiento, *H. pylori* ha sido objeto de varios estudios, los cuales han demostrado que es una de bacteria de distribución mundial (6).

La infección está asociada a diversos factores, pero se ha observado un alto número de infectados en países en vías de desarrollo y bajo estrato socioeconómico, en donde las condiciones de higiene no son adecuadas (6).

Los primeros trabajos que aparecen relacionados con la presencia de bacterias espirales en estómagos humanos datan ya de hace más de un siglo, sin embargo hasta inicios de los ochentas que se llevó a la aparición de conceptos etiopatogénicos y por consiguiente terapéuticos, específicamente de procesos gastroduodenales (6,7). (Tabla 1)

Tabla 1. Avance de la enfermedad

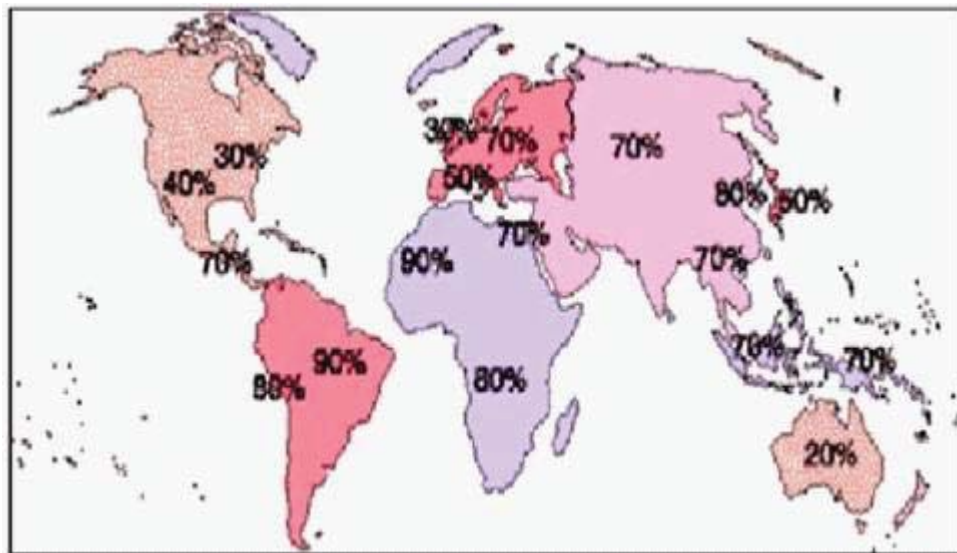
Progreso de la infección	
Semanas a meses	Gastritis crónica superficial.
Años a décadas	Úlcera péptica, enfermedades linfoproliferativas, gastritis crónica atrófica, adenocarcinoma gástrico, gastritis crónica superficial.

Fuente: Pueyo A.M. *et al.* Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Anales. 2003, vol. 21, no. 2, pp. 39-56.

1. Aspectos epidemiológicos básicos

Existen reportes que a partir de la década de 1990 la infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial. En publicaciones de casos relacionados en pacientes con gastroscopía las cifras de prevalencia han sido sobreestimadas, existiendo diferencia significativa en la prevalencia de la bacteria cuando su desarrollo es regional. En general, el número de personas infectadas es superior en países en desarrollo, comparándose con la prevalencia en los países desarrollados. En los Estados Unidos y Australia, por ejemplo, la tasa de infección oscila entre 19 y 57%, mientras que en otros países como China, Tailandia y la India la prevalencia puede llegar al 90% (8-9). (Figura 2).

Figura 2. Distribución mundial de *Helicobacter pylori*



Fuente. **Hoda M. Malaty* and Olof Nyrená€** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Department of Medicine at Baylor College of Medicine, Houston, TX; USA; Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden 2002.

2. Factores de riesgo

El riesgo de adquirir el microorganismo debido al estrato socioeconómico, e ingresos familiares ha sido demostrado en diversos estudios. Es considerado uno de los principales factores de riesgo ya que influyen las deficiencias higiénico-sanitaria y bajo nivel educacional de ahí que la infección, sea mucho más frecuente en países en vías de desarrollo. Investigaciones recientes han mostrado una diferencia muy marcada, reportándose cifras de 34% de prevalencia de la infección en países desarrollados como España comparado con un 84% reportado en la provincia de Carballo, en Guadalajara (México) utilizando la misma metodología en ambos países, como se observa en la Gráfica 1, así mismo se determinó que 98% de las viviendas presentaban alguna deficiencia sanitaria. De estos factores todos tienen como denominador común el bajo nivel económico (9,11).

Gráfica 1:
Relación entre cifras de infectados en países desarrollados y países en vía de desarrollo.



Fuente: Gisbert JP. Epidemiología de *Helicobacter Pylori*. Revista Panamericana de Salud Pública. Rev. Vol. 3 Feb. 2003

Estas diferencias, parecen deberse fundamentalmente, en el estrato socioeconómico, baja escolaridad, condiciones de hacinamiento y escasa accesibilidad a servicios básicos lo que conlleva a la presencia de la infección, en la mayoría de los niños en vías de desarrollo, en contraste con países avanzados donde la prevalencia en las primeras décadas de vida es baja. En países no desarrollados, la infección se presenta en la mayoría de los casos en niños menores a un año en comparación con niños menores o iguales a 7 años de edad en países desarrollados.

Aunque en estudios realizados a finales del siglo XIX se observó un ascenso en el número de casos de la úlcera péptica en Europa, al relacionarla con el ascenso de la infección por *Helicobacter pylori* el cual tuvo lugar durante la primera infancia como fenómeno generacional. El descenso del número de úlcera péptica durante las últimas décadas del siglo XX se encuentra relacionado con una marcada disminución en los porcentajes de infección por *Helicobacter pylori* en el mundo occidental (10).

El estado nutricional se relaciona con una alta prevalencia, ya que 83% de los pacientes con úlcera péptica presentan bajo peso, sobrepeso o riesgo de bajo y/o sobrepeso para la edad, relacionado con su crecimiento y desarrollo, hábitos alimenticios y condición socio-económica, 40% de los pacientes infectados muestran al mismo tiempo problemas

asociados con la piel como dermatitis, acné, lesiones abrasivas y dermatofitos, entre otros (10).

El género no parece ser una variable esencial de riesgo, ya que aunque hay trabajos que reportan una mayor prevalencia en hombres, la mayoría no encuentran diferencia significativa entre ambos géneros (10).

Algunos autores consideran posibles factores predisponentes a la adquisición de la infección a los raciales o genéticos. En determinados países, la tasa de infección por cepas citotóxicas es similar entre pacientes con gastritis crónica y los que han desarrollado una úlcera péptica. En algunos países como México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo (11).

A pesar de resultados recientes relacionados a factores genéticos, la contundencia de los datos epidemiológicos básicos parece indicar una mayor importancia de los factores medio-ambientales en la adquisición de la infección (11).

En relación a la vivienda, en un estudio realizado en Venezuela se determinó que alrededor de 98.1% de familias infectadas se encontraban en situación de pobreza, el 71.25 % de estas familias en pobreza relativa y 28.75 % en pobreza crítica (11).

Un factor estudiado, ha sido la posible relación entre los síntomas y/o alteraciones como dispepsia, dolor epigástrico, náuseas/vómitos, síntomas de reflujo gastro-esofágico; y la posible infección por *H. pylori* mediante la determinación de anticuerpos, lo que conlleva a la realización de la endoscopia. De ellos, tan sólo el dolor epigástrico mostró diferencias estadísticamente significativas: el 80% de los pacientes que referían este síntoma estaban infectados (<0,01). De las demás variables ninguna llegó a alcanzar diferencias significativas (12). (Tabla 2)

Tabla 2. Relación entre síntomas e infección por *Helicobacter pylori* en el diagnóstico por gastroscopía

Síntomas/Signos	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)
Dispepsia	192	59
Dolor epigástrico	276	69
Náuseas/vómitos	55	21
Reflujo	131	48
Anemia	36	23
Síntomas generales	38	12

Fuente: Taylor DE, Bkaser MJ. La epidemiología de la infección con *Helicobacter pylori*. Revista epidemiológica Americana 2003; 13; 42-59

3. Epidemiología en Guatemala

Un estudio en niños de 6 a 36 meses de edad realizado en el departamento de San Juan Sacatepéquez y publicado en agosto del 2003, reportó la prevalencia de infección causada por patógenos transmitidos por el agua. El estudio buscaba encontrar la viabilidad de utilizar anticuerpos en niños mediante el estudio serológico como indicadores de la infección de patógenos transmitidos en el agua con el fin de caracterizar la epidemiología de estas infecciones diarreicas en las zonas rurales de Guatemala y medir así la frecuencia de anticuerpos en base a la edad. El resultado de la prevalencia de anticuerpos para *H. pylori* fue relativamente constante (19% - 25%) en niños de 6 a 36 meses de edad. Concluyendo que la serología parece ser un enfoque viable y eficaz para determinar la prevalencia de la infección por determinados agentes patógenos en el agua en niños muy pequeños (13).

Un estudio realizado en el 2000 analizó la secuencia de ADN del extremo terminal de la cadena de patogenicidad (una región altamente polimórfica) de más de 500 cepas de *H. pylori* de los 5 continentes. De estos se han encontrado 3 genotipos de cepas de acuerdo con la presencia de selecciones, inserciones y sustituciones, siendo la más frecuente la de tipo 1 que ha sido encontrado en cepas obtenidas de pacientes españoles y ladinos de Guatemala (debido a la mezcla de amerindios y europeos ancestrales) (13).

Recientemente se asoció la presencia de *H. pylori* con la patología gástrica por endoscopías, utilizando datos de 1468 pacientes que se sometieron a este procedimiento en busca de la bacteria, encontrándose que el 53% (778) de los pacientes en el estudio obtuvieron un resultado positivo para la presencia de la bacteria y su colonización en el tracto gastrointestinal (14).

F. Patogenia y patología

H. pylori es un microorganismo altamente adaptado al ambiente gástrico, de tal forma que los primates son la única especie que adquiere la infección de forma natural. Sin embargo, siempre produce inflamación de la mucosa gástrica, aunque habitualmente es de grado leve o moderado. No obstante, un alto porcentaje de las personas infectadas se encuentran asintomáticas y el número de individuos infectados que desarrollan síntomas es sólo del 10%. *H. pylori* podría ser considerado como el primero de un nuevo tipo de patógenos que se han denominado "patógenos lentos", con las siguientes características: produce una infección que, en ausencia de tratamiento, se prolonga por décadas en la mayoría de las personas colonizadas; existe invariablemente una infección activa constante y se encuentra completamente adaptado al ser humano. *H. pylori* origina una infección local que no tiene extensión en el ámbito sistémico, lo que sugiere que si bien los mecanismos generales de defensa resultan protectores, los mecanismos locales no son eficaces (15).

La mucosa gástrica con infección crónica por *H. pylori* se caracteriza desde el punto de vista histológico, por daño tisular y por un incremento en el número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos. Durante la infección por *H. pylori* se produce una acumulación de fagocitos en la mucosa gástrica por dos mecanismos: el reclutamiento de neutrófilos por la producción de interleucina 8(IL-8) por parte de las células epiteliales gástricas y la liberación por parte de *H. pylori* de sustancias con actividad quimiotáctica, capaces de atraer fagocitos. Estas células ingieren al microorganismo y al igual que con otros patógenos, lo destruyen mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. La liberación de radicales libres por los neutrófilos puede desempeñar un papel en la génesis de la inflamación crónica y en la aparición de la úlcera péptica (16-18).

El amonio producido por dicho microorganismo puede incrementar la destrucción celular asociada con la liberación de radicales libres. *H. pylori* produce una vigorosa respuesta de anticuerpos, tanto en el suero como en el jugo gástrico. También se ha detectado proliferación de células T tanto en el ámbito local como en el sistémico en respuesta a antígenos de *H. pylori*. En las gastritis inducidas por esta bacteria se ha observado un incremento de las células CD4⁺, que en su mayor parte son Th1. En experimentos realizados en ratones sólo se ha conseguido inducir una débil respuesta Th2 tras la inmunización frente a *H. pylori* y el tratamiento con anticuerpos anti-interferón (19).

Existe, por otro lado, una creciente acumulación de evidencias que apoyan que la respuesta Th1 se relaciona con el desarrollo de la enfermedad por *H. pylori*. La concentración de IL-12 se correlaciona positivamente con el número de células mononucleares infiltrantes en las biopsias de pacientes con gastritis crónica y el tratamiento con IL-12 incrementa la gravedad de la gastritis asociada con *H. pylori*. No se conoce bien el balance de células Th1 y Th2 en la infección por este microorganismo (19).

La mayoría de los pacientes con colonización gástrica de *H. pylori* nunca desarrollan ulceración y permanecen asintomáticos, a pesar de que histológicamente, se observan alteraciones inflamatorias. La infección por *H. pylori* es una de las principales causas de gastritis crónica activa, dándose una asociación en casi el 100% de los pacientes. También ha sido demostrada su asociación en pacientes con úlcera péptica, siendo aun controvertida su posible implicación en la dispepsia no ulcerosa (20).

Existen diversos estudios que sugieren una relación entre este microorganismo y el desarrollo de neoplasia gástrica como determinados tipos de adenocarcinoma gástrico y del linfoma MALT, linfoma T asociado a mucosas, dispepsia no ulcerosa, enfermedad por reflujo gastro-esofágico, lo que podría tener un impacto importante, teniendo en cuenta que el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte en el mundo (25).

Recientemente, se ha sugerido su posible relación con enfermedades no gastrointestinales, en especial la cardiopatía isquémica, aunque este aspecto es todavía

motivo de discusión. También se ha asociado a enfermedades dermatológicas como rosácea y urticaria crónica (Tabla 3) (21).

Tabla 3. Enfermedades extraintestinales asociadas con infección por *Helicobacter pylori*

• Enfermedades cardiovasculares	• Enfermedades cutáneas
• Arteriosclerosis, isquemia miocárdica	• Urticaria idiopática crónica
• Fenómeno de Raynaud primario	• Alopecia areata
• Cefalea vascular	• Otras enfermedades
• Enfermedades autoinmunes	• Anemia ferropénica
• Síndrome de Sjögren	• Retraso del crecimiento
• Púrpura de Ashönlein-Henoch	• Retraso de la menarquia
• Tiroiditis autoinmune	• Linfoma MALT extragástrico
• Arritmias idiopáticas	• Diabetes mellitus
• Enfermedad de de Parkinson	• Encefalopatía hepática
• Rosácea	• Neuropatía óptica anterior isquémica no arterial

Fuente: Gonzáles D. Urticaria crónica y *Helicobacter pylori*. Rev. Española de Alergología e Inmunología Clínica, 2003, Vol. 15, pp. 366-373.

1. *Helicobacter pylori* y cardiopatía isquémica

H. pylori se ha relacionado con un aumento del riesgo de enfermedad coronaria en el adulto. Aunque son muchos los estudios realizados, sobre todo los que analizan la relación sero-epidemiológica entre la infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad coronaria. Fueron Mendall y Patel quienes en el año 1994 demostraron que los niveles plasmáticos muestran un incremento de fibrinógeno, proteína C reactiva, ácido siálico y otras proteínas de fase aguda. En 1996 Mendall y col, demuestran un incremento en los niveles de proteína C reactiva en los infectados por *Helicobacter pylori*, así como en sujetos que presentaban factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, lo cual sugiere una fuerte asociación entre la concentración de proteína C reactiva y enfermedad coronaria. En 1996 Niemela, correlacionan los niveles séricos de lípidos al presentar infección por *Helicobacter pylori* y padecer una enfermedad coronaria, encontrando que los pacientes tenían niveles séricos de

triglicéridos más altos que los pacientes no infectados y que podía ser esta la vía por la que esta bacteria incrementa el riesgo de cardiopatía isquémica (22-23).

a. Mecanismos

En cuanto a los posibles mecanismos implicados en la relación entre infección por *H. pylori* y cardiopatía isquémica, se han realizado diversas especulaciones. Una posible explicación podría ser que la estimulación inmunológica derivada de una infección crónica podría causar, a través de la liberación de mediadores, un incremento inespecífico de la sensibilidad de los vasos cutáneos a agentes que incrementan en la permeabilidad vascular. Sobre esta base podrían actuar determinados agentes. De hecho, se ha observado un incremento de la producción de interleucina IL-8, factor de activación plaquetaria (PAF) y leucotrienos B4 y C4 en la mucosa gástrica de los pacientes infectados por *H. pylori* (24-25).

Otra posibilidad sería que los pacientes con urticaria desarrollasen IgE específica frente a *H. pylori*, lo que supondría una atractiva explicación patogénica que requiere confirmación. En este sentido, Liutu y colaboradores encuentran un mayor porcentaje de elevación de la IgE total en los pacientes con urticaria crónica e infección por *H. pylori* que en los pacientes con urticaria crónica sin infección por *H. pylori*. También se ha observado IgE sérica frente a *H. pylori* e IgE unida a basófilos incrementada en las personas con infección. Se ha comunicado también un incremento en el recuento de basófilos en sangre en los sujetos con dispepsia y positividad para *H. pylori* (24).

Por su parte, Queiroz y colaboradores encuentran que los pacientes con infección por *H. pylori* presentan concentraciones menores de histamina en la mucosa gástrica que los sujetos sin infección, lo que podría indicar una liberación de histamina incrementada. Sin embargo, otros autores no sólo no observan un incremento de la liberación de histamina de los basófilos incubados por *H. pylori*, sino que encuentran que las preparaciones de la bacteria ejercen un efecto inhibitor sobre los mastocitos de rata y los basófilos humanos. El efecto de los eosinófilos en la infección por *H. pylori* no ha sido bien estudiado. Se sabe que la infiltración y la degranulación de eosinófilos se relacionan con la gastritis

producida por esta bacteria; lo que sugiere la liberación de proteínas tóxicas por los eosinófilos (26-27).

2. *Helicobacter pylori* y rosácea

La rosácea es una dermatitis crónica y progresiva de la región facial, caracterizada por episodios repetidos de disnea, telangiectasias y eritema persistente, con fase de inflamación en la que aparecen pápulas y pústulas. Es más frecuente en hombres que en mujeres y la edad de comienzo suele ser en la tercera década de la vida. La etiología y patogenia no son conocidas en su totalidad, pero existen una serie de factores relacionados con la enfermedad. Entre ellos, mediadores farmacológicos, factores psicológicos, alteraciones digestivas, factores ambientales, alteraciones de tipo inmunológico e infecciones parasitarias. Factores genéticos: factores vasculares, migraña, dermatitis seborreica, alcoholismo, tabaquismo, tratamiento con esteroides (25).

Considerando la diferente valoración de los posibles factores etiológicos conocidos, es evidente que no existe acuerdo a la hora de proponer una interpretación de los mecanismos patogénicos implicados en la rosácea. Evidentemente no se conoce tampoco el posible papel etiopatogénico que puede representar la infección por *H. pylori* (27).

3. *Helicobacter pylori* y urticaria crónica

La urticaria es una afección cutánea o cutáneo-mucosa de etiología desconocida y de larga evolución. Se caracteriza por lesiones pruriginosas, edematosas y eritemato-papulosas, que desaparece sin dejar rastro. Se trata de una entidad tremendamente heterogénea y que se ha relacionado con una gran cantidad de posibles factores etiológicos. Se han publicado algunos trabajos que relacionan la infección por *H. pylori*, como posible factor etiopatogénico de la urticaria crónica (27).

Resultados publicados por Hergueta y colaboradores, reportan mediante estudios de seguimiento que los pacientes con rosácea y urticaria crónica presentan la infección por *H. pylori* y por lo tanto esta puede jugar algún papel en estas patologías (27).

4. *Helicobacter pylori* y alergia alimentaria

La alergia alimentaria es un factor recientemente explorado. Una publicación comparó 38 pacientes con IgE específica a alimentos con 53 controles sin alergia alimentaria. A todos ellos les detectó anticuerpos frente a *H. pylori* y al antígeno CagA, no encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de pacientes con alergia alimentaria y serología positiva frente a *H. pylori* (42,1%) con los controles y con serología positiva frente a *H. pylori* (47,1%). Sin embargo, detectaron un porcentaje mayor estadísticamente significativo de seropositividad frente al antígeno CagA en los sujetos con hipersensibilidad alimentaria (62,5%) que en los controles (28%). También se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los valores de IgE específica frente a los alimentos más comunes (tomate, leche, cacahuete y huevo) en los pacientes con serología positiva frente a CagA que en los pacientes negativos para este antígeno (3,28 kU/L frente a 1,99 kU/L). Por su parte, CagA es un marcador de patogenicidad; los sujetos infectados por cepas CagA+ presentan unos recuentos de basófilos en sangre periférica superiores a los de los individuos infectados por organismos CagA (-) (28).

Varios mecanismos posibles podrían estar implicados en la relación entre *H. pylori* y alergia alimentaria. Sustancias derivadas de *H. pylori*, como la toxina vacuolizante, o de las células inflamatorias que infiltran la mucosa gástrica podrían incrementar el paso de macromoléculas a través del daño que pueden inducir en las células epiteliales de la mucosa gástrica. Este daño resulta más intenso en las cepas CagA+. El paso de macromoléculas podría también ocurrir a través de las uniones de las células mucosas que, en el caso de las cepas más virulentas de *H. pylori*, se encuentran más lesionadas y tienen una mayor infiltración bacteriana. Además se ha demostrado que *H. pylori* produce una ruptura en la barrera epitelial causando pérdida de la función. Por último, las macromoléculas podrían atravesar la barrera gástrica mediante una vía intracelular, las cepas CagA (+) de *H. pylori* son capaces de incrementar la permeabilidad de las células epiteliales colonizadas en cultivo con el consiguiente paso de macromoléculas intactas a través de una monocapa celular (28).

5. Infección por *Helicobacter pylori* y angioedema

Se ha descrito también angioedema relacionado con la infección por *H. pylori*, aunque se trata de casos aislados. Farkas y col describen el caso de una paciente con un déficit adquirido del inhibidor de C₁ (C₁INH) e infección por *H. pylori*. Aunque aún no es muy claro, los autores sugieren una activación excesiva del complemento por un factor no identificado que podría contribuir a un déficit de C₁INH por consumo del mismo. Por su parte, Rais *et al* describen el caso de un varón diagnosticado de déficit hereditario de C₁INH, quien presentó múltiples episodios de angioedema que no se controlaron a pesar de un tratamiento con dosis máximas de danazol. Este paciente presentó una gastritis crónica activa por *H. pylori*. Tras el tratamiento de erradicación del microorganismo se consiguió el control de la enfermedad y la normalización de las concentraciones de C₄. Sin embargo se sospecha que lo más probable fuera una activación de la vía clásica del complemento por inmunocomplejos antígeno-anticuerpo (28).

G. Inmunología

1. Consideraciones generales

En fechas recientes se ha vuelto aparente que la mayoría de los individuos tienen infección de la mucosa gástrica por *H. pylori*. Aunque tales infecciones, que con frecuencia causan gastritis crónica, no tienen consecuencias patológicas, son un factor de riesgo importante para la aparición de úlceras gástricas y duodenales así como para el desarrollo de tumores gastrointestinales, incluyendo adenocarcinomas y linfomas del tejido linfoide relacionado con la mucosa (TLRM) (29).

La infección por *H. pylori* se inicia por la adhesión del microorganismo a las células del epitelio gástrico, seguida por el inicio de una respuesta inmunitaria compleja. Esta respuesta incluye componentes de células B, lo que ocasiona la producción de anticuerpos, los cuales pueden controlar la infección o causar inflamación a través de reactividad cruzada con los antígenos de la mucosa endógena. Además, incluye a componentes de las células T, que causan producción de citocinas proinflamatorias como IFN γ y TNF α . Esta respuesta inmunitaria conduce a una respuesta inflamatoria que finalmente genera gastritis crónica. Por último, la lesión tisular causada por la respuesta

inmunitaria contra la bacteria puede incrementarse por el microorganismo mismo a través de la producción de una citosina (proteína AcG A) la cual participa en la formación de úlceras. El diagnóstico de infección por *H. pylori* se establece por examen histopatológico de la mucosa gástrica, presencia de antígenos de *H. pylori*, presencia de anticuerpos contra *H. pylori* y prueba del aliento para detectar la presencia de varias enzimas sintetizadas por el microorganismo. El tratamiento consiste en antibioticoterapia junto con tratamiento antisecretor para reducir la secreción de ácido (29).

Una complicación importante de la infección por *H. pylori* es la aparición de linfomas de TLRM por transformación neoplásica de las células B que se estimulan en respuesta a la infección. Una vez que ocurre esto, tales células se inducen aun mas por antígenos específicos contra *H. pylori*. Por consiguiente, la situación que surge es similar a la de la inducción no específica del linfoma en la enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado. Los linfomas de TLRM en etapas tempranas responden a la erradicación de la infección por *H. pylori*, pero la mayor parte de los casos requiere quimioterapia (28,29).

H. Fisiopatología

Cuando la bacteria coloniza la mucosa gástrica altera notablemente el moco gástrico, se disminuyen las microvellosidades quebrantándose el medio de sostén e induciendo una proteólisis. Estos cambios hacen que la mucosa quede sin mayor protección a merced de los cambios corrosivos producidos por el ácido clorhídrico, los ácidos biliares y la pepsina, originándose cambios ulcerosos, de inflamación y erosión (29). Estas alteraciones también se pueden producir en el duodeno encontrándose la bacteria en la mucosa gástrica de los pacientes que sufren esta afección, considerándola algunos como factor etiológico importante en la ulcera duodenal. La bacteria tiene la propiedad de desdoblar la urea, factor que es utilizable como medio de diagnóstico en biopsias de mucosa gástrica (29).

Entre los factores de virulencia del *H. pylori* se cuentan las proteínas superficiales, algunas de las cuales están implicadas en los fenómenos de adhesión, y en la alteración de la arquitectura del epitelio mucoso gastroduodenal, relacionándose con la actividad

endotóxica del germen. Se ha sugerido que dicha toxicidad estaría ligada a un lipopolisacárido (LPS) de la superficie del *H. pylori*. La caracterización de las proteínas del *H. pylori* ha permitido detectar el carácter antigénico de los LPS del core y de las cadenas laterales de las proteínas del germen. En lesiones digestivas mediadas por LPS bacterianos, han sido implicados fosfolípidos de bajo peso molecular, como el factor activador plaquetario (PAF), cuya actividad se ha detectado en cultivos de *H. pylori*, con las mismas propiedades biológicas y fisicoquímicas que el PAF liberado por diversas células eucariotas (30).

1. Niveles séricos de gastrina e infección por *H. pylori*

Numerosas observaciones confirman que existe una hipergastrinemia inapropiada en pacientes *H. pylori* positivos, especialmente significativa ante un estímulo alimentario. La gastrinemia basal aumenta, aproximadamente, en un 50 % y la postprandial en un 100 %. Además, se ha demostrado la reducción de los niveles de gastrina tras los tratamientos de erradicación. La hipergastrinemia, asociada a la infección por *H. pylori* en úlcera duodenal, representa una situación paradójica desde el punto de vista fisiopatológico, ya que 2/3 de los ulcerosos duodenales tienen niveles de secreción por encima de la media. De algún modo, el *H. pylori* altera los mecanismos reguladores antrales, propiciando la producción inapropiada de gastrina. Se han sugerido diversas hipótesis, para explicar este efecto. Una de ellas supone que la hipergastrinemia es el resultado de la actividad ureasa de la bacteria que llevaría al aumento de la concentración de iones amonio y, como consecuencia, del pH produciendo una señal continua sobre los sensores de pH. Sin embargo la añadir urea al medio gástrico produce un aumento de la concentración de iones amonio, pero no un aumento paralelo de la gastrinemia. Además, añadir ácido acetohidroxámico, inhibidor de la ureasa, no provoca disminución de la gastrinemia. Otra hipótesis sugiere que la hipergastrinemia observada en pacientes con infección antral por *H. pylori* obedecería a una alteración de la liberación de gastrina, inducida por los mecanismos lesionales de la gastritis antral. La alteración estructural, que el *H. pylori* provoca en la mucosa gástrica, puede potenciar los mecanismos ulcerogénicos, como la inhibición de la somatostatina. Una disminución de células D, asociada a la infección por *H. pylori*, sería causa de disregulación en la producción de gastrina observada en la enfermedad ulcerosa

péptica (EUP). Estudios recientes, que investigan el número de células D y G, así como la producción de RNAm de somatostatina, en la úlcera duodenal asociada a infección por *H. pylori*, han obtenido resultados contradictorios. Por ello se ha sugerido una tercera hipótesis, según la cual, la hipergastrinemia asociada a la infección por *H. pylori* se relacionaría con alteración de los mecanismos locales que regulan las células neuroendocrinas G y D. El rápido descenso de los niveles de gastrina, como respuesta al tratamiento de erradicación, concuerda mejor con una disregulación entre células D y G, que con una alteración en el número de estos elementos (31).

2. Infección crónica por *H. pylori* y secreción ácida

Aunque la hipergastrinemia de los pacientes con enfermedad ulcerosa péptica (EUP) disminuye de forma rápida cuando se erradica el *H. pylori*, no ocurre lo propio con la secreción de ácido, aunque se supone que tendría lugar un retorno gradual a niveles secretorios normales (32).

Recientemente, utilizando como estímulo factor liberador de gastrina (GRF), en lugar de pentagastrina o G17 se ha observado una reducción de hasta el 66 % de la secreción ácida, en pacientes con úlcera duodenal, como resultado de los tratamientos de erradicación y en respuesta a un descenso concomitante de los niveles séricos de gastrina (32).

3. Secreción de pepsina e infección por *H. pylori*

Se ha demostrado que la concentración de PG I es significativamente más elevada en presencia de *H. pylori*, que en pacientes *H. pylori* negativos. Los niveles de PG I se consideran un buen marcador de la gastritis, que puede ser utilizado como un índice de la severidad de la misma en pacientes *H. pylori* positivos. Además, la erradicación mediante el tratamiento, de la infección por *H. pylori*, origina una disminución marcada de los niveles séricos de PG I. La estimulación de la secreción de PG por las glándulas gástricas, en el curso de la gastritis crónica, estaría mediada por un péptido producido por *H. pylori* (33).

4. Contenido en histamina y *H. pylori* en la EUP

En la EUP se ha observado una disminución del contenido de histamina en los reservorios mucosos de los pacientes comparados con sujetos sin infección por *H. pylori*. Además, los tratamientos de erradicación repusieron a sus niveles normales el contenido de dichos reservorios. El porcentaje de incremento de la infección por la bacteria se correlacionó con el porcentaje de disminución de los niveles séricos de gastrina (34).

Es importante mencionar que *H. pylori* cuenta con genes como *cagA* el cual codifica la proteína inmunodominante CagA, los pacientes infectados con cepas Cag A tienen mayor inflamación del estómago debido a la mayor producción de interleucina 8 en la mucosa y por ello mayor posibilidad de ulceración gastroduodenal, otro factor de virulencia es el gen *VacA*, el cual codifica la citotóxina vacuolizante responsables de diferentes variaciones de inflamación y ulceración duodenal, un tercer factor de virulencia para tener en cuenta es el BabA (blood group antigen- binding adhesin), el cual media la adhesión de la bacteria a la célula epitelial gástrica en los epítomos de superficie Lewis, ya que las personas con tipo de sangre O expresan en su superficie receptores para estos antígenos, lo que hace que estos pacientes tengan una mayor predilección a formar una úlcera que las personas de tipo de sangre A o B. Las cepas bacterianas que tienen el gen *cagA*, están asociadas con la habilidad de causar úlceras severas. La proteína CagA ingresa a las células humanas, donde interrumpe el normal funcionamiento del citoesqueleto (35)

Después de fijarse a las células epiteliales del estómago, la proteína CagA se inyecta dentro de la célula a través de este sistema de secreción. Se ha visto que cepas patogénicas de *H. pylori* activan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, en inglés), una proteína de membrana con tirosina quinasa. La activación del EGFR por *H. pylori* está asociada con alteraciones en las señales de transducción y de expresión génica en las células huéspedes, y este hecho puede contribuir a su patogenicidad. También se ha sugerido que la región C-terminal de la proteína CagA (aminoácidos 873-1002) podría regular la transcripción genética de la célula huésped, independientemente de la fosforilación. La citotoxina del *VacA* se cree que codifica una citotoxina que tiene la capacidad de formar vacuolas en las células epiteliales, *vacA* varía en dos regiones; la

región S (la secuencia de la señal) que existe como los tipos alélicos S1 o S2 y la región M (región media) presente como los tipos alélicos M1 o M2. (36-39)

I. Diagnóstico

Tradicionalmente los métodos utilizados para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se han dividido en invasivos y no invasivos en función de que precisen o no de la realización de una endoscopia para la toma de biopsias de la mucosa gástrica (40).

Aunque cuando se realice una endoscopia, la prueba de referencia es el examen histológico considerado como el estándar de oro con una sensibilidad y especificidad comprendida de 95-100%, el diagnóstico suele realizarse mediante la prueba rápida de la ureasa dado su menor costo, junto a su buena sensibilidad y especificidad (90-95 %). El cultivo no suele emplearse de modo rutinario, restringiéndose su uso para la determinación de las resistencias antibióticas en los pacientes que persiste la infección tras sucesivos tratamientos y en investigación clínica (40) (Tabla 4).

Tabla 4. Métodos utilizados en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*

Métodos directos o invasivos	Métodos indirectos o no invasivos
Histología con coloración de Giemsa (Gi).	Prueba del aliento con urea marcada UBT (C-13 y C-14)
Cultivo en medios selectivos como Agar Sangre de Carnero, Agar Yema de huevo con sales de tiazolidina y Agar Chocolate todos cultivados con microaerofilia.	Serología en sangre Detección de antígeno en heces
Prueba de la ureasa rápida	
Tinción de Gram	

Fuente: De Boer WA, Tytgat GNJ. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. BMJ 2000; 320: 31-34. 24-02-08

La prueba del aliento con urea marcada con C-13 o C-14 es la técnica más empleada y fiable para el control de la erradicación y para el diagnóstico inicial de la infección de

aquellos pacientes que no precisen de la realización de una endoscopia. También en el diagnóstico inicial puede emplearse la serología en sangre mediante técnica ELISA, si bien esta técnica tiene el inconveniente de que debe validarse previamente en cada región y que no es útil para el control de la erradicación, pues se precisa un mínimo de 6 meses para que se produzca un descenso en el título de anticuerpos en sangre. En igual forma la determinación de antígeno de *H. pylori*, es útil para el diagnóstico inicial (especialmente en niños), sin embargo el costo de la prueba es más elevado por lo que suele no ser tomado en cuenta (40).

En el tercer reporte del consenso europeo (Maastricht III) refiere que en ausencia de endoscopías, los médicos de cuidados primarios deben utilizar métodos no invasivos para diagnosticar la infección por *H. pylori*. Hay evidencia inequívoca de que la prueba de la urea espirada es un test aceptable para el uso a nivel de atención primaria (41).

1. Elección de la prueba diagnóstica

En los pacientes en los que se diagnostica la presencia de una úlcera por primera vez, el diagnóstico de la posible infección por *H. pylori* deberá establecerse mediante la prueba rápida de la ureasa o la prueba del aliento con urea marcada, respectivamente. No obstante, en este último caso si no se dispone de la prueba del aliento puede establecerse el diagnóstico inicial mediante un test serológico tipo ELISA o la determinación del antígeno. Sin embargo, si el resultado de la prueba rápida de la ureasa, del estudio serológico o la determinación de antígeno fuese negativo deberá confirmarse el resultado con otra técnica diagnóstica, utilizándose el examen histológico considerado como el estándar de oro. Si el resultado de esta segunda prueba fuera positivo, deberá instaurarse un tratamiento erradicador considerando al resultado de la primera prueba diagnóstica como un falso negativo. Si por el contrario persistiera la negatividad, el paciente deberá ser tratado con anti secretores gástricos y deberán estudiarse otras posibles causas de la úlcera péptica distintas a la infección por *H. pylori* (40).

En el tercer reporte del consenso europeo (Maastricht III) recomienda que todos aquellos pacientes con una historia previa de enfermedad ulcerosa confirmada por

endoscopia o radiología la infección por *H. pylori* se confirmará mediante un método no invasivo (41).

2. Técnica para detección de antígeno de *H. pylori* en heces

Esa técnica es de las más sencillas y de las mejores debido a que se puede realizar en pacientes de cualquier edad, es directo, no invasivo y no presenta inconveniente en el momento de tomar la muestra. Además dentro de las pruebas para diagnosticar a *H. pylori*, la detección de antígenos fecales fue la primera en reportar una sensibilidad de 96.1% y especificidad de 90.6% (42-43).

Esta técnica se describió por Premier Platinum (HpSA) y se aprobó por la FDA en 1998, y consiste en la determinación de los antígenos flagelares de *H. pylori* mediante métodos inmuno-enzimáticos (sándwich) en muestras fecales. Permite determinar la presencia de infección activa por *H. pylori* por lo que se aprobó para el diagnóstico así como para seguimiento de la efectividad del tratamiento y confirmación de la erradicación del microorganismo. Para evidenciar la erradicación de *H. pylori* debe realizarse la detección del antígeno en heces después de 4 semanas de terapia efectiva, sin embargo su positividad 1 o 2 meses después de 7 días de tratamiento señala un fallo terapéutico. (42).

Esta prueba es no invasiva, ya que solo requiere materia fecal, lo que la hace particularmente ventajosa en pacientes pediátricos y en estudios epidemiológicos. Tiene menor costo que una endoscopia y sensibilidad de 96.8% y especificidad de 99.2%, (44).

En el mercado se encuentra principalmente el test de ELISA que se conoce como Premier Platinum HpSA®, que es un enzimo-inmunoensayo que utiliza anticuerpos de captura policlonales absorbidos en los micropocillos. Las ventajas de este test es que permite evaluar la efectividad del tratamiento anti-*H. pylori* nuevo o ya establecido por monitoreos durante y después de la terapia. Para comprobar que realmente esta técnica es una buena opción se requiere su comparación con otra técnica de metodología invasiva como la histológica conocida como el “Estándar de Oro”.

Esta técnica es muy interesante puesto que ha sido validada en muchos estudios donde se ha incluido más de 5000 pacientes en diferentes países del mundo, presenta una gran exactitud en todas las edades y tiene muchas ventajas con respecto a otras técnicas como la endoscopía. Ha sido recomendada por el Maastricht 2000 en el consenso de pruebas no invasivas en el diagnóstico y la terapia.

Varios son los laboratorios que han comercializado la prueba, el más reciente que también es ELISA es preparado con anticuerpos monoclonales y consiste en una técnica de enzimo-inmunoanálisis realizado con anticuerpos monoclonales anti-*H. pylori* que presenta mejores resultados con sensibilidad de 88 a 98% (44).

Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales o monoclonales mediante el método ELISA, los que pueden presentar diferencias ya que no se ha logrado encontrar los anticuerpos policlonales de una calidad constante. La técnica aporta información muy valiosa por la fácil obtención y conservación de las muestras, puede ser realizado en cualquier laboratorio de análisis clínico y no necesita la colaboración del paciente (como en el caso de la prueba del aliento) y puede utilizarse tanto para el diagnóstico de colonización por *H. pylori* como para el seguimiento después del tratamiento erradicador (44).

La obtención de la muestra se realiza de la manera habitual teniendo cuidado de no contaminarla con orina, ni agua y debe llevarse de inmediato al laboratorio, pues debe permanecer fresca, si el proceso no es inmediato se debe conservar a -20°C. Lo atractivo de esta prueba, es que no requiere instrumentación específica e incluso no requiere que el paciente acuda personalmente al laboratorio (42-43).

Con relación a las metodologías que se utilizan para esta prueba; la primera metodología comercializada fue el Premier Platinum HpSA (Meridian diagnostics)® consiste en una técnica de enzimo-inmunoanálisis preparado con anticuerpos policlonales anti-*H. pylori*, esta técnica consiste en una microplaca para la realización del ELISA de antígenos fecales en humanos, basados de anticuerpos monoclonales, lo que se necesita

para la realización de esta técnica, son tiras para microtitulación, un área oscura de incubación, un control positivo y negativo; con relación a la muestra esta se debe recoger en un frasco limpio especialmente para materia fecal, la muestra puede almacenarse de 2-3 días a 8°C, en el laboratorio. El material requerido en este tipo de prueba está compuesto por una placa de pozos cubierto con anticuerpos, un control positivo, control negativo, muestra diluida, buffer de lavado, conjugado, substrato, y solución de parada (45).

Para el diagnóstico de la persistencia de la infección por *H. pylori* posterior al tratamiento se dispone de pruebas directas o invasivas y pruebas no invasivas. En el consenso Maastricht III se sugiere la verificación de la erradicación a las cuatro semanas a través de pruebas no invasivas, a excepción de los casos en los que se indica revaloración directa por endoscopia. Para los casos de úlcera duodenal, debido a que su etiología es generalmente benigna, no es necesaria la evaluación directa (45).

El resultado positivo de esta prueba indica la presencia de *Helicobacter pylori*, pero debe tenerse en cuenta que la bacteria puede colonizar el tracto gastrointestinal en ausencia de enfermedad (portadores asintomáticos), por lo que para establecer una relación causa efecto, el paciente debe tener una sintomatología compatible con un proceso para el que se haya establecido alguna relación etiológica con esta bacteria. Un resultado negativo de esta prueba indica que no existe infección por *H. pylori* en el paciente o que la cantidad de antígeno en heces está por debajo del límite de detección de la prueba (45).

J. Tratamiento

1. Pautas de tratamiento

Aunque *H. pylori* es sensible *in vitro* a una gran variedad de fármacos-antibióticos y no antibióticos- cuando éstos han sido aplicados en la clínica, muchos de ellos no han resultado eficaces en la erradicación del microorganismo. Así, desde el descubrimiento de esta bacteria se han empleado múltiples combinaciones de uno o más fármacos con resultados muy desiguales. Sin embargo, actualmente tan sólo 3 grupos de fármacos resultan ser realmente eficaces, utilizados en combinación, frente a *H. pylori* (40). (Tabla 5)

Tabla 5. Fármacos eficaces en la erradicación de *Helicobacter pylori*

Inhibidores de la bomba de protones	Compuestos de bismuto	Antibióticos
Omeprazol		Amoxicilina
	Subsalicilato de bismuto	Macrólidos: claritromicina
Lansoprazol		Tetraciclina
	Ranitidina- citrato de bismuto	Nitroimidazoles: metronidazol y
Pantoprazol		timidazol

Fuente: Van der Hulst RWM, *et.al.* Treatment of *Helicobacter pylori* infection in humans: A review of the world literature. *Helicobacter* 1996; 1: 6-19.

Hoy día sólo se aceptan pautas que cumplan una serie de criterios:

- Que logren índices de erradicación superiores al 90%.
- Que los efectos secundarios sean inferiores al 5%.
- Que sean fáciles de cumplir por el paciente.
- Que induzcan bajas tasas de resistencia antibiótica.
- Que sean de corta duración (entre 7-10días)
- Que sean de bajo costo.

Estas condiciones sólo las cumplen en la actualidad tres tipos de combinaciones: las denominadas **pautas triples** basadas en la combinación de dos antibióticos con un compuesto de bismuto (triple «clásica») o con un inhibidor de la bomba de protones (IBP) (triple); y las **pautas cuádruples** consistentes en la asociación de un IBP con la triple clásica. Recientemente se ha introducido una variante consistente en la asociación de la ranitidina citrato de bismuto al que se asocia uno o dos antibióticos. Los factores principales que condicionan el éxito de un tratamiento erradicador son la duración del tratamiento, las resistencias antimicrobianas y el grado de cumplimiento por parte del paciente (40-42).

Con independencia de la pauta terapéutica elegida para tratar la infección, es muy importante dedicar un tiempo para instruir al paciente sobre la forma y la importancia de cumplir adecuadamente el tratamiento prescrito en cuanto a duración, dosis y

espaciamiento. Con todo ello se logra aumentar el potencial efecto terapéutico de la pauta utilizada. Un segundo factor son las resistencias primarias a los antibióticos empleados, las cuales son muy frecuentes para el métronidazol y algo menores para la claritromicina, siendo excepcionales las resistencias a la amóxicilina y a la tetraciclina. En relación a la duración del tratamiento, la mayoría de los estudios europeos concluyen que son suficientes 7 días de tratamiento; no obstante en Estados Unidos de Norte América se ha propuesto prolongar la duración hasta 10-14 días (42-45).

La triple terapia «clásica» consistente en un compuesto de bismuto, métronidazol y tetraciclina, esta última puede ser sustituida por amoxicilina, es una pauta de bajo costo y bien investigada, que sin embargo puede causar efectos secundarios. Aunque en general son poco importantes y no son responsables de una falta de seguimiento del tratamiento por parte del paciente (44).

La eficacia de erradicación obtenida con esta pauta es muy alta cuando las cepas son sensibles al métronidazol, pero cuando las cepas son resistentes, las tasas de erradicación son más bajas. Esta pauta no debe emplearse a pesar de su bajo precio en nuestro país como pauta inicial debido a la alta tasa de cepas resistentes al métronidazol; además hay que tener en cuenta sus principales inconvenientes como son el elevado número de comprimidos que el paciente debe ingerir y la duración del tratamiento que debe prolongarse a dos semanas. La tasa de erradicación de esta pauta «clásica» es muy alta, cercana al 90% (44).

La denominada pauta cuádruple combina un IBP con tetraciclina, métronidazol y un compuesto de bismuto, siendo la duración de la misma entre 7 y 14 días. Los antibióticos pueden ser sustituidos por amoxicilina y claritromicina, respectivamente, con esta pauta se logran tasas de curación muy elevadas (superiores al 90%) (40-45).

Recientemente el tercer reporte del consenso europeo (Maastricht III) formuló indicaciones sobre el manejo de la infección por *H. pylori*. En esta reunión se recomendó el empleo de la terapia de erradicación de *H. pylori* en los siguientes casos: pacientes con úlcera gástrica o duodenal, linfoma tipo MALT, gastritis atrófica, después de resección gástrica por cáncer, familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico y todos

aquellos pacientes que desearan ser tratados. Se plantea razonable investigar y tratar la infección por *H. pylori* en pacientes dispépticos cuando se muestran refractarios al tratamiento anti secretor. Teniendo en cuenta, que se trata de un tratamiento puntual de una semana de duración, la erradicación sería también una opción razonable antes de establecer un tratamiento prolongado con anti secretores, pro cinéticos o antidepresivos en los pacientes con síntomas recidivantes (42).

El tratamiento de la infección por *H. pylori* es cada vez más complicado porque existen pocos tratamientos nuevos y porque ha aumentado la resistencia a los antimicrobianos habituales. La resistencia a metronidazol y a claritromicina es frecuente actualmente en la mayoría de los países desarrollados. Por lo tanto las tasas de erradicación son más bajas, tanto en ensayos clínicos como en la práctica clínica. En un estudio multicéntrico realizado en pacientes dispépticos en Estados Unidos durante el periodo 1998-2002 encuentran una tasa de resistencia a metronidazol del 25,1%, a claritromicina de 12,9% y 0,9% a la amoxicilina (40).

2. Elección de la pauta bactericida

La elección de la pauta a emplear inicialmente viene determinada por la prevalencia local en las resistencias antimicrobianas a metronidazol y claritromicina. Estas resistencias no sólo varían entre países sino también entre distintas zonas geográficas dentro de un mismo país. La tasa de resistencia a claritromicina es inferior al 10%, mientras que la tasa de resistencia al métronidazol es muy elevada, por ello el tratamiento debe iniciarse con un IBP más amóxicilina y claritromicina durante 7 días. Si este tratamiento inicial falla debe instaurarse como tratamiento de rescate la pauta cuádruple. Si esta segunda terapia erradicadora falla, la recomendación habitual propuesta por las múltiples reuniones de consenso sobre el tema, es realizar un cultivo y antibiograma a fin de indicar un tercero e incluso un cuarto tratamiento de rescate para lograr tasas de erradicación próximas al 100%. Sin embargo, esta actitud no ha sido refrendada científicamente y en el mejor de los casos se logra erradicar un 50% de los pacientes aún no erradicados; además, la selección de los antibióticos es compleja aunque la tendencia general es evitar tratamientos que

incluyan claritromicina o metronidazol si el paciente ya ha recibido dichos fármacos (40-45).

Tabla 6. Pautas erradicadoras de la infección por *Helicobacter pylori* que han mostrado ser eficaces

Duración (Días)		Fármacos	
Terapias incluyendo claritromicina			
7-10	IBP / 12 h	Claritromicina 500 mg / 12 h	Amoxicilina 1 g / 12 h
7-10	RCB 400 mg / 12h	Claritromicina 500 mg / 12 h	Amoxicilina 1 g / 12 h
14	RCB 400 mg / 12h	Claritromicina 500 mg / 12 h	
Terapias incluyendo metronidazol (o tinidazol)			
14	Comp. De bismuto / 6 h	Metronidazol 400-500 mg / 6-8 h	Tetraciclina 500 mg/ 6 h
7-10	IBP / 12 h	Metronidazol 400-500 mg / 6-8 h	Amoxicilina 500 mg/6h
4-7	IBP / 12 h	Metronidazol 400-500 mg / 6-8 h	Amoxicilina 500 mg/6-8h
	SBC / 6 h	Tetraciclina 500 mg / 6 h	
Terapias incluyendo claritromicina más metronidazol (o tinidazol)			
7	IBP / 12 h	Claritromicina 500 mg / 12 h	Metronidazol 400-500 mg / 12h
7	RCB 400 mg / 12 h	Claritromicina 500 mg / 12 h	Metronidazol 400-500 mg / 12h

RCB= Ranitidina-Citrato de bismuto; SBC= Subcitrato de bismuto coloidal; IBP= Inhibidor de la bomba de protones.

Fuente: Laine L. *et al.* Randomized comparison of differing periods of twice-a-day triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. Rev. Aliment Pharmacol Ther. 2001, vol. 10, pp. 1029-1033.

IV. JUSTIFICACIÓN

Desde que se descubrió *Helicobacter pylori*, investigaciones efectuadas en todo el mundo han comprobado que *H. pylori* tiene una elevada prevalencia en países en vías de desarrollo. Así como se ha encontrado cifras bajas de positividad a esta bacteria en países desarrollados como lo es en Europa (50%), comparado con países de América Latina (84%) utilizando la misma metodología de análisis.

Debido a que *H. pylori* es uno de los agentes etiológicos más importantes de las enfermedades del tracto digestivo y especialmente gastritis, es necesario establecer la prevalencia de antígenos de *H. pylori* en personas que presentan síntomas de dispepsia. Este tipo de sintomatología es muy frecuente en personas con un nivel socioeconómico bajo, y mala alimentación, por lo que considerando que esta población representa un grupo mayoritario en el país, es importante que se conozca la epidemiología de la enfermedad.

Guatemala es un país en vías de desarrollo y por ende la prevalencia de infecciones por *H. pylori* se presume sea elevada, sin embargo las investigaciones realizadas con relación a esta bacteria aun son muy pocas, por lo que en la presente investigación se pretende correlacionar el hallazgo histológico con la determinación del antígeno de *H. pylori* en pacientes que acuden a una clínica privada para establecer un parámetro de prevalencia en la población.

Esta investigación se hará con pacientes que acuden a una clínica privada para realizarse una endoscopia y que acepten participar en el estudio en forma voluntaria. Se desea obtener un estimado de pruebas positivas a la detección de antígeno de *H. pylori* y su correlación con el diagnóstico histológico considerado como el estándar de oro y evaluar de esta forma la sensibilidad y especificidad en la determinación del antígeno de *H. pylori* en heces como técnica no invasiva, para ser utilizada en nuestro medio ya que la misma implica menor costo y mayor comodidad para el paciente.

V. OBJETIVOS

A. General:

Evaluar el valor diagnóstico de la técnica de detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en muestras de heces a través de su comparación con el diagnóstico histopatológico.

B. Específicos:

Establecer los valores diagnósticos, sensibilidad y especificidad de la prueba de detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces.

VI. HIPÓTESIS

La prueba no invasiva para la determinación de antígeno de *Helicobacter pylori* en heces, cuenta con una sensibilidad y especificidad similar a la metodología invasiva a través del estudio histológico considerado como el estándar de oro mediante una endoscopia.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO Y MUESTRA

1. *Universo*

Pacientes que acuden a una clínica privada para la realización de endoscopia gastroduodenal.

2. *Muestra*

Sesenta y dos pacientes seleccionados y que aceptaron participar en el estudio, para determinación de antígeno en heces de *Helicobacter pylori* y endoscopia de la clínica privada.

a. **Criterios de inclusión:**

Se incluyeron en el estudio los siguientes casos:

- Pacientes de ambos géneros mayores de edad.
- Pacientes que consulten a la clínica privada manifestando síntomas de enfermedad péptica.
- Pacientes que se les practique una endoscopia de antro para el diagnóstico de *H. pylori*.
- Que acepten participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.
- Aquellos que proporcionen la muestra de heces.

b. **Criterios de Exclusión:**

Se excluyeron del estudio los casos siguientes:

- Aquellos pacientes que refieran sintomatología de enfermedad péptica, pero que no requieran una endoscopia para el diagnóstico de *H. pylori*.
- Pacientes menores de edad.

- Pacientes que hayan ingerido medicamento contra *H. pylori* en las últimas dos semanas previas a la realización de la endoscopia.
- Pacientes que no pudieron proporcionar la muestra de heces.

B. RECURSOS

1. HUMANOS.

a. Investigadora

Br. Luzbeth Martha Patricia Valdez Casasola.

b. Asesor de Tesis

Licenciado Gerardo Leonel Arroyo Catalán.

c. Asesor Estadístico

Lic. Federico Nave Herrera.

2. INSTITUCIONALES

- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia CEDOF
- Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala
- Clínica privada de médico participante en el estudio.
- Laboratorio clínico de patología, citología y clínica PACICLI.

C. MATERIALES

1. Reactivos:

- Kit Analisa® ELISA para la detección de antígeno de *H. pilory*.

2. Equipo:

- Equipo de computación.
- Timer
- Congelador a -20°C.

- Refrigeradora
- Lector ELISA con longitud de onda de 450 nm y filtro diferencial de 630 a 700 nm.
- Pipetas automáticas de 50 μ l.

3. Material de Oficina

- Papelería
- Marcador indeleble
- Libreta de notas
- Paquetes de software para análisis de resultados.

4. Material de Laboratorio

- Contenedores plásticos con paleta incorporada para recolección de muestras fecales.
- Hielera
- Píseta
- Papel mayordomo
- Puntas de pipetas de 10 a 100 μ l
- Guantes de látex
- Papel parafilm

D. METODOLOGÍA

1. Se gestionó la autorización de la investigación con médicos gastroenterólogos que refieren pacientes para la realización de endoscopia.
2. Se obtuvo la firma del consentimiento informado para la participación del estudio en forma voluntaria por parte de los pacientes que se realizaron endoscopia (Anexo 1).
3. Se recolectaron las muestras de heces: A cada paciente que deseó participar en el estudio, se le solicitó entregar en la clínica una muestra de heces recolectada en

contenedores cerrados y dichas muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

4. Se procesaron las muestras de heces recolectadas y debidamente identificadas con el número de investigación en el laboratorio de Patología, Citología y Clínica PACICLI para la determinación de antígeno de *H. pylori* en heces mediante el uso de un kit ELISA.
5. Se preparó la solución de lavado 1:25 para su posterior uso (según lo indicado en el kit).
6. Se transfirió aproximadamente 30 mg de materia fecal sólida, o 50 μl de materia fecal líquida a los tubos para la extracción del espécimen (previamente recolectado y almacenado a -20°C) para su posterior mezclado.
7. Se preparó la placa con la cantidad respectiva de pozos a utilizar, tomando en cuenta los requeridos para el establecimiento de control positivo, control negativo y calibrador.
8. Se colocó en el primer pozo identificado como A1 el blanco, en posiciones B1 y C1 50 μl de calibrador 1, en posiciones D1 y E1 50 μl de calibrador 2, en posición F1 y G1 50 μl de calibrador 3, y en posición H1 y A2 50 μl de calibrador 4, seguido de estos se colocaran 50 μl de las muestras en el orden correspondiente.
9. Se agregaron 50 μl de conjugado a partir del pozo en posición B1, posteriormente se incuban las pruebas ELISA cubiertas con papel Parafilm, durante 60 minutos a temperatura ambiente.
10. Se lavó cinco veces los pozos con 350 μl de la solución de lavado.
11. Se agregó 50 μl de sustrato A y 50 μl de sustrato B en cada pozo.
12. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Se agregó 50 μl de la solución de parada a cada pozo a partir de la posición B1.
14. Se realizó la lectura por medio de densidad óptica de cada pozo en una longitud de onda de 450/630-700 nm.
15. Se interpretaron los resultados de la prueba de antígeno de *H. pylori*, con una densidad óptica de 450/ 630-700 nm, el valor de cut off, se calculo mediante el promedio de cuatro lecturas de controles positivos a una concentración mayor a 1.1

$\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *H. pylori* y control negativo a una concentración menor de 0.9 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno de *H. pylori*.

16. El valor del punto de corte se estableció por medio de la siguiente fórmula:

Punto de corte= FC (DO calibrador 1- DO calibrador 2) – AB.

En donde:

FC= Factor de calibración el cual es un dato teórico brindado por el fabricante.

DO Calibrador 1= Es la densidad óptica de la absorbancia promedio del calibrador 1.

DO Calibrador 2= Es la densidad óptica de la absorbancia promedio del calibrador 2.

AB= Valor de la absorbancia del blanco de muestra.

Se estableció el punto de corte sustituyendo los datos promedio de los calibradores como se muestra a continuación:

$$\text{Punto de corte} = 0.05(0.4605 + 0.0375) - 0.004 = 0.245$$

17. Se compararon los valores de densidad óptica obtenidos con el valor de cut off y si eran superiores al mismo se consideraron positivos, valores menores se consideraron negativos.

18. Se elaboró y entregó al paciente y médico tratante, el informe escrito de los resultados de la prueba de detección de antígeno de *H. pylori*.

19. Se tabularon y correlacionaron los resultados obtenidos por endoscopia y antígenos en materia fecal.

20. Se realizó el análisis estadístico de resultados.

E. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Tipo de estudio:

La presente investigación es un estudio de valoración de métodos, la cual se realizó de forma ciego. Se determinó la asociación entre los hallazgos de antígeno en heces y los resultados histopatológico diagnósticos de infección por *H. pylori*.

Número de muestra: Para la determinación de la cantidad de muestras a analizar en el estudio se calculó un “n” de la siguiente manera:

p= hallazgos positivos histológicamente por endoscopia para *H. pylori* = 20% (frecuencia estimada de pacientes enfermos por serología)

q= hallazgos negativos histológicamente por una endoscopia para *H. pylori* = 80%

Tasa de error = 10%

Nivel de confianza = 95%

Número de muestras = 62 muestras de heces fecales en pacientes que se realizaron endoscopia y estudio histológico.

Los resultados de las pruebas de los pacientes que acudieron a realizarse endoscopia y el análisis de antígeno para *H. pylori*, se clasificaron, ordenaron y compararon entre sí para establecer su frecuencia y su asociación.

2. Diseño de muestreo

El diseño del muestreo es por conveniencia. Se realizó análisis por estadística descriptiva utilizando los datos de edad promedio, desviación estándar de edad y frecuencia de género.

Se estableció la prevalencia de antígeno en heces con un intervalo de confianza del 95% y se relaciono con los hallazgos histológicos compatibles con *H. pylori*.

Se estableció la asociación entre las dos variables (detección de antígeno de *H. pylori* y el estándar de “Oro”), por medio de la prueba de Chi-cuadrado.

VIII RESULTADOS

Para el presente estudio se obtuvieron muestras fecales de 75 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para realizar la detección de antígeno de *Helicobacter pylori* mediante la prueba ELISA Analisa® por medio de metodología ELISA.

Para asegurar el procedimiento de calibración de la prueba, la misma se realizó por duplicado en cada calibrador, haciendo uso de análisis estadístico mediante regresión lineal se determinó el valor de la absorbancia promedio de cada uno de los calibradores utilizados para obtener el punto de corte.

Con el valor del punto de corte establecido se determinaron las pruebas positivas con valores superiores a 0.245 y pruebas negativas con valores inferiores a 0.245.

Se procesaron seis muestras control de resultado ya conocido por medio de metodología ELISA, que fueron proporcionadas por el Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala; estas muestras se evaluaron con el fin de ser utilizadas como control interno en la determinación de antígeno de *H. pylori* con la metodología empleada en el estudio (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de muestras fecales proporcionadas por el LABOCLIP para control interno positivo y control negativo

		ELISA en estudio		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA control LABOCLIP	Positivo	3	0	3
	Negativo	0	3	3
	Total	3	3	6

Fuente: Resultados experimentales

En el cuadro 1 se puede observar que los controles internos negativos y positivos (de valores conocidos) al ser evaluados con el kit ELISA empleado en el estudio para determinación de antígeno de *H. pylori*, evidenciaron concordancia en ambas metodologías.

La edad de los pacientes participantes en el estudio osciló entre 19 a 86 años, y el grupo etario con mayor número de pacientes fue entre las edades de 25 a 35 años en ambos sexos, siendo la edad promedio de 28 años con una desviación estándar de 8.52.

De acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 2 y Figura 1, se observa que el género con mayor cantidad (76.6%) de pruebas positivas para la determinación de antígeno de *H. pylori* es el masculino.

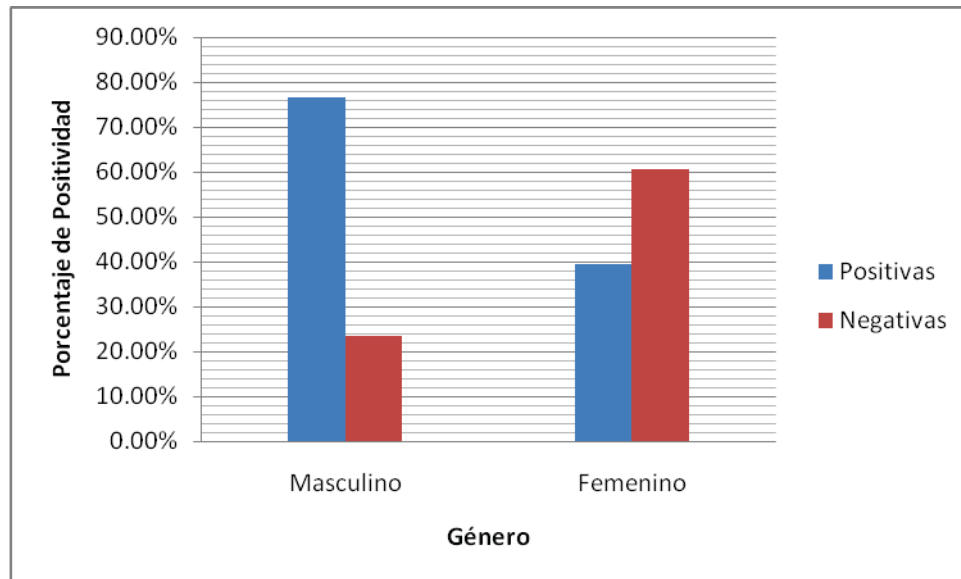
Cuadro 2. Resultados de la prueba de Antígeno de *H. pylori* en heces por género.

	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
POSITIVAS	36 (76.6%)	11 (39.3%)	47
NEGATIVAS	11 (23.4%)	17(60.7%)	28
TOTALES	47	28	75 (100%)

Fuente: Resultados experimentales.

Los datos obtenidos de la prueba de antígeno en heces (Cuadro 2), así como los de biopsia gástrica, (Cuadro 3, Figura 2) revelaron que al realizar la evaluación de la determinación de antígeno de *H. pylori* en muestras fecales y al compararlo con los resultados de la biopsia se obtuvo una sensibilidad de 95.92 % y una especificidad de un 100 % (Cuadro 4).

Figura 1. Frecuencia de Antígeno de *H. pylori* en muestras fecales por género



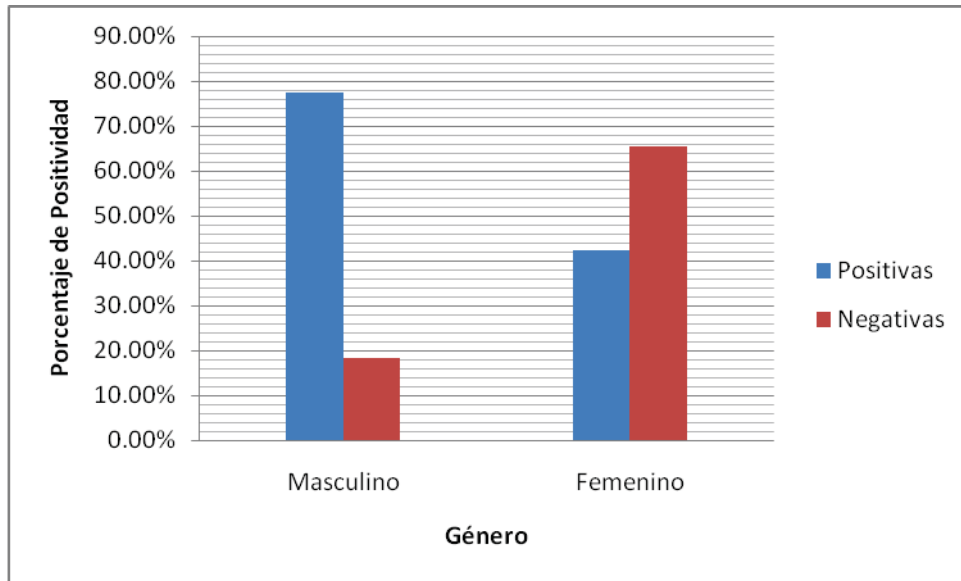
Fuente: Datos experimentales.

Cuadro 3. Presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas por género.

	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
POSITIVAS	38 (77.5%)	11 (42.30%)	49
NEGATIVAS	9 (18.36%)	17(65.38%)	26
TOTALES	47	28	75 (100%)

Fuente: Resultados experimentales.

Figura 2. Frecuencia de *H. pylori* por género en muestras obtenidas por endoscopia.



Fuente: Datos experimentales.

Cuadro 4. Comparación de resultados de detección de antígeno de *H. pylori* en heces y biopsia gástrica

Biopsia gástrica				
Antígeno	Positivo	Negativo	Totales	
Positivo	47	0	47	
Negativo	2	26	28	
Totales	49	26	75	

Fuente: Resultados experimentales.

Con los datos estadísticos obtenidos de las muestras analizadas en el estudio se determinó una prevalencia de muestras positivas para *H. pylori* basados en el análisis de endoscopia por ser el estándar de oro del 65.33% con intervalo de confianza de 95 % (53.90 – 76.77%).

IX DISCUSION DE RESULTADOS

H. pylori es un organismo adaptado al entorno de la cavidad gástrica. Su morfología espiral y las enzimas secretadas resultan importantes para atravesar la capa de moco gástrico y poder llegar a colonizar la mucosa. A su vez, los flagelos permiten a estos microorganismos moverse con mayor facilidad en un medio altamente viscoso como es la mucosa gástrica, con mayor efectividad que otros microorganismos curvados (27).

La técnica diagnóstica más utilizada y mundialmente aceptada para la identificación de *H. pylori*, que además es considerada como el estándar de oro, es la biopsia por endoscopia, sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas, como la obtención de la muestra, ya que se realiza de forma invasiva, su alto costo, y la accesibilidad a la misma. En las últimas décadas han surgido técnicas no invasivas como lo son la prueba del aliento, prueba rápida de ureasa, aislamiento en cultivo, la determinación serológica de anticuerpos y la determinación de antígenos en muestras fecales. Sin embargo de las anteriormente mencionadas, algunas son tediosas, difíciles y de crecimiento prolongado (48).

Para el presente estudio se obtuvieron muestras de 75 pacientes a los que se les realizó una endoscopia las cuales fueron procesadas para estudio histológico (con tinción de hematoxilina-eosina y Giemsa); dichos pacientes proporcionaron una muestra de heces para la detección de antígeno de *H. pylori*. Esto con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de detección de antígeno de *H. pylori* en muestras fecales, mediante un ensayo ELISA.

Según el segundo consenso de Maastricht celebrado por los Institutos Nacionales de Salud de Europa y Estados Unidos de Norteamérica, aprobado en 1997 estipuló que la detección del antígeno en heces en pacientes infectados por *Helicobacter pylori* se podía realizar mediante la técnica de inmunoensayo enzimático, la cual se debe efectuar en el laboratorio con anticuerpos policlonales. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentra alrededor de 94% y entre 86% a 92% respectivamente. La sensibilidad disminuye a 69% si la muestra de heces permanece a temperatura ambiente por 2 a 3 días, en nuestro

estudio la sensibilidad fue de 95% por lo que correlacionando los resultados del estudio y lo publicado por el consenso de Maastricht, se demuestra que la metodología empleada es altamente efectiva en la detección de antígenos contra *H. pylori*. Por otro lado, Maastricht recomienda que la prueba de mayor sensibilidad en la detección de *H. pylori* es la prueba rápida del aliento, sin embargo debido a su elevado costo en países en vías de desarrollo como Guatemala, la metodología a ser empleada sugiere la detección de antígenos contra *H. pylori* (36).

Con el fin de obtener mayor confiabilidad en la prueba, se realizaron las calibraciones y se evaluaron muestras con resultado ya conocido, que fueron procesadas mediante metodología ELISA utilizándolas como controles internos, dichas muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP) y los resultados obtenidos en la determinación del antígeno de *H. pylori* con el kit Analisa®, en las muestras proporcionadas evidenciaron concordancia con los resultados proporcionados por el LABOCLIP; por lo que la evaluación interna del kit fue satisfactoria.

Al realizar la evaluación de las muestras fecales para determinación de antígeno se encontró que del género masculino 36 muestras que corresponden a 76.6% fueron positivas, en el caso del género femenino las muestras positivas fueron 11 que equivalen a 39.3%. Con los resultados anteriormente obtenidos se puede establecer que la determinación de antígeno de *H. pylori* en las muestras analizadas, el género de mayor prevalencia de positividad frente al antígeno de *H. pylori* fue el masculino con IC 95%. (Cuadro 2, Fig. 2).

De las 75 muestras analizadas con el kit ELISA empleado en el estudio para la determinación de antígeno de *H. pylori* se encontró que 47 de ellas fueron positivas lo que representa 62.7%. Alonzo *et.al* realizó un estudio en el que el 53% de las muestras analizadas para la determinación de antígeno de *H. pylori* evidenciaron ser positivos, estos resultados revelan que la frecuencia de la infección mediante la determinación de antígeno en heces es elevada.

Los resultados obtenidos por medio del método invasivo (biopsia), reveló una prevalencia de 65.33 % en un IC de 95% (53.90 – 76.77), de las 75 muestras analizadas, así

mismo se puede determinar que el género masculino es el más afectado en cuanto a muestras positivas se refiere ya que el 77.5% del total de las muestras analizadas corresponden a este género.

Al realizar el análisis y la comparación en ambas metodologías diagnósticas (antígeno de *H. pylori* y biopsia por endoscopia) se determinó la concordancia entre ambas metodologías con 47 muestras que evidenciaron ser positivas y 26 muestras que evidenciaron un resultado negativo y 2 muestras fueron positivas para biopsia, no así la determinación de antígeno en heces.

Al realizar la evaluación de la sensibilidad y especificidad del estudio, evidencia que la determinación de antígeno de *H. pylori* es una prueba altamente sensible (95%) y específica (100%).

Los resultados del presente estudio confirman que la determinación del antígeno de *H. pylori* en heces puede utilizarse para el diagnóstico de la infección por esta bacteria, con un alto grado de confiabilidad. Estos datos coinciden con los resultados descritos por Pina, Negrini y Tadeu (2009), quienes reportan una sensibilidad del 93% para la detección de antígeno en heces comparado con un 96% de sensibilidad para la prueba de ureasa en aliento; por lo que la detección de antígeno de *H. pylori* en heces puede incluirse entre los métodos que permiten el diagnóstico de la presencia de este microorganismo sin requerir una endoscopia (14).

Finalmente, cabe destacar algunas ventajas de la prueba de antígeno de *H. pylori*, como su sencillez, rapidez (los resultados están disponibles en aproximadamente 2 horas) y la necesidad de obtener una única muestra que puede ser recolectada por el propio paciente en su domicilio, para posteriormente ser llevada al laboratorio. La naturaleza no invasiva de esta técnica la haría apropiada para su empleo como método de cribado y para estudios epidemiológicos encaminados a evaluar la prevalencia de la infección por *H. pylori* en grandes poblaciones. La prueba podría tener algunas ventajas particulares en niños, en los que la extracción sanguínea o la prueba del aliento pueden ser más difíciles de llevar a cabo. Las muestras fecales pueden almacenarse a 2-8 °C durante tres días, o a -20 °C indefinidamente, hasta el momento de la lectura de la prueba.

X CONCLUSIONES

- A. La prueba para antígeno de *H. pylori* en heces es altamente sensible (95%) y específica (100%).

- B. La determinación de antígeno es una prueba de elevada frecuencia en la detección de *H. pylori*, y que puede ser empleada como una prueba confiable para la identificación de la infección en la sociedad Guatemalteca.

XI RECOMENDACIONES

- A. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la determinación de antígeno en heces en pacientes post tratamiento de erradicación.
- B. Se recomienda realizar estudios con otra prueba de referencia como la prueba del aliento de la urea.
- C. Implementar este tipo de investigaciones en hospitales nacionales para evaluar la mejor técnica (no invasivas e invasiva) para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* minimizando costos con igual efectividad para el diagnóstico.
- D. Finalmente se recomienda realizar un estudio que permita evaluar la presencia de *H. pylori* por medio de anticuerpos, la prueba de urea en aliento y la asociación con el diagnóstico histopatológico post tratamiento.

XII. REFERENCIAS

1. Rodes Teixidor, J., *et.al.* Medicina Interna. Tomo I y II Editorial Masson 1ª. Ed. Barcelona España. 1997:1271-1272, 1282,1290,1295,1301,2894.
2. Pajares, J. M., Gisbert, J. P. *Helicobacter pylori*: Su descubrimiento e importancia en la medicina. Rev. Española de Enfermedades Digestivas. 2006:98(10):770-785.
3. Hernández M. *Helicobacter pylori*; la bacteria que más infecta al ser humano. Rev. Cubana Aliment Nutr. 2001:15(1):42-54.
4. Thomson R. *Helicobacter pylori*: Enfermedades gastrointestinales. Rev. Panamericana de Salud Pública. 2003:3(2):60-82.
5. Cantón C. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Española de Enfermedades Digestivas. 2004:10(11):790-801.
6. Pueyo M. Epidemiología de la infección por *H. pylori*. Rev. Anales Del Sistema Sanitario de Navarra 2003:21(2):39-56
7. Marshall BJ. Estado actual de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Mosby/Doyma. 2000:13(2):11-22.
8. Thomas JE. Epidemiología de las infecciones por *Helicobacter pylori*. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 12ª edición. Perú: Editorial Universitaria Peruana Cayetano Heredia, Santa Ana S.A., 2004. Pp. 71-83.
9. Hoda M. *et.al.*, Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Department of Medicine at Baylor College of Medicine, Houston, TX; USA; Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden 2002.
10. Haeckel R. Infecciones por *Helicobacter pylori*. Parte 1: Epidemiología patobioquímica, diagnóstico y terapia. Laboratorio Médico 2004:20(10):78-84.
11. Cave DR. *et al.* Transmisión y epidemiología de *Helicobacter pylori*. Rev. Am. Médica. 2003:100(5):12-18.
12. Alfonso V. *et al.* Los pacientes con úlcera duodenal transmitidas por *Helicobacter pylori* a sus familiares. Rev. Española de enfermedades gastrointestinales. 2003:87:109-113.
13. Steimberg B. *et.al.*, Prevalence of infection with waterborne pathogens: a seroepidemiologic study in children 6-36 months old in San Juan Sacatepequez, Guatemala. Am J Trop Med Hyg 2004 ;70(1):83-8

14. Alonzo L, *et al.*, Asociación entre la presencia de *Helicobacter pylori* y patologías gástricas detectadas por endoscopías. Revista Científica, Instituto de Investigaciones Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad San Carlos de Guatemala, 2009:4(1):34-41
15. Holcombe C. *et al.* La infección bacteriana más común en África. Un estudio serológico. Rev. Am. J. Gastroenterol. 2002:87: 28-30.
16. Taylor DE. *et al.* La epidemiología de la infección con *Helicobacter pylori*. Rev. Epidemiológica Americana. 2003:13:42-59.
17. García R. M. *et al.* Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en la población general adulta de la provincia de Ourense. Rev. Española de Enfermedades Digestivas. 2005:98(4):30-45.
18. Pueyo A.M. *et al.* Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Anales. 2003:21(2):39-56.
19. Michael, T. *et al.* Biología de los Microorganismo, 10ed. Madrid: Editorial Pearson Prentice Hall, 2004. Pp. 387, 725, 860, 886-887.
20. Oregel, S. Prevalencia de anticuerpos sericos contra Helocobacter pylori en niños de baja condición socioeconómica. Tesis (Medico y Cirujano), Universidad de Sn Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Medicas. Guatemala 2002. Pp. 62
21. Parslow T. *et al.* Inmunología Básica y Clínica. 10ed. México: El Manual Moderno, 2002. Pp. 553-554
22. Olivares D y Guisbert J.P. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. Revista Española, enfermedades digestivas 2006:98:374-386
23. Premoli G. *et al.* Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la plimerasa. Rev. Cubana de Medicina Tropical. 2004:56(2):10-36.
24. Trapero M. *et al.* Spanish scientific output on *Helicobacter pylori*. Rev. Española de Enfermedades Digestivas. 2006:98(4):89-110.
25. Gavila G. Urticaria Cronica y *Helicobacter pylori*. Rev. Alergol Inmunologia Clinica 2000;15: 366-373
26. Thomas J. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science SA, 1999;135-156.

27. Hergueta Delgado P, García Montes JM. Papel de la infección por *Helicobacter pylori* en la úlcera péptica. Rev Esp Enferm Dig 1997; 20: 38-45.
28. Correa P. Anatomía patológica de la infección por *Helicobacter pylori*. En: López-Brea M, ed. *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science SA. 1999;213-218.
29. Piñol F. y Paniagua M., Citocinas, Gastritis Crónica y *Helicobacter pylori* Rev Cubana Hematoología Inmunología Hemoterapia La Habana 2000;16(3): 321-338
30. J. Delgado. *et.al.*, Optical and electronic findings in Helicobacter pylori infection of the antral mucosa. En: *Helicobacter pylori* and Gastrointestinal Pathology. Pp. 82-89 (1992), Berlín Heidelberg (Alemania).
31. J. D. Delgado, M. Casas, J. Martín, P. Hergueta, F. Rivera y J. M. Herrerías. Infección por *H. pylori* y úlceras, niveles séricos de gastrina. Rev. Esp. Enf. Digest. 1996; 88:62-63
32. El-Omar E, McColl Kell. Eradicating Helicobacter pylori infection lowers gastrin mediated acid secretion by two thirds in patients with duodenal ulcer. Gut 1993; 34:1060-5
33. Timothy R, Cave MBBS, David R, Cave MD. A *Helicobacter pylori* peptide increases pepsinogen secretion from isolated rabbit gastric glands. Rev Esp Enf Ap Dig 1990; 78:52.
34. Queiroz D, *et al.* Histamine content of the oxyntic mucosa from duodenal ulcer patients: effect of Helicobacter pylori eradication Journal of Gastroenterology 1993; 88:1228- 1232.
35. David A Peura, M.D Symposium. 1996. *Helicobacter pylori* a practical approach to diagnosis and management, Georgetown University Medical Center, volume 2 december 14.
36. Sebastián R. *et al.* *Helicobacter pylori*: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. Rev. The MACH 1 study the *Helicobacter pylori*. 2006;3(158):9-12.
37. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, *et.al.* Current Concepts in the management of Helicobacter pylori infection: The Maastricht III Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther. 2006;16:167:771-781

38. Pina M, et.al. Novel Monoclonal Antibody-Based *Helicobacter pylori* Stool Antigen Test. *Helicobacter pylori* 200: 9(3):228–232.
39. Koletzko S, et.al. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. *Gut online*; 2003;52:804–806.
40. Vincens W. et.al. Sensitivity of a Novel Stool Antigen Test for Detection of *Helicobacter pylori* in Adult Outpatients before and after Eradication Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*; 2004: 42 (3):1319–132
41. Salas R. et al. Erradicación de *Helicobacter pylori* mediante triple terapia (amoxicilina, claritromicina y omeprazole), en pacientes del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia. *Rev. Acta Médica Costarricense*. 2003;45(2):545-550.
42. Vicente R. Erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera péptica tras fracaso de dos tratamientos previos: estudio prospectivo guiado por cultivo. *Rev. Gastroenterología y Hepatología*. 2007;25(7):A36-A37.
43. Wilson R. et al. Tratamiento de *Helicobacter pylori* con Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina en esquemas de 7 y 10 días. *Rev. Gastroenterología del Perú*. 2003: 23(3):130-133.
44. De Boer W.A. et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. BMJ*. 2000;320(2):31-34.
45. Rollán A. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera duodenal: Estudio de costo-beneficio. *Rev. Médica de Chile*. 2000;128(4):102-115.
46. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Publicado en *Gut*. 2012;61:646-66461.

XIII. ANEXOS

1. Carta de consentimiento informado para el estudio “Evaluación del valor diagnóstico de la técnica de detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en heces y su asociación con el diagnóstico histopatológico”.

La bacteria de *H.pylori* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, un diagnóstico certero y a tiempo es de gran utilidad para el clínico y el paciente, ya que esto evitará que la enfermedad causada por *H. pylori* progrese en casos como úlceras gástricas, reflujo gástrico y cáncer de estómago entre otras.

En el diagnóstico de *H. pylori* se utiliza con mayor frecuencia metodología invasiva, sin embargo es importante encontrar alternativas no invasivas que sean tan seguras como las invasivas, por lo que la evaluación de la técnica para la detección de antígeno de *H. pylori* en heces y su asociación con diagnóstico histopatológico es sumamente importante. Las ventajas de participación en el estudio es el diagnóstico de la bacteria por dos metodologías diferentes, la invasiva y la no invasiva que no tendrá costo alguno, para lo cual únicamente se requiere una muestra de heces. Se asegura la confidencialidad del manejo de muestras y resultados, los cuales serán conocidos únicamente por el clínico, el participante en el estudio y la investigadora del mismo.

Guatemala _____

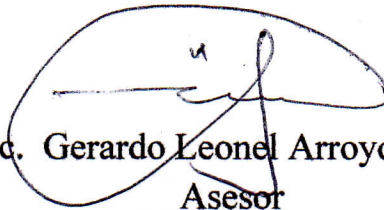
Yo _____ que me identifico con cédula de vecindad número de orden _____ registro _____, extendida en _____ ratifico que se me ha brindado la información necesaria en cuanto al análisis de laboratorio para la identificación de *Helicobacter pylori* en heces y mi aceptación en la participación del estudio “Evaluación de la técnica para la detección de antígeno de *Helicobacter pilory* y su asociación con diagnóstico histopatológico”, por lo que con previo conocimiento autorizo se me realice el análisis para la evaluación del antígeno de *Helicobacter pylori* en heces.

Firma del Paciente

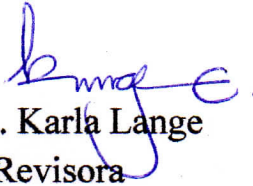
Firma del Responsable



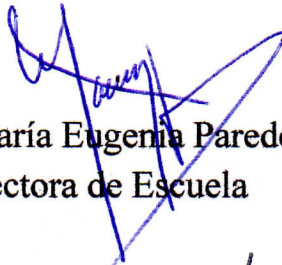
Luzbeth Martha Patricia Valdez Casasola
Autora



MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Asesor



Licda. Karla Lange
Revisora



M.A. María Eugenia Paredes
Directora de Escuela



Ph. D. Oscar Cobar Pinto
Decano