



**UNIVERSIDAD MICHUACANA SAN NICOLAS DE
HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA EL
CULTIVO DE *Helicobacter pylori*"**

**TESIS
PARA OBTENER TÍTULO DE MAESTRA EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

MED. CIR. Maricruz Sánchez Rosado.

DIRECTORA DE TESIS:

D. C. Bertha Fenton Navarro.

Morelia, Michoacán a Abril de 2009.

COMITE TUTORAL:

M. en FB. Víctor Manuel Farias Rodríguez.

D. C. José Miguel Cervantes Alfaro.

Q.F.B. Elda Gabriela Vázquez Narváez.

Dr. Francisco Esquivel Ayanegui.

Agradecimientos

A mi esposo *Adrián* por compartir su vida conmigo y por brindarme su apoyo incondicional.

A mi querida hija *María Itzel*, por llenar de alegría cada momento de mi vida y motivarme a seguir superándome cada día.

A mis padres, por su ejemplo de que las metas se alcanzan con la constancia del trabajo diario.

A mis hermanos y hermana, con cariño.

A la D. en C. Bertha Fenton Navarro, por aceptar ser mi asesora, dirigir este trabajo y sobre todo por su comprensión y confianza durante este proceso.

A la Q.F.B. Elda Gabriela Vásquez Narváez por compartir su conocimiento en Microbiología clínica, su apoyo y recomendaciones para realizar este proyecto.

A los Doctores Francisco Esquivel Ayanegui y Luis Alvarez Avalos por compartir sus conocimientos en gastroenterología y endoscopia, y colaborar desinteresadamente en la realización de este proyecto.

Muy en especial a mi comité tutorial por compartir sus enseñanzas conmigo, por su valioso tiempo, dedicación y observaciones que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Enrique Huerta Wong por traspolar sus conocimientos al área de ciencias de la salud.

Al Mtro. Humberto Ruiz Vega por sus aportaciones en la parte final de este proyecto.

A mis profesores de Posgrado que compartieron sus conocimientos y experiencias conmigo.

Al personal del Departamento de Endoscopia y Microbiología Hospital General “Dr. Miguel Silva”, que colaboraron en este trabajo de tesis.

ABREVIATURAS

AINES: Anti inflamatorios no esteroideos

ATCC: Cepa con certificado de autenticidad y trazabilidad

Bab A: Adhesina unida a antígeno sanguíneo.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

GalNAc α : N-Acetilgalactosamina.

Helicobacter pylori: *H. pylori*, *Hp*, *HP*.

H⁺: Hidrogeniones o iones Hidrogeno.

HCL: Acido clorhídrico.

HLA: complejo mayor de histocompatibilidad.

IBP: Inhibidores de la bomba de protones.

IARC: Agency for Research on Cancer.

Le: Antígenos Lewis.

Le^x Antígeno Lewis ^x

Le^a Antígeno Lewis ^a

LPS: Lipopolisacárido.

Kb: Kilobase

MALT: Maltomas, Linfoma de Tejido Linfoide Asociado a Mucosas.

μ m: Micrones.

MMP-9: Metaloproteinasa de la matriz de monocito 9.

Mpb: Miles de pares de bases.

NCTC Colección nacional de tipos de cultivo

nm: nanometros

NeuAc 2-3-Gal: Acido neuramínico o Acido siálico.

rRNA: Acido Rinonucleico ribosomal.

23S: Subunidad ribosomal 23S.

sab A : Adhesina unida a ácido sialico.

MHC II: Moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de histocompatibilidad II.

ORFs: Open Reading Frames.

PCR*: Proteína C Reactiva.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

WHO: World Health Organization.

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla 1. Clasificación Taxonómica de <i>H.pylori</i>	11
Tabla 2. Resumen las especies de <i>Helicobacter pylori</i> y el sitio localización.....	12
Tabla 2.1. Hábitat y características fenotípicas de las especies de <i>Helicobacter</i>	
Tabla 3. Características Morfológicas.....	13
Tabla 4. Características Estructurales.....	14
Tabla 5. Manifestaciones extradigestivas asociadas a <i>H. pylori</i> y los principales biomarcadores que participan en la fisiopatogenia.....	37
Tabla 6. Tinciones más utilizadas para la identificación de <i>H. pylori</i>	40
Tabla 7. Reactivos para la recolección de biopsias.....	42
Tabla 8. Manejo de la muestra clínica.....	43
Tabla 9. Medios de cultivo útiles para el aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	45
Tabla 10. Concentración de sangre de caballo.....	46
Tabla 11. Medios de cultivo útiles para el aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	46
Tabla 12. Comparación de inhibidores utilizados para el cultivo de <i>H. pylori</i>	47
Tabla 13. Comparación entre las diferentes condiciones de incubación del cultivo.....	48
Tabla 14. Medios de conservación de <i>Helicobacter pylori</i>	50

Tabla 15. Variables en estudio	72
Tabla 16. Población en estudio por grupos de edad y el diagnóstico endoscópico.....	73
Tabla 17. Cultivo cepa de referencia ATCC 43504 utilizando base agar <i>Brucella</i> con 10% sangre de carnero, con y sin inhibidor VCN.....	74
Tabla 18. Cultivos de la prueba piloto utilizando base agar <i>Brucella</i> con, 10% sangre de carnero con y sin inhibidor VCN.....	77
Tabla19. Cultivo de muestras Fase I.....	79
Tabla 20. Cultivo de muestras con base agar Casman, sangre laqueada con y sin Antibiótico Skirrow, 1% isovitalex.....	81
Tabla 21. Crecimiento de <i>H. pylori</i> utilizando diferentes condiciones de cultivo...	83

INDICE DE FIGURAS

PAGINA

Figura 1. Factores que intervienen en la infección por <i>H. pylori</i>	10
Figura 2. Composición de Superfamilia VI de rARN.....	11
Figura 3. Representación circular del cromosoma de <i>Helicobacter pylori</i> 26695.....	15
Figura 4. Estructura de la pared celular de las bacterias gran negativas.....	18
Figura 5. Mecanismos de daño celular ocasionados por <i>Citotoxina vacuolizante</i> <i>VacA</i>	23
Figura 6. Patogénesis de la infección por <i>H. pylori</i>	26
Figura 7. Representación esquemática de la patogénesis de la infección por <i>H.</i> <i>pylori</i>	30
Figura 8. Interacción de las adhesinas de <i>H. pylori</i> con los receptores de las células gástricas epiteliales del hospedero.....	32
Figura 9. Crecimiento de la cepa de referencia ATCC 43504.....	75
Figura 10. Cultivo positivo para <i>H. pylori</i> utilizando base agar <i>Brucella</i> con 10% sangre de carnero.....	78
Figura 11. Cultivo positivo para <i>H. pylori</i> utilizando base agar <i>Brucella</i> con 10% sangre de carnero.....	79
Figura 12. Cultivo positivo para <i>H. pylori</i> utilizando base agar Casman con 10% sangre laqueda de caballo con y sin suplemento antimicrobiano Skirrow y 1% isovitalex.....	82
Figura 13. Cultivo positivo para <i>H. pylori</i>	85

INDICE DE ANEXOS

PAGINA

Anexo 1. Carta de Consentimiento informado.....	108
Anexo 2. Hoja de recolección de datos socio-demográficos y clínicos	109
Anexo 3. Datos del paciente para la recolección de la muestra.....	110
Anexo 4. Recolección de datos de microbiología.....	111
Anexo 5. Preparación de material.....	112

GLOSARIO

Alelo: Es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Caspasas: Grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas.

Cinasas: (Quinasas o kinasas) es un tipo de enzima que transfiere grupos fosfatos desde ATP a un sustrato específico o diana (fosforilación).

Factor de transcripción: Es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa.

Lectinas: (Adhesinas o hemagglutininas) son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, fijadoras de carbohidratos con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados.

Secuencia señal: Regiones de los extremos de un gen.

Replicación: Duplicación exacta de una molécula de ácido nucleico monocatenario (una cadena) o bicatenario (dos cadenas de nucleótidos).

Fenómeno de Raynaud (primario): Es esencialmente una respuesta vasoespástica exagerada al frío o las emociones. Clásicamente los dedos se tornan blancos (isquemia), después azules (desoxigenación), por último rojos (repercusión).

Síndrome de Sjögren: Se define como enfermedad autoinmune sistémica que mayormente afecta las glándulas exócrinas y usualmente presenta sequedad persistente de boca y ojos debido a daño funcional de las glándulas salivares y lagrimales.

Plásmidos: Son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.

Trasmisión horizontal: Proceso natural por el que las bacterias adquieren o dan material genético fuera de la reproducción, mediante multiplicación celular por conjugación, transducción o transformación.

INDICE GENERAL

	PAGINA
i. ABREVIATURAS	
ii. INDICE DE TABLAS	
iii. INDICE DE FIGURAS	
iv. INDICE DE ANEXOS	
v. GLOSARIO	
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION.....	2
1. Antecedentes Históricos	2
2. Epidemiología	4
3. Factores de riesgo.....	6
4. Taxonomía	10
5. Morfología.....	12
6. Estructura.....	14
7. Genoma y plásmidos.....	15
8. Características Estructurales.....	17
9. Factores de virulencia.....	20
10. Fisiopatología.....	28
11. Mecanismo de Adhesión y Colonización.....	30
12. Manifestaciones Digestivas.....	33
13. Manifestaciones Extradigestivas.....	37
14. Métodos Diagnósticos.....	38
15. Tratamiento.....	55
16. Prevención.....	58
17. Parámetros para realizar la estandarización de una metodología.....	59
III. SITUACION.....	64
IV. JUSTIFICACION.....	64
V. OBJETIVOS.....	65
1. Objetivo general.....	65
2. Objetivos específicos.....	65
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	65
VII. HIPOTESIS.....	65

VIII. DISEÑO DE ESTUDIO.....	65
IX. MATERIAL.....	65
1. Población en estudio.....	65
2. Criterios de inclusión.....	66
3. Criterio de no inclusión.....	66
4. Criterios de eliminación.....	67
5. Control Positivo.....	67
6. Reactivos.....	67
X. METODOS.....	67
1. Toma de biopsia gástrica.....	67
2. Transporte de la muestra.....	68
3. Macerado de la muestra.....	68
4. Cultivo y atmósfera microaerofílica.....	68
5. Identificación <i>H. pylori</i>	69
6. Cuantificación de crecimiento bacteriano.....	70
7. Métodos y Técnicas de recolección de la información.....	71
7.1. Departamento de Endoscopia.....	71
7.2. Departamento de Microbiología.....	71
7.3. Análisis estadístico.....	71
7.4. Consideraciones éticas.....	72
7.5 Aprobación del Trabajo.....	72
XI. RESULTADOS.....	73
XII. DISCUSION.....	89
XIII. CONCLUSIONES.....	95
XIV. PERSPECTIVAS.....	96
XV. REFERENCIAS.....	97
XVI. ANEXOS.....	108

I. RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* constituye un problema de salud pública, debido a que se ha determinado que aproximadamente la mitad de la población mundial esta infectada con la bacteria y es la primera clasificada como carcinógeno de clase I desde 1994 por la OMS. La prevalencia varía de un país a otro y esta relacionado fundamentalmente con nivel socioeconómico bajo (García C. y cols. 2003). Actualmente en México, no se cuentan con campañas de salud específicas para la prevención de infección por *Helicobacter pylori*, y debido a que no existe una vacuna, es fundamental el diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado del paciente. El mejor método diagnóstico es la panendoscopia con toma de biopsia para realizar la identificación de la bacteria por medio de histología (tinción) o realizando un cultivo del tejido.

Se seleccionaron tres grupos de pacientes entre 18 y 75 años de edad que con diagnósticos de patología gastroduodenal (n= 44), género femenino 21 (47.7%) y masculino 23 (52.3), promedio de edad de 48 años, a los cuales se les realizó identificación de *Helicobacter pylori* utilizando como método diagnóstico el cultivo. En relación con el diagnóstico endoscópico, los grupos se clasificaron de la siguiente manera: Grupo 1: Pacientes con Gastritis Crónica Nodular (n= 32), Grupo 2: Pacientes con Úlcera Gástrica o Péptica (n= 6) y Grupo 3: Pacientes con Úlcera Duodenal (n= 6). Con antecedente de suspensión de tratamiento (inhibidor de la bomba de protones, durante los 7 días previos a la endoscopia) y sin antecedentes de ingesta de AINES, entre febrero de 2008 y enero de 2009. Se utilizó como control positivo cepa de referencia ATCC 43504 y para el cultivo de las muestras: base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero y Casman base agar Casman con 10% sangre laquada y suero de caballo con y sin suplemento antimicrobiano VCN y Skirrow e isovitalex.

Al utilizar Casman/SLC/Skirrow se obtuvo mayor crecimiento bacteriano por número de colonias y en más cuadrantes que con *Brucella*, y a su vez al utilizar Casman/Suero/Skirrow, el crecimiento bacteriano fue mayor que con Casman/SCL/Skirrow. La correlación fue estadísticamente significativa entre la prueba de ureasa y los medios de cultivo utilizados para la identificación de *H. pylori* ($p=0.015$). En relación a las variables socio-demográficas, se encontró una correlación estadísticamente significativa en género ($p=0.023$), en género femenino el 43.2% con diagnóstico de Gastritis Crónica Nodular, 4.5% Úlcera Duodenal, a diferencia del género masculino con 29.5% Gastritis Crónica Nodular, 13.6% Úlcera Gástrica y 9.1% Úlcera Duodenal.

En conclusión se obtuvieron las condiciones necesarias para desarrollar un cultivo de *Helicobacter pylori* con éxito a partir de biopsias con diagnósticos endoscópicos asociados a la presencia de esta bacteria.

Hasta donde sabemos este trabajo es el primero en el que se reporta la estandarización de este cultivo.

II. INTRODUCCION

La infección por *Helicobacter pylori* constituye un problema de salud pública, debido a que se ha determinado que más de la mitad de la población mundial esta infectada con ésta bacteria, con mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo y estrechamente relacionado con los niveles socioeconómicos. La infección por *H. pylori* ocupa el primer lugar, por su frecuencia, entre todas las infecciones bacterianas humanas. *Helicobacter pylori* es la primer bacteria clasificada como carcinógeno de clase I desde 1994 por Internacional Agency for Research on Cancer y World Health Organization (IARC/WHO). Además de ser aislado de la mucosa gástrica principalmente antral se ha encontrado en bilis y vesícula biliar. Es un patógeno específico de los primates y el humano *H. pylori*, se asocia en un alto porcentaje a enfermedades gastroduodenales. En México, la encuesta de la Secretaría de Salud del 2006, las úlceras, gastritis y duodenitis ocupan el cuarto lugar de morbilidad a nivel nacional (Araújo y cols. 2006, Fuentemayor y cols. 2002, García y cols. 2003, González y cols. 2004, Gustafsson y cols. 2006, López- Brea, 2005, Muñoz y cols. 2007, Martínez y Martínez, 2002, Roche y cols. 2004, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2007, Wu y cols. 2007^{4,39,41,49,73,87,80,119,129}).

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte en pacientes que fallecen por tumores malignos en México. Esta enfermedad representa un problema de salud pública. Existe una fuerte asociación entre la infección de *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico. Este tumor es precedido por lesiones preneoplásicas incluyendo gastritis crónica nodular, atrófica (GCN, GCA), metaplasia intestinal (MI) y displasia (Araújo y cols. 2006, Mohar y cols. 2002^{4,83}).

Existen diferentes factores que interfieren en la recuperación de *H. pylori* a partir de aislados clínicos (sensibilidad del cultivo), dentro de las cuales podemos mencionar; combinaciones de medios de transporte, cultivo y suplementos inhibidores, polienriquecimientos, generación de ambiente microaerofílico, tiempo de incubación, criterios de inclusión de pacientes al estudio (Buckley y cols,1998¹⁶). Debido a esto en el presente trabajo planteamos realizar la estandarización del método de cultivo para *Helicobacter pylori*.

1. Antecedentes Históricos

En las últimas 3 décadas los investigadores de todo el mundo han retomado el estudio de las bacterias espiraladas, que habían sido reportadas desde finales del siglo XIX en el estómago de algunos mamíferos. Las modernas técnicas de biología molecular han demostrado el parentesco de estas especies en su material genético (Mandado y cols. 2002⁷⁸).

Las bacterias pertenecientes al género *Campilobacter* habían sido cultivadas en Inglaterra por Martin Skirrow y reconocidas en 1977 como causa de diarrea. En 1893 Bizzozero y en 1896 Salomon, demostraron la presencia de

bacterias espirales en el estómago de perros y gatos. Karienttz en 1906, descubrió microorganismos semejantes en jugo gástrico de pacientes con cáncer de estómago. Doenges en 1938, en un análisis de necropsias, encontró bacterias espiraladas en el estómago de 43% de los humanos estudiados, sin haberse logrado cultivar. Posteriormente, en 1950 se describe que la actividad de la ureasa en pacientes con úlcera gástrica, consistía en neutralizar la acidez gástrica, mediante la producción de amonio. Sin embargo, la visión microscópica de las bacterias curvadas no era suficiente para establecer unos planteamientos científicos que sirvieran de base para otorgarles un papel ulcerogénico, sino que había que cultivarlas (Acosta y cols. 1998, Buckley y cols. 1998, Citelly y cols. 1999, Gené y cols. 2002, Gómez, 2001, Kuster y cols. 2006, López- Brea, 2005, Pajares, 2008^{2, 16, 24, 42, 46, 68, 73, 102}).

Motivo por el cual, la importancia de esta bacteria en las enfermedades gastroduodenales fue entendida hasta que en 1983 en Australia, Barry J. Marshall y J. Robin Warren lograron aislar por primera vez la bacteria, mediante la incubación prolongada de cultivos de pacientes con gastritis crónica, tras varios intentos fallidos y utilizando medios de cultivo para *Campilobacter jejuni*, durante unas vacaciones de semana santa se quedaron los cultivos accidentalmente en la estufa, en los cuales observaron este microorganismo (Acosta y cols. 1998, Buckley ,1998, Citelly y cols.1999, Gené y cols. 2002, Gómez, 2001, Kuster y cols. 2006, López- Brea y cols. 2005, Lozano y cols. 2006, Pajares, 2008, Warren y Marshall,1983^{2, 16, 24, 42, 46, 68, 73,75, 102, 145}).

En ese mismo año inician un estudio prospectivo en colaboración con Goodwin, realizando 58 cortes histológicos de 100 muestras de biopsias extraídas de la mucosa antral intestinal. Once de los cultivos positivos resultaron ser bacterias gram negativas microaerófilas. Publicándose en The Lancet la descripción de bacilos curvados no identificados aislados de cultivos de biopsias de la mucosa gástrica pacientes con Gastritis Crónica Activa. Posteriormente, Marshall y Morris demostraron que esta bacteria podía colonizar el estómago humano, induciendo inflamación de la mucosa gástrica posterior a su ingestión de este microorganismo (Buckley y cols, 1998, Citelly y cols. 1999, Gené y cols. 2002, Gómez, 2001, Kuster y cols. 2006, López- Brea y cols. 2005, Pajares, 2008^{2, 16, 24, 42, 46, 68, 73, 102}).

En 1984, en la misma revista se publican los mismos hallazgos pero ahora incluyendo no solo la gastritis, sino la úlcera gastroduodenal. Además, se detectó por primera vez en las heces un microorganismo semejante morfológicamente a una espiroqueta (Giono y cols. 2006, País y cols. 2006, Paredes y cols. 2007^{43,101, 104}).

Por el aspecto curvo de la bacteria, sus requerimientos de cultivo, su localización anatómica (cerca del píloro), fue llamado *Campylobacter pyloridis*, nombre que después fue corregido para adoptarlo a la forma científica correcta *Campylobacter pylori*, debido a que muestra muchas características morfológicas y de crecimiento en común con las campilobacterias. En 1987, se establece la

erradicación de *H. pylori* en úlcera duodenal (Azevedo y cols. 2007, Brooks y cols. 2002, Mandado y cols. 2003, Raczko y cols. 2005, Ryan y cols. 2005^{7, 15, 78, 110, 125}).

En 1989, datos provenientes del estudio de la secuencia 16S ARN ribosomal llevaron a la conclusión de que se trataba de un nuevo género. Quedó entonces clasificado como *Helicobacter pylori* que pertenece a la clase *Epsilonproteobacteria*. En 1991, Owen, emitió el primer reporte, donde se asocia a *H. pylori* con cáncer gástrico. Posteriormente en 1997, Consenso Europeo reporta una guía para el manejo de la infección por este microorganismo. (Buckley y cols. 1998, Citelly y cols. 1999, García y cols. 2003, Giono y cols, 1994, Gómez, 2001^{16, 24, 44, 46}).

Este redescubrimiento de *Helicobacter pylori*, se considera como uno de los avances científicos más relevantes de la Gastroenterología en el siglo pasado. Es el patógeno más común del tracto gastrointestinal y se considera la única bacteria relacionada con gastropatías (Giono y cols. 2006, País y cols. 2006, Paredes y cols. 2007^{44, 101, 104}).

Barry J. Marshall y J. Robin Warren, debido a esta importante contribución a las ciencias biológicas, estos dos investigadores australianos fueron galardonados con la distinción del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el 2005 por sus trabajos sobre “el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su implicación en Gastritis tipo B y úlcera péptica y duodenal” (Giono y cols. 2006, Kuster y cols. 2006, López- Brea, 2005, Nyrén y cols. 2006, Pajares, 2008^{44, 68, 73, 98, 102}).

2. Epidemiología

Estudios epidemiológicos han determinado que aproximadamente la mitad de la población mundial esta infectada con *Helicobacter pylori*. Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente y esta estrechamente relacionada con los niveles socioeconómicos. La incidencia es alta en África, Asia y América central y sur y baja en norte de Europa, Norteamérica y Australia. En países desarrollados, la infección es más rara en niños y afecta aproximadamente a 20% de personas menores de 40 años y 50% mayores de 60; mientras que en naciones en vías de desarrollo el porcentaje desde la niñez es elevado: a los 5 años más del 20% de la población esta infectada, y a los 20 años alcanza tasas más altas, cerca del 80%, por lo cual algunos autores consideran que el principal factor de riesgo para adquirir la infección por *H. pylori* es el nivel socioeconómico bajo. La prevalencia en adultos países occidentales desarrollados oscila entre 20 y 40% y alcanza cifras del 60 al 80% en países de tercer mundo (Azevedo y cols. 2006, Chillihua y cols. 2003, Clyne y cols. 2007, González y cols. 2004, Olivares y cols. 2006, Rafols y cols, 2000, Saad y cols. 2005, Tierney y cols. 2006, Torres y cols. 2006^{7, 21, 25, 47, 99, 111, 125, 137, 138}).

Se ha observado mayor probabilidad de adquirir la infección por esta bacteria durante la infancia y aumentando de la prevalencia con la edad además de variaciones en diferentes grupos étnicos. La prevalencia de la infección es alta, en poblaciones con alta incidencia de cáncer gástrico, como Japón (es la segunda causa de mortalidad por cáncer) y Colombia. Si bien la mayoría de estos pacientes infectados permanecen prácticamente asintomáticos por el resto de sus vidas, hay evidencias sólidas de que el *H. pylori* tiene un papel patogénico importante en ciertas enfermedades digestivas (Cervantes, 2006, Clyne y cols. 2007, Giono S. y cols. 1994, Morales y cols. 2003, País y cols. 2006, Siakantaris y cols. 2009 Valenzuela y cols. 2004,^{20, 25, 44, 85, 101, 131, 141}).

Recientemente se evidenció que la prevalencia en países en vías de desarrollo como Perú es de 62-80% de la población. De estos casos *H. pylori* logra ser aislado en un 53%. Se relaciona en un 100% de pacientes sintomáticos y cambios inflamatorios en la mucosa gástrica y en pacientes con Úlcera Duodenal en un 80%. Reportan mayor frecuencia de infección por *H. pylori* en el pacientes entre los 21-40 años. Lo anterior esta relacionado con que en este intervalo de edad se adquieren nuevos hábitos laborales, dietéticos, sociales y diferentes estilos de vida que influyen en la progresión de la infección que probablemente adquirieron a temprana edad. Observaron mayor prevalencia en mujeres que en hombres aunque esto puede deberse a que generalmente acuden con mayor frecuencia a los centros hospitalarios (Chillihua y cols. 2003, González y cols. 2004^{21, 47}).

En Estados Unidos y otros países desarrollados la prevalencia es cercana al 30 %, En este país la prevalencia varia de acuerdo a su edad: alrededor del 50% a los 60 años y 20% a los 30 años poseen el microorganismo. América Latina presenta variaciones en las condiciones geográficas, demográficas y socioeconómicas con relación al comportamiento de la infección por *H. pylori*. A pesar de que la infección por *H. pylori* tiene una distribución mundial, la mayor parte de la información disponible proviene de Australia, Norteamérica y Europa, y es poco lo que se conoce sobre su epidemiología en países en vías de desarrollo. En éstos últimos, la infección puede alcanzar cifras de prevalencia de hasta un 80% (Fuentemayor y cols. B. 2002, González y cols. 2004, Tierney y cols. 2006^{39, 47, 137}).

En un estudio realizado en México en 1997 con un banco de sueros procedentes de personas entre los 1 y 90 años, los resultados mostraron que en el 20% de los niños de 1 año de edad están presentes anticuerpos para *H. pylori* y que la seropositividad aumento hasta en un 50% en los niños de 10 años de edad, sugiriendo que la infección por este microorganismo en nuestro país al igual que en otros países, se adquiere en etapas tempranas (infancia) y también se han observado regiones de mayor riesgo como Chiapas, por ser uno de los estados con menor nivel socioeconómico-cultural. Se ha reportado que cuanto más temprana se adquiere la infección, mayor será el riesgo de padecer cáncer

gástrico posteriormente (Azevedo cols. 2006, Cervantes, 2006, Tierney y cols. 2006, Torres y cols. 2006^{7, 20, 137, 138}).

Giono y colaboradores en el 2006 reportan que la prevalencia de la infección por *H. pylori* en niños fue del 13.3%. La edad de inicio de colonización en niño fue cerca de los dos años de edad. De los pacientes que participaron en el estudio el dolor abdominal severo recurrente fue la historia pre-diagnóstica más frecuente, que hizo que se enviaran por el gastroenterólogo a la unidad de endoscopia, para la toma de biopsia, con el objeto de descartar la presencia de infección por *Helicobacter pylori*. Otros estudios también reportan que los niños con dolor abdominal crónico, están significativamente más infectados que los sanos (Giono y cols. 2006, Torres y cols. 2006^{44, 138}).

3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo para adquirir la infección por *H. pylori* los podemos dividir como del hospedero, de la bacteria, y cofactores ambientales. La presencia de enfermedades gastroduodenales asociadas a este patógeno, son el resultado de la interacción compleja entre las características individuales del humano (respuesta inmune) y factores de virulencia de la bacteria (sección 8), la combinación de estos puede explicar las discrepancias entre los niveles de prevalencia de infección entre los países desarrollados y subdesarrollados (Azevedo y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{7,138}).

Factores del hospedero

Dentro de los factores del hospedero debemos considerar los siguientes: nacer en países en vías de desarrollo, estatus socioeconómico bajo, vivir en situaciones de hacinamiento e insalubres; comer alimentos y beber agua en malas condiciones sanitarias, indicadores de higiene deficiente durante la infancia, ausencia de agua corriente y exposición al contenido gástrico de personas infectadas (Azevedo y cols. 2006, Cervantes, 2006, Giono y cols. 2006, González y cols. 2004, Rafols y cols. 2000, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006^{7, 20, 44,47,111,113, 137}).

Rutas o vías de transmisión de la infección por *H.pylori*

Numerosos estudios epidemiológicos y microbiológicos han conducido a la identificación de factores que influyen en la transmisión de este patógeno. El nivel socioeconómico es claramente el factor determinante más importante para el desarrollo de la infección por *H. pylori*, el nivel socioeconómico bajo exhibe prevalencia alta (Azevedo y cols. 2006⁷).

La transmisión de *H. pylori* tiene lugar de persona a persona es la ruta más común de infección, por medio de las vías oral-oral y fecal-oral, un modo importante de diseminación es la vía gastro-oral, recientemente se han considerado otras posibles vías de transmisión, las cuales es importante

considerarlas, al realizar medidas de prevención para la disminución de la infección por este microorganismo (Azevedo y cols. 2006, Cervantes. 2006, Giono, y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006^{7, 20,44, 47, 113, 137}).

Transmisión Gastro-oral

En estudios epidemiológicos recientes se encontró que la exposición a una infección de un miembro de la familia con gastroenteritis y episodio de vómitos se asocia con 6.3 incremento de riesgo de una nueva infección, porque los episodios de vómito podrían causar la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral. (Azevedo y cols. 2006, Cervantes, 2006, Giono, y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006^{7, 20,44, 47, 113, 137}).

Transmisión Oral-oral

La cavidad oral es un reservorio temporal para la subsistencia de *H. pylori*. Se sugiere que ocurre con los besos, contacto con saliva infectada. Cepas idénticas de este patógeno han sido detectadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la boca y estomago de personas sintomáticas infectadas. Además estos estudios indican que la cavidad oral no es un sitio de colonización prolongada de *H. pylori* en poblaciones con alta prevalencia de la infección cuando la persona esta asintomática y concluyen que la colonización de la boca es solamente transitoria y ocurre después del vómito (Azevedo y cols. 2006, Cervantes, 2006, Giono, y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos. y cols. 2005, Tierney y cols. 2006^{7, 20,44, 47, 113, 137}).

Transmisión Fecal Oral

Existen estudios epidemiológicos que sustentan que este modo de transmisión es menos común que gastro-oral y oral-oral, se observan cuando existe exposición con un familiar infectado con diarrea, pero no es significativamente un riesgo para una nueva infección. Sin embargo, el hecho de que *H. pylori* sea capaz de colonizar el duodeno (parte superior del intestino delgado), en áreas de metaplasia gástrica, ocasionan preguntas en relación al efecto exacto del tránsito del microorganismo a través del intestino. Se ha identificado la presencia de este patógeno mediante métodos basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e Inmunoensayos Ligados a Enzima (ELISA) (Azevedo N. y cols. 2006, Cervantes E. 2006, Giono, y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006^{7, 20,44, 47, 113, 137}).

Transmisión de a través de la Lactancia

La detección de *H. pylori* por PCR en leche materna, por lo cual se podría considerar, el amamantamiento como ruta de transmisión. La contaminación de la leche podría ser posible si la bacteria sobreviviera en los dedos o el pezón. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación entre el amamantamiento y la

adquisición de *H. pylori*. Otros estudios indican que sigue habiendo supervivencia de *H. pylori* cultivable en leche comercial pasteurizada por 5 días a 4°C. Este largo tiempo de supervivencia esta relacionado con las bajas temperaturas (Azevedo. y cols. 2006 ⁷).

Transmisión Iatrogénica

Algunos estudios epidemiológicos sugieren que la infección de *H. pylori* en pacientes sometidos a endoscopia podría ser una vía de transmisión iatrogénica, pero en estudios de seguimientos de estos pacientes demuestran que este grupo podría adquirir la infección por la vía gastro-oral y no directamente por el contacto con endoscopios. Debido a que los procedimientos de desinfección reducen o eliminan el riesgo transmisión por este microorganismo. Se estima que la frecuencia de transmisión es de aproximadamente 4 pacientes por 1000 endoscopias, cuando el índice de infección en los pacientes que acuden para la realización de este estudio es del 60% aproximadamente (Azevedo y cols. 2006, Buckley y cols. 1998 ^{7, 16}).

Además de los mecanismos de transmisión mencionados, son incluidos por lo menos tres posibles vectores que sugieren que sostienen la forma viable de esta bacteria: agua, los alimentos y los animales (Azevedo y cols. 2006, Linz y cols. 2007 ^{7, 72}).

Transmisión Zoonótica

Se incluye al contacto con animales como posible modo de transmisión, representa una de las causas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial. Los vectores incluyen vacas, ovejas (consumo de leche cruda o contacto con heces del suelo), cucarachas (contaminación de alimentos), moscas y animales domésticos. Recientemente se ha identificado *H. pylori* en bilis de gatos mediante PCR (Azevedo y cols. 2006, Buckley, 1998, Kasper y cols. 2005, Linz y cols. 2007 ^{7, 16, 65, 72}).

Ingestión de agua

En cuanto a la posible fuente ambiental la más importante de las propuestas es el agua (García, 2003). Debido a que se ha encontrado *H. pylori* en agua para consumo humano. Sin embargo, se ha encontrado que son bajos los niveles de adaptación de la bacteria a este ambiente. Se ha observado que la prevalencia disminuye en niveles socioeconómicos medio y alto, al mejorar las condiciones higiénico-sanitarias del medio. Además se ha intentado demostrar que *H. pylori* cocoide en agua (forma bacteriana viable no cultivable, "VBNC"), es capaz de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis en el ratón (Azevedo y cols. 2006, Cervantes 2006, Giono. y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006 ^{7, 20, 44, 47, 113, 137}).

Ingestión de alimentos

También se consideran factores de riesgo para adquirir la infección el consumo de vegetales crudos irrigados o lavados con aguas contaminadas o no tratadas. En relación al consumo de leche existen muestras en México una relación entre el consumo de productos lácteos y la infección por este patógeno, por el contrario en Italia reportan una relación inversa entre el elevado consumo de leche y la prevalencia de *H. pylori*. Esta diferencia puede reflejar la variable de calidad microbiológica de la leche en ambos países. Se ha observado un incremento de riesgo de esta neoplasia, en pacientes con niveles bajos de cobalamina asociados a gastritis crónica atrófica que precede al cáncer gástrico. Además existen cofactores ambientales como el tabaquismo, el cual aumenta el riesgo de úlceras y cáncer gástrico. La abundancia de sal y conservas aumentan el riesgo de cáncer mientras que una alimentación rica en antioxidantes y vitamina C es protectora. Por otro lado, la microbiota presente en el yogurt, como *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, han mostrado inhibir la supervivencia de *H. pylori*, (Azevedo y cols. 2006, Cervantes, 2006, Giono y cols. 2006, González y cols. 2004, Ramírez-Ramos y cols. 2005, Tierney y cols. 2006, Vollset y cols. 2007^{7, 20, 44, 47, 113, 137, 143}).

En relación al consumo alto de sal en la dieta e infección por *H. pylori*, existen estudios epidemiológicos muestran aumento de enfermedades gástricas. Además de estudios *in vitro*, en los cuales se han estudiado los cambios temporales de esta bacteria en respuesta a la concentración de cloruro de sodio observándose que el crecimiento, la morfología celular, supervivencia y la expresión de los factores de virulencia se alteran por el incremento en la concentración de sal (Gancz, y cols. 2008⁴⁰).

La mayor parte de las infecciones son quizá las adquiridas en la infancia. Es raro adquirir o perder la bacteria durante la madurez. Fuera de la edad, el principal factor de riesgo es el nivel socioeconómico bajo. Se ha identificado la infección de miembros de la familia como un factor de riesgo para la transmisión de *H. pylori*. Debido a que se ha encontrado homología en el genoma de *H. pylori* en miembros de la misma familia (Azevedo y cols. 2006, Morales y cols. 2003, Tierney y cols. 2006^{7, 85, 137}).

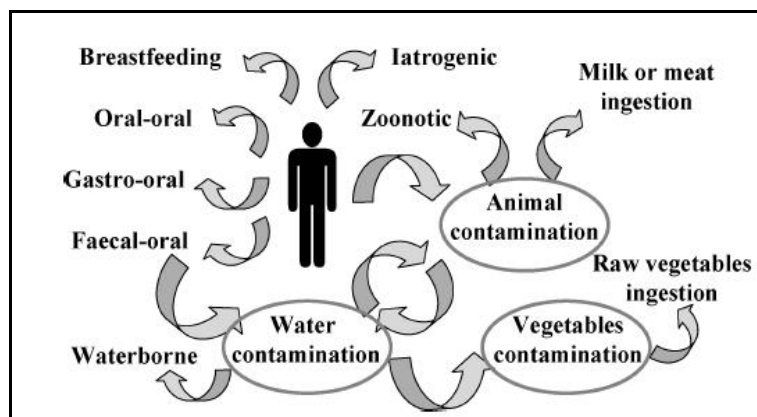


Figura 1. Factores que intervienen en la infección por *H. pylori* (Azevedo y cols. 2006 ⁷).

Factores Genéticos

Estudios realizados en la población japonesa sugieren que los alelos *0102 y *0301 del gen HLA DQA1 pueden ser importantes para determinar lo anteriormente mencionado. En la población mexicana se ha encontrado asociación entre el alelo HLA-DQB1*0401 y la infección por *H. pylori*, así como efecto protector del alelo HLA-DQA*0503 para carcinoma y lesiones premalignas. Otro grupo en México encontró asociación entre el alelo HLA-DQB1*0501 y el carcinoma gástrico de tipo difuso (Abdo y cols. 2007, Araújo y cols. 2006, Buckley y cols. 1998, Kasper y cols. 2005 ^{1, 4, 16, 65}).

4. Taxonomía

La comparación de las secuencias de los ácido ribonucleico ribosomal o rARN 16S (o de los genes que codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los microorganismos procariotas, debido a que es una molécula antigua presente en todas las bacterias con estructura y función altamente conservada. Esto ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar a un sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. En microbiología clínica la identificación molecular basada en este estudio se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas, hecho que en ocasiones ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos, bacterias fastidiosas, a consecuencia de sus requerimientos nutricionales y de crecimiento lento, que retrasa considerablemente la identificación convencional (Rodicio y cols. 2004 ¹²¹).

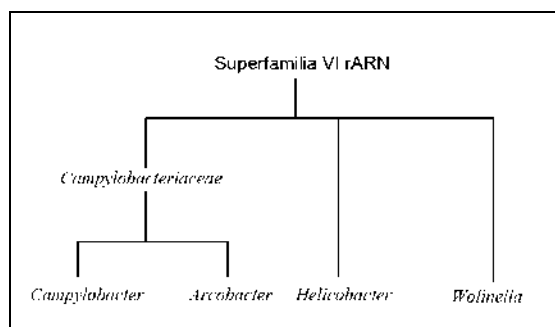


Figura 2. Composición de Superfamilia VI de rARN. (Buckley y cols. 1998 ¹⁶).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *H. pylori*.

Reino	Bacteria
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Epsilon Proteobacteria</i>
Orden	<i>Campylobacterales</i>
Familia	<i>Helicobacteraceae</i>
Género	<i>Helicobacter</i>
Especie	<i>pylori</i>
Nombre binomial	<i>Helicobacter pylori</i>

Referencia: Giono y cols. 1994 ⁴⁴.

En la actualidad han sido descritas al menos 24 especies de *Helicobacter* en forma válida y 35 o más *Helicobacter* nuevos que esperan ser formalmente nombrados (García y cols. 2003, Cervantes, 2006, Kuster y cols. 2006 ^{41, 20, 68}).

Una manera útil y práctica de agrupar las especies de *Helicobacter* es hacerlo teniendo en cuenta el nicho que ocupa. Así tradicionalmente se han distinguido especies de *Helicobacter* gástricas o enterohepáticas. Ambos grupos demuestran altos niveles de ser órgano-específicos (García y cols. 2003, Kuster y cols. 2006 ^{41,68}).

Tabla 2. Resumen las especies de *Helicobacter* y el sitio localización.

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

Referencia: Giono S. y cols. 1994⁴⁴.

5. Morfología

H. pylori es un bacilo gram-negativo, curvo, espiralado, morfología heterogénea, es un microorganismo altamente pleomórfico (helicoidal, espiral o curva, bastón o de S, S doble, cultivos envejecidos tiende a presentar forma cocoide), microaerófilico (5% de O₂, 10% de CO₂, 85 % de N₂), que mide de 1.5 a 10 µm por 0.5 por 1 µm de ancho, posee flagelos unipolares (número varía de 1 a 8) que le dan la movilidad, estos se caracterizan por tener una vaina de estructura lipídica exactamente igual a la de la membrana externa, y parece que su misión es la de proteger a los flagelos de su degradación por el medio ácido, puede adoptar 3 formas (adherente, libre e intercelular), en ocasiones entremezcladas que se pueden observar en las tinciones histológicas (Aguilar y cols. 2004, García y cols. 2003, Giono y cols. 1994, Giono y cols. 2008, Henry y cols. 2007, Kasper y cols. 2005, Mandado y cols. 2003, Martínez y Martínez 2002, Navarro-Hernández y cols. 2007, Paredes, y cols. 2007, Rollán, 1994, Walz y cols. 2005, Tsutsumi y cols. 2006, William y cols. 2008^{3, 41,44, 45, 57, 65, 78, 80, 92, 104, 123,140,148}).

Se ha reportado que presentan cambios en la morfología microscópica a las 24-48 horas de cultivo se observan de manera dominante los bacilos cortos, espirales y filamentosos de manera aislada, mismos que a las 72-96 horas son reemplazados por las formas en U y coccoides, algunas con pérdida de la viabilidad, estas últimas consideradas como “formas bacterianas viables pero no

cultivables de *H. pylori*". También se considera que esta morfología bacteriana es una forma de resistencia capaz de soportar las condiciones adversas y que podría ser reversible a la estructura en espiral cuando se recuperan las condiciones óptimas para su crecimiento (Parlapianno y cols. 2006, William y cols. 2008 ^{105,148}).

Por otro lado, se sabe que las formas de cocoides y espirales de *H. pylori*, presentan diferentes afinidades por receptores para carbohidratos la superficie celular que están relacionadas con la variación en las propiedades adhesivas del microorganismo a las células de la mucosa antral del estómago. Esto se asocia con diferentes estrategias usadas por las dos diferentes formas de *H. pylori* en la colonización del tejido gastroduodenal, dando como resultado diferentes manifestaciones clínicas de enfermedad como aguda o crónicas, gastritis o úlcera (Khin y cols. 2000 ⁶⁷).

Macroscópicamente las colonias son pequeñas, grises o translúcidas, algunos autores las describen como "gotas de rocío". Su característica bioquímica más importante la producción de ureasa, además produce oxidasa y catalasa. Otras bacterias productoras de ureasa que debido a que tienen una amplia especificidad algunas veces habitan en el humano son *H. heimannii* o *bizzozzeroni* y *H. felis*. (Aguilar y cols. 2004, García y cols. 2003, Giono y cols. 1994, Giono y cols. 2008, Henry y cols. 2007, Kasper y cols. 2005, Mandado y cols. 2003, Martínez y Martínez 2002, Navarro-Hernández y cols. 2007, Paredes y cols. 2007, Rollán, 1994, Walz y cols. 2005, Tsutsumi y cols. 2006, William y cols. 2008 ^{3, 41,44, 45, 57, 65, 78, 80, 92, 104, 123,140,148}).

Tabla 3. Características Morfológicas.

Tamaño	Coloración	Referencia
1-2 mm de diámetro.	Colonias Translúcidas	Brooks y cols. (2004), Giono y cols. (1994) , Fox y cols (1989).
	Colonias pequeñas, grises o translúcidas, como "gotas de rocío"	Henry y cols. (2007), Navarro y cols. (2007)
Menores a 1 mm*	Colonias pequeñas translúcidas, lisas* y brillantes	Buckley, (1998),*Kuster y cols. (2006), Quiroga y cols. (2005)
	Colonias pequeñas, doradas debido al uso de indicador (2,3 difenil tetrazolium)	Parlapianno y cols. (2006).

6. Estructura

Tabla 4. Características Estructurales

Mucosa Gástrica	Cultivo	Tamaño	Número de Flagelos	Referencia
Espiral en forma de sacacorchos	Menos espiral	0.5 a 1.0 μm de ancho y de 3 μm de largo	4 a 8 flagelos polares	López-Brea y cols. (2004)
	Forma de S doble. Coloración Gram positiva o negativa de acuerdo al grosor del moco	0.5-1 grosor μm , 2.5-4 μm largo.	4-6 flagelos. (no se observan microscopio óptico).	Mandado y cols. (2003)
	Bacilo Gram negativo cuya forma característica es en "ala de gaviota" o en forma de "s".			Giono y cols. (2008)
Leucocitos y bacterias curvas sobre el epitelio y criptas gástricas	Microorganismo Gram-negativo, pleomórfico (formas S, curvas y cocoides en cultivos viejos).	Mide 4-6 μm de largo. 0.5-1.0 μm de ancho.	4-6 flagelos lofótrofos unipolares con terminación en bulbo. Superficie es lisa.	Giono y cols. (1994)
	Microorganismo fastidioso, Gram-negativo, bacilos curvos* y espiral.	2.5- 5 μm de largo. 0.5-1.0 μm de ancho.	Flagelos lofótrofos unipolares con terminación en bulbo.	Fox y cols 1989, Chilihua y cols. (2003)
	Espiral*	2.5 a 5 μm	4 a 8 flagelos Unipolares	*Mohar, (2002), Navarro y cols. (2007), *Rollán, (1994).
	Forma espiral	2 μm		Aguilar y cols. (2004)
	Morfología espiral, en subcultivos formas cocoides.	Largo: 3 μm Ancho: 2,5 a 5 μm ,	4 a 6 flagelos	Buckley, y cols. (1998).
	Bacilos curvados o en espiral. No esporulados. Móviles.	Largo: 1.5-10 μm . Ancho: 0.3-1.0 μm		Henry y cols. (2007).
	Bacilos largos, curvos o espirales.		Flagelado*	*Kasper y cols. (2005), Quiroga y cols. (2005).

	Usualmente es espiral. Presentar formas rectas y cocoides (forma viable no cultivable) en cultivos prolongados o por tratamiento con antibióticos.	Largo: 2-4 μm , Ancho: 0.5-1 μm	2 a 6 flagelos unipolares	Kuster y cols. (2006).
	Helicoidal, curvo, de bordes redondeados.	Largo: 2.5 a 4.5 μm . Ancho: 0.5 a 1 μm ,	1 a 8 flagelos polares envainados con estructura terminal en bulbo(motilidad)	Gené y cols. (2002)

7. Genoma y plásmidos

En 1997, se describió la secuencia completa del genoma de *H. pylori*, mediante secuenciación al azar. El tamaño de las dos secuencias del genoma de esta bacteria es de aproximadamente 1.7 Mpb, que contiene de 35 a 40% de G+C. (Guanina-Citocina). El genoma de la cepa 26695 incluye 1,587 genes, mientras que el de la cepa J99 solamente incluye 1,491. Ambos genomas contienen dos copias de genes 16S, 23S, y 5S rRNA. Muchas cepas (40% de aislamientos) contienen uno o más plásmidos, con un tamaño que oscila entre 1.5 y 23.3 kb, los cuales no parecen transmitir resistencia a antibióticos o genes de virulencia. Algunos de estos plásmidos son básicos vectores en experimentos de clonación molecular (Buckley y cols. 1998, Kuster y cols. 2006^{16, 68}).

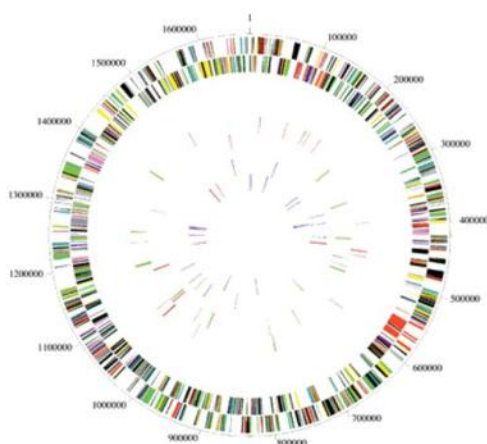


Figura 3. Representación circular del cromosoma de *Helicobacter pylori* 26695 (Buckley y cols. 1998¹⁶).

Recientemente se describió el genoma para cepa G27, el cual consiste en un cromosoma circular, formado por 10,032-pb, rico en AT (Adenina-Timina en un 61.1%), contiene 1,515 secuencias ORFs (*Open Reading Frames*), de tamaño y composición similares a las cepas descritas anteriormente y plásmidos que

codifican para 11 genes. Además, esta constituido por 58 genes diferentes a las cepas 26695 y J99, que hipotéticamente codifican para proteínas (Baltrus y cols. 2009 ¹⁰).

A diferencia de otros microorganismos *H. pylori* es genéticamente heterogéneo, lo cual le permite adaptarse a las condiciones gástricas del huésped, como a distintos patrones de respuesta inmune que median el proceso infeccioso. Tiene un contenido aberrante de G+C (Guanosina+Citocina) que con frecuencia llevan genes involucrados con la virulencia. Como Cag-PAI y además otras regiones de plasticidad que pueden estar implicadas en la patogénesis de la infección por esta bacteria. Además de los genes de virulencia, como *sabA*, *sabB*, *hopZ* y *oipA* genes que codifican para proteínas de membrana, ocasionando variación fenotípica, en la biosíntesis de enzimas que participan en la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS), (Forné y cols. 2001, Kuster y cols. 2006 ^{37, 68}).

El genoma de *H. pylori* consta de más de 1000 genes conservados y genes específicos de ciertas cepas. Esta bacteria puede adquirir o perder DNA exógeno, consiguiendo así un modelo de microevolución continua, permitiendo una gran variabilidad genética que puede generar cepas adaptadas a multitud de ambientes adversos. Tal variabilidad esta provocada también por una alta tasa de recombinación durante la colonización de especies de esta bacteria no relacionadas en un mismo huésped (Olivares y cols. 2006 ¹⁰⁰).

Las cepas de *H. pylori* en diferentes áreas geográficas están asociadas con la diferenciación filogenética, la edad en asociación entre esta bacteria y los humanos es altamente controversial. Se ha observado que la diversidad genética en *H. pylori* disminuye con la distancia del este de Africa ya que el polimorfismo bacteriano refleja la migración e historia geográfica humana, además de la frecuente transmisión horizontal de este microorganismo entre los distintos grupos étnicos (Higashi y cols. 2002, Linz y cols. 2007 ^{59, 73}).

H. pylori presenta población panmítica en equilibrio que se selecciona y exhibe niveles de diversidad genética altos entre aislados clínicos que se producen por la recombinación e intercambio horizontal de genes. Las infecciones mixtas pueden ser transitorias, hay intercambios genéticos frecuentes. La diversidad de secuencias en *H. pylori* puede reflejar una alta tasa de mutaciones (Giono y cols. 2008, Olivares y cols. 2006 ^{46, 100}).

En México, estudios realizados por Giono S. y colaboradores en el 2008, reportan que existe un mayor porcentaje de polimorfismos en los tres genes asociados a virulencia, *cagA*, *babA* y *oipA* que el observado en otras cepas de origen occidental (Giono y cols. 2006, Giono y cols. 2008 ^{44, 46}).

Las cepas con genes *VacA*, *cagA*+ y *babA* se usan para definir los polimorfismos, tienen una distribución geográfica particular y presentan huellas genéticas que distinguen a las cepas de *H. pylori* en “Asiáticas” y “No Asiáticas”.

La separación geográfica pueden ser resultado de polimorfismos de genes asociados a virulencia y la fijación de mutaciones en distintas áreas (Giono y cols. 2006 ⁴⁴).

Dentro del genoma se han identificado ciertas regiones con alto número de repeticiones de un mismo nucleótido o de una pareja de ellos, estando algunas de estas dentro de las secuencias ORFs (*Open Reading Frames*), que corresponden a posibles promotores de genes. El falta de apareamiento entre los nucleótidos al desplazarse una de las hebras de de DNA sobre las otras es un fenómeno que provoca la “ganancia o pérdida” de una unidad en la pauta de lectura en el proceso de transcripción, de modo que puede resultar la pérdida del codón de inicio o en mutaciones en las proteínas y por lo anterior es un factor de variabilidad genética de *H. pylori* (*Slipped-strand mispairing*). También se han identificado “genes de fase variable”, que son varios genes que codifican para enzimas que intervienen en la biosíntesis de LPS, para proteínas de membrana o algunos otros tipos (*cagA*), pudiendo producir variantes distintas del producto génico en una misma población bacteriana (Olivares y cols. 2006, Salama y cols. 2007 ^{99,128}).

8. Características Estructurales

La pared celular de los organismos procariotas es una estructura rígida que mantiene la forma característica de cada célula bacteriana. Dependiendo de las especies y de las condiciones de cultivo, la pared celular puede suponer desde el 10% al 40% del peso seco de la célula (Hancock, 1991 ⁵³).

Esta estructura esta formada por distintas capas que varían según el tipo de bacteria, existiendo diferencias tanto en su grosor como composición. Estas diferencias se utilizan para identificar y clasificar las bacterias, así como diferenciarlas mediante la tinción de Gram (Hancock, 1991 ⁵³).

La pared celular de las bacterias Gram (-) es más delgada (10 - 15 nm) que la de las Gram (+) (20 - 25 nm). Contiene dos capas, una membrana externa y una capa de peptidoglucano, este constituido a su vez por N-acetilglucosamina (NAG), Acido N-Acetilmurámico (NAM) y un péptido de 4 aminoácidos o tetrapéptido, algunos de los cuales son D-aminoácidos. El espacio que existe entre la membrana citoplasmática y la membrana externa se denomina espacio periplásmico. La capa característica de las Gram (-) es la membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias. Su estructura básica es una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos y proteínas (capa externa). Esta bicapa está unida al peptidoglucano a través de lipoproteínas. De todos estos componentes, los lipopolisacáridos (LPS) son característicos de las bacterias Gram (-) y sólo se encuentran en la membrana externa (Hancock, 1991, Heijenoort, 2001 ^{53,55}).

Los lipopolisacaridos (LPS) están compuestos de tres partes unidas covalentemente: Primero se localiza un lípido A, en la parte interna; compuesto

por un disacárido de glucosamina fosforilada con ácidos grasos de cadena larga. Posteriormente se localiza un Núcleo polisacárido, localizado en la superficie de la membrana; compuesto por azúcares y KDO (ketodeoxioctónico). Por último un antígeno O, localizado fuera de la membrana; compuesto por polisacáridos que contienen azúcares comunes como galactosa (Hancock, 1991, Kuster y cols. 2006^{53,68}).

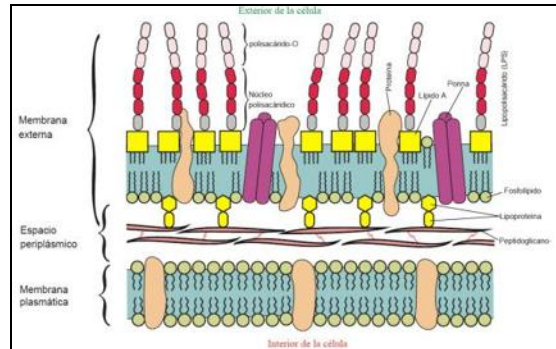


Figura 4. Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas (http://microbiol.udc.es/microgen/images/Pared_bact.pdf).

H. pylori debe tener mecanismos que aseguren la persistencia por largos periodos de tiempo en el estómago de pacientes. Un posible mecanismo para asegurar la evasión de la respuesta inmune es el mimetismo antigénico. Esta bacteria se caracteriza por la expresión de fucosil-transferasas, las cuales permiten la síntesis de antígenos Lewis (Le) (Muñoz y cols. 2001⁸⁷).

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* expresa antígenos de Le tipo 2, Le^x, Le^y, aunque algunas cepas pueden expresar también Le^a, Le^b. Por otra parte, se considera que aproximadamente el 80% de cepas de esta bacteria expresan Le. Lo anterior sugiere que el fenotipo Le del hospedero ejerce una presión selectiva para las cepas de este microorganismo similares a la expresión de antígenos Lewis (Muñoz y cols. 2001⁸⁷).

Se ha reportado que las clonas de niños (55.4%) expresan con mayor frecuencia Le^x, que en adultos (33%). Esto sugiere que *H. pylori* Le^x podrían tener una baja regulación en la respuesta de linfocitos T, disminuyendo la eliminación de la infección por el hospedero. Expresando Le^x durante la fase temprana de colonización (durante la infancia), esta bacteria podría no solo inhibir la respuesta inmune si no la eliminación de la infección, esta expresión disminuye con la edad. En adultos existe mayor expresión de Le^y que en niños (81.6% y 66% respectivamente). Por lo que se observa, alta heterogenicidad, y diversidad fenotípica que podría explicar parcialmente la variación en LPS de *H. pylori* (Muñoz y cols. 2001⁸⁷).

El antígeno Lewis guarda correlación con la cepas de *H. pylori* en que la cadena O lateral del lipopolisacárido de *H. pylori* NCTC 11637 es similar al Lewis^x, la bacteria M019 es similar a Lewis^y y la bacteria P466 similar al Lewis^{xy}. El grupo sanguíneo Lewis b (Le^b) regula la unión con la mucosa gástrica humana. Las glicoproteínas que presentan el antígeno Le^b o los antígenos contra el Le^b inhiben la unión de las bacterias. Los tejidos gástricos que carecen de la expresión Le^b no unen al *H. pylori*. Además esta reportada la correlación entre el tipo sanguíneo y la infección, ya que la bacteria no une al antígeno Le^b sustituido con un residuo GalNAc α 1-3 (determinante del grupo sanguíneo A), lo que sugiere que la infección por *H. pylori* puede reducirse en individuos de tipo sanguíneo A o B en comparación con los individuos de tipo sanguíneo O. Así se sabe que las úlceras pépticas son más frecuentes en tipos sanguíneos O y el cáncer gástrico es más frecuente en tipos sanguíneos A (Boren y cols. 1993¹⁴).

El componente hemaglutinante de *Helicobacter pylori* contiene proteínas que reconocen al carbohidrato NeuAc 2-3-Gal. Estas son lectinas (adhesinas) y se han identificado dos de diferentes pesos que son 20-25 kDa y 57 kDa, a las que se les llamó sHA. La adhesina que une al grupo sanguíneo Lewis tipo B (Bab A de blood antigen binding adhesin) y la adhesina que une al ácido siálico (sab A sialic acid binding adhesin). Las cuales reconocen residuos de carbohidratos específicos del epitelio gástrico Lewis^b (Le^b) y el antígeno sialil Lewis x (Le^x) respectivamente, que promueve el proceso de infección y de inflamación en el tracto gastroduodenal (Boren F. y cols. 1993, Cava F. y Cobas G. 2003, Lee S. y cols. 2006 Petterson, 2006, Rivas, 2000^{14,19,71,108,117}). Estas hemaglutininas específicas de ácido siálico retrasan la adhesión e ingestión de *Helicobacter pylori*. Además la expresión de antígenos de Lewis en la superficie de esta bacteria le permite mimetizarse entre los antígenos de la mucosa gástrica (Cava y Cobas, 2003¹⁹).

Otro mecanismo potencial de evasión inmune exhibido por *Helicobacter pylori* puede ser la modificación de morfología bacteriana. Las formas bacilares se convierten en cocoides después de cultivos prolongados (Cava, 2003¹⁹). Esto podría influenciar la capacidad de adherencia y colonización por *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica dando como resultado diferente patología gastroduodenal (Khin y cols. 2000⁶⁶).

Helicobacter pylori es capaz de aglutinar eritrocitos debido a su interacción con glucosaminas de grupos sanguíneos, algunos de los cuales también expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica una función adherente. Las bacterias reconocen estructuras fucosilada y glicoproteínas. La capacidad de tales receptores fucosilados es reducida en los grupos sanguíneos A y B comparados con los grupos sanguíneos O, explicando el alto riesgo de úlcera péptica en individuos de grupo O (Cava y Cobas G, 2003, Rivas y Hernández y col. 2000^{19,117}).

Muchas proteínas periplasmáticas de los patógenos Gram-negativos pueden contener dos o más residuos debido a la formación de puentes disulfuro, los cuales estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria de la cadena

polipeptídica. Este proceso está facilitado por una familia de proteínas (Dsb). Actualmente se conocen cinco proteínas (DsbA, B, C, D, G). En base a estas características filogenéticas, *H. pylori* pertenece es considerada una ξ -proteobacteria (Raczko y cols. 2005¹¹⁰).

H. pylori está estrechamente relacionada con *Campylobacter*, y de hecho en las primeras descripciones fue denominada como tal. Sin embargo, su morfología, patrón de ácidos grasos y características genotípicas son diferentes. En 1985, se describió que la composición fundamental en ácidos grasos de esta bacteria la formaban el ácido tetradecanoico (14:0), en más del 35%, y el ácido 19-C ciclopropeno, siendo muy baja la proporción en ácido hexadecanoico (16:0). Además, *H. pylori* es el único microorganismo que posee el ácido 3-hidroxiotetradecanoico. Este perfil de ácidos grasos es muy característico y al mismo tiempo diferencia a este microorganismo del resto de las bacterias pertenecientes al género de *Campylobacter*, lo cual llevó, a crear el nuevo género *Helicobacter* (Forné y cols. 2001, Goodwin, 1989^{36,48}).

El conocimiento del genoma de *H. pylori* ha sido de gran utilidad en la identificación de enzimas que participan en la biosíntesis de los lipopolisacáridos (Forné y cols. 2001³⁶).

Otro de los blancos para el diagnóstico de *H. pylori* es mediante la utilización de PCR a partir de la secuencia nucleotídica de un gen de una proteína de membrana externa OMP22 en muestras de biopsias gástricas, saliva, heces y entre otras muestras (Huguet y col, 2002⁶²).

9. Factores de Virulencia

Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Existen factores genéticos que predisponen al paciente, como el grupo sanguíneo, el tipo de antígeno Lewis o el tipo de HLA. También existen factores ambientales como las condiciones socioeconómicas, el consumo de tabaco o la dieta (la ingestión de sal actúa como factor agresivo de la mucosa mientras que el consumo de alimentos anti-oxidantes actúa como factor protector), que pueden influir en el desarrollo de un tipo u otro de enfermedad. Por otro lado, los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad (Abdo y cols. 2007, Baquero y cols. 2004, Kasper y cols. 2005^{1,10,65}).

Hay varios factores de patogenicidad que se han relacionado con la agresividad del germen, algunos contribuyen a los efectos patógenos de la bacteria y otros le permiten colonizar y permanecer dentro del huésped y por tanto, implicados en el daño endotelial, tales como la citotoxina vacuolizante (VacA), el gen asociado a citotoxina A (cagA), el lipopolisacárido (LPS), de superficie, la ureasa bacteriana, los flagelos, las adhesinas de superficie, radicales

oxidantes o las citocinas producidos por los leucocitos en respuesta a su infección. Las características más importantes de los mismos se mencionan a continuación (Buckley, 1998, Olivares y cols. 2006^{16,99}).

➤ *Lipopolisacárido (LPS)*

Es una de las moléculas de unión implicada en la interacción entre la bacteria y el huésped, esta compuesto por tres partes: el lípido A es el componente responsable de las propiedades inmunológicas y endotóxicas del LPS. , la región antigénica-O polisacárida (se une a β -galactosidasa y galectina 3) y el núcleo polisacárido que conecta con las otras dos. El LPS de esta bacteria presenta baja toxicidad comparada con la de *Salmonella* o *E. coli*, esto puede ocasionar baja actividad inmunológica que contribuya a la prolongación de la infección y a la inflamación crónica de la mucosa gástrica (García y cols. 2003, Hatakeyama y cols. 2006, Kuster y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{41,54,68,99,138}).

La estructura antigénica de LPS es similar a los antígenos de grupo sanguíneo de Lewis^x y Lewis^y del huésped, lo que puede explicar la presencia de autoanticuerpos inducidos por *H. pylori*, que contribuirían al desarrollo de la gastritis atrófica. Estos se expresan más frecuentemente en cepas obtenidas de pacientes con úlcera duodenal y se asocian a cepas cagA⁺ y vacA⁺, lo que estimularía una respuesta inmune más intensa en las bacterias que expresan estos genes. Se sabe que la delección del gen CagA reduce la expresión de Lewis^y. Por lo que LPS juega un papel importante en camuflar la bacteria de la respuesta inmune, por lo que puede permanecer en forma crónica en el estómago sin ser eliminado por la respuesta inflamatoria (García y cols. 2003, Kuster y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{41,68,99,138}).

➤ *Ureasa*

Es la enzima más abundante producida por todas las cepas de *Helicobacter pylori*, participa en la colonización del bacilo en el epitelio gástrico. Se encuentra localizada tanto en el citosol como en la superficie. Esta codificada por un conjunto de genes (*ure*) su función principal es la de proteger a la bacteria frente al pH ácido, mediante la neutralización del medio convirtiendo la urea gástrica en amonio (NH₄⁺) y dióxido de carbono (CO₂), el amonio neutraliza el HCL y permite a esta bacteria colonizar el tracto digestivo, por lo que su concentración es mayor en sujetos infectados. En el intestino presenta efectos tóxicos como alteraciones de la síntesis de DNA, incrementando el riesgo de infecciones virales y carcinogénesis. Esta enzima permite que la bacteria pueda utilizar el nitrógeno proveniente de la urea. Es un poderoso inmunógeno y debido a su participación en la patogenicidad de la bacteria, se ha convertido en un candidato aceptable para vacuna. (García y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Olivares y cols. 2006^{41,43,99}).

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) regulan la respuesta inmune a través de la presentación de antígenos a las células

T CD4. Se sabe que *H. pylori* a través de la ureasa se une a las MHC II y posteriormente existe un incremento en la apoptosis de las células gástricas (Kasper y cols. 2005, Olivares y cols. 2006^{65,99}).

➤ *Fosfolipasas*

H. pylori posee actividad de fosfolipasa A2, que degrada los componentes lipídicos de la mucosa que le proporcionan integridad, retrasando la difusión de H⁺. Posee enzimas con actividad proteolítica que rompen la capa de mucina que recubren las células gástricas y enzimas antioxidantes que protegen a la bacteria del ataque defensivo del organismo. Estas son la catalasa y superóxido dismutasa (García y cols. 2003, Gené y cols. 2002^{41,42}).

➤ *Citotoxina vacuolizante VacA*

Es una proteína hexamérica de 87 a 95 kD, que se inserta en la membrana celular (capa lipídica) del epitelio favorecida por el pH ácido y forma canales selectivos dependientes de voltaje, a través de los cuales se libera bicarbonato y aniones orgánicos, que proveen nutrientes a la bacteria. Posteriormente se trasloca al citosol, donde interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas, pudiendo volver a formar un canal iónico en membranas endosomales y producir la formación de vacuolas en el citoplasma de las células eucariotas. Además, daña la membrana mitocondrial causando liberación de citocromo C e induciendo apoptosis, se ha propuesto que proceso puede estar también relacionado con la activación del receptor Fas/CD95 a través de la activación de las caspasas 3 y 8. Codifica para el gen *vacA*, que esta presente en todas las cepas aunque sólo aproximadamente del 50% al 65% de ellas producen la proteína citotóxica (Fig. 5) (Abdo y cols. 2007, García y cols. 2003, Kuster y cols. 2006, Matteo y cols. 2007, Olivares y cols. 2006^{1,41,68,81,99}).

Por otra parte, la toxina codificada por el gen *vacA* induce la formación de vacuolas en células epiteliales *in vitro* y causa daño epitelial y ulceración en modelos en ratones. El análisis de múltiples cepas indica que todas poseen un tipo de secuencia señal *s1* (subtipos *s1a* ó *s1b*) o *s2* y un tipo de región media o central (*m1* o *m2*). En particular el alelo *s1a* se ha relacionado con inflamación y úlcera; mientras que el alelo *m1* se ha asociado con daño a las células epiteliales. La vacuolización y las manifestaciones clínicas más severas se asocian con combinaciones alélicas particulares: la presencia de los alelos *s1a* y *m1* está relacionada con mayores niveles de actividad vacuolizante que la de los alelos *s1b* ó *s2* y *m2*. Recientemente se sugirió que el gen *iceA*, expresado diferencialmente cuando la bacteria se pone en contacto con células epiteliales, podría ser usado como marcador de virulencia, pues se encontró una alta frecuencia del alelo *iceA1* en cepas aisladas de pacientes con úlcera duodenal (Abdo y cols. 2007, Citty y cols. 2002, Kuster y cols. 2006, Matteo y cols. 2007, Olivares y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{1,23,68,81,99,138}).

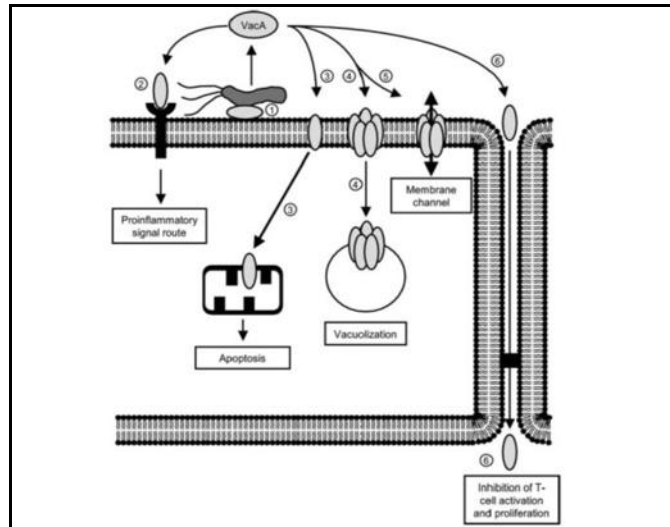


Figura 5. Mecanismos de daño celular ocasionados por *Citotoxina vacuolizante VacA* (Matteo y cols. 2007 ⁸¹).

A pesar de que se ha demostrado que el genotipo *vacA s1-m1* está asociado con úlcera péptica, en varios estudios se ha sugerido que la genotipificación de *cagA*, *vacA* e *iceA* parece no ser muy útil como marcador de virulencia en países como Colombia, en los cuales se encuentran niveles altos de genotipos *vacA s1m1*, *cagA*+, inclusive en pacientes con gastritis (Abdo y cols. 2007, Cittelly y cols. 2002, Olivares y cols. 2006 ^{1,23,99}).

Resultados en estudios previos reportan que el alelo *s1a* es predominante en población hispana (en un estudio que incluía aislados provenientes de pacientes colombianos). Las cepas con la combinación *vacAs1m1 cagA* (más citotóxicas) son mucho más frecuentes en patologías avanzadas (úlcera péptica y cáncer gástrico) que en gastritis no atrófica (Abdo y cols. 2007, Cittelly y cols. 2002, Olivares y cols. 2006, Torres y cols. 2004 ^{1,23,99,138}).

Por otra parte, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor angiogénico capaz de inducir la reconstrucción de la mucosa estimulando la vascularización y el aporte de nutrientes, presenta una sobreexpresión en carcinomas gástricos, por cepas de *H. pylori* que expresan proteína VacA (Tox+) a través de la activación de las cinasas MAP (familia de proteínas capaces de fosforilar a su sustrato e implicadas en numerosas rutas de señalización celular). Además se ha observado sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima productora de prostaglandinas, que estimulan a su vez la producción de VEGF y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos (Olivares y cols. 2006 ⁹⁹).

➤ *Proteína Cag A (Citotoxina)*

Esta codificada por el gen *cagA*, presente en un 60-80%, de las cepas de *Helicobacter pylori*, que se encuentra dentro de una zona del genoma donde se han descrito distintos genes con actividad patogénica, por lo que es llamada isla de patogenicidad (PAI). Esta proteína inmunorreactiva de 120 a 145 kDa, esta dentro de la célula hospedera originando secuencias de fosforilación en cascada de cinasas, que llevan a la reorganización del citoesqueleto. Lo anterior, ocasiona una transformación y a su vez incremento de crecimiento y la motilidad de las células epiteliales gástricas, inducido por CagA (unida a la fosfatasa celular SHP-2), que puede romper la arquitectura normal de la mucosa gástrica, aumentando la inflamación local (IL-8) por *H. pylori* en el estomago y este proceso puede conducir al desarrollo de cáncer gástrico. Análisis estructurales han demostrado que esta proteína varía de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori* (Abdo y cols. 2007, García y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Hatakeyama y cols. 2006, Higashi H y cols. 2002, Matteo y cols. 2007, Olivares y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005, Ryan , 2005, Torres y cols. 2004, Tsutsumi y cols. 2006^{1,41,43,54,59,81,99,109,125,138,140}).

Continuando con un efecto de daño en la mucosa causado por CagA positivo, los altos niveles de colonización del cuerpo gástrico requieren de la presencia intacta de Cag-PAI, por lo cual puede ocasionar condiciones precancerosas como la gastritis atrófica (acidez gástrica baja) y desarrollo de cáncer gástrico. Por otro lado, *H. pylori* puede estimular e incrementar el recambio de células epiteliales por acumulación de mutaciones genéticas que promueven varias fases de carcinogénesis gástrica. Por lo cual, se ha propuesto que ciertas reorganizaciones pueden llevar a la transcripción de genes nucleares, que podrían llevar a la producción tumoral. Se ha observado que las cepas *Cag +* se relacionan con úlceras y adenocarcinoma de la parte baja del estómago, también están vinculadas con incidencia disminuida de adenocarcinoma en la parte alta del estómago (cardias) y esófago. Esta proteína es considerada como un marcador de patogenicidad debido a que su presencia se relaciona con el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (adenocarcinoma). De los pacientes con úlcera duodenal, 80 al 100% producen anticuerpos contra CagA, mientras que en personas con gastritis se detecta en solo un 63%. Sin embargo, esta asociación no ha sido consistente en países como China y Japón (Abdo y cols. 2007, García y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Hatakeyama y cols. 2006, Matteo y cols. 2007, Olivares y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005, Ryan , 2005, Torres y cols. 2004, Tsutsumi y cols. 2006^{1,41,43,54,81,99,109,125,138,140}).

El gen *cagA* está localizado en el extremo de un fragmento de DNA de aproximadamente 40 Kb, denominado "islote o isla de patogenicidad" (cag-PAI), la cual contiene 31 genes, que codifica los componentes de un sistema de secreción y cuya presencia está asociada con una mayor respuesta inflamatoria gástrica (IL-8 con el gen *picB*), activación de las cinasas MAP. Por lo cual, es conocido como uno de los genes de virulencia de *H. pylori* (Abdo y cols. 2007, Buckley, 1998,

Cittelly y cols. 2002, Higashi y cols. 2002, Matteo y cols. 2007, Olivares y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005^{1,16,23,59,81,99,109}).

Los receptores de la superficie del tejido blanco son esenciales para la iniciación, establecimiento y mantenimiento de la infección. Las cepas *H. pylori* se clasifican de acuerdo al grado de virulencia: I que expresan citocinas asociadas a proteínas (CagA y citotoxina vacuolizante- VacA). Otras codifican para gen babA2, la molécula de adhesión BabA (38% en Europa, 36% Italia, 56.6% en Korea). Asociado a la presencia de inflamación activa y crónica; y las tipo II que se caracterizan porque no expresa CagA, ni VacA (Lee y cols. 2006⁷¹).

La presencia de estos factores de virulencia se asocia con mayor grado de respuesta inflamatoria y degeneración epitelial. La genotipificación puede jugar un papel muy importante para identificar las cepas circulantes en un área geográfica dada, *cagA* y posiblemente *vacA* pueden ser usados como marcadores de una mayor virulencia y riesgo de desarrollar patologías gástricas severas, aunque es claro que no serían útiles para diferenciar cepas ulcerogénicas y carcinogénicas (Abdo y cols. 2007, Cittelly y cols. 2002, Matteo y cols. 2007, Quiroga y cols. 2005^{1,23,81,109}).

Varios investigadores proponen que aun en cepas *cagA*+, la organización genética y la diversidad dentro del islote de Patogenicidad (PAI) pueden tener un efecto modificador del potencial patogénico de la cepa infectante, de manera que sólo las cepas con el PAI completo (sin delecciones ni modificaciones) son realmente virulentas. Se ha descrito que *cagE* es un marcador importante de la capacidad de cepas *cagA* para inducir citoquinas pro-inflamatorias (IL-8) en el epitelio de la mucosa gástrica y por lo tanto puede ser un marcador útil para definir genotipos más tóxicos. La tipificación parcial de *cagE* en las cepas de este estudio indica que la mayoría de cepas *cagA* son también *cagE*+, sin embargo, el genotipo de la totalidad de las cepas se encuentra en ejecución. Se ha demostrado una correlación positiva entre la presencia de cepas *H. pylori cagE*+ y úlcera duodenal (Cittelly y cols. 2002, Matteo y cols. 2007, Quiroga y cols. 2005^{23,81,109}).

En México, se encontró que existe una correlación entre los niveles altos de citotoxinas; cepas *VacA* serotipo *s1/m1* y *cagA*+ con la respuesta al tratamiento. Los pacientes con úlcera péptica tienen mayor erradicación de *Helicobacter pylori* que aquellos que sólo tienen gastritis crónica folicular y presentan cepas más virulentas *cagA*+ y *VacA*+ (Sánchez del Monte y cols. 2006¹²⁶).

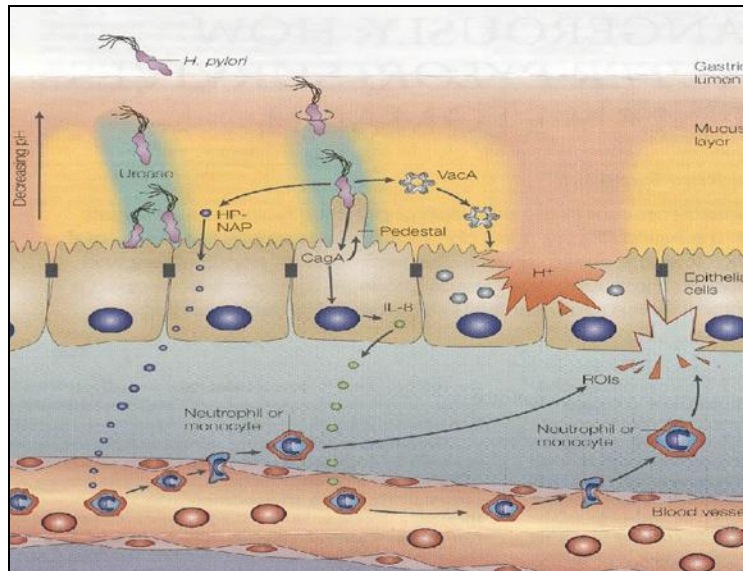


Figura 6. Patogénesis de la infección por *H. pylori*.

➤ *Peptidoglicano*

En años recientes se ha considerado como un importante factor de virulencia por esta bacteria. Es una barrera protectora de la pared celular bacteriana. La cual, activa el factor de transcripción (NF Kappa- β) con inducción de IL-8, producida por la célula gástrica. Debido a que este microorganismo no invade la célula, puede activar dentro de la misma, mecanismos de señalización intracelular que codifican para la isla de patogenicidad (PAI). Y a través de una modificación en la estructura del peptidoglicano (N-deacetilación) evade la respuesta inmune innata (Buckley, 1998, Tierney y cols. 2006, Torres y cols. 2006, Wang y cols. 2009^{16,137,138,145}).

➤ *Proteína OipA*

El análisis de secuencia genómica de *H. pylori* han revelado una alta proporción de genes que codifican proteínas de membrana externa. Una de estas moléculas es una proteína proinflamatoria de 34 kDa codificada por el gen *oipA*. La presencia de este gen en cepas asiáticas se asocia con la presencia de *cagA* y con inducción de altos niveles de IL-8. Presenta una región en la secuencia señal con repeticiones CT, que establecen la funcionalidad del gen que se relaciona con mayor densidad de la bacteria, mayor inflamación y presencia de gastritis (64%), úlcera duodenal (88%) y cáncer gástrico (83%), por lo que la utilidad de esta proteína como marcador es limitada (Kuster y cols. 2006, Matteo y cols. 2007, Quiroga y cols. 2005^{68,81,109}).

➤ *Flagelos y movilidad*

La movilidad de *H. pylori* es facilitada por los flagelos, son estructuras extracelulares complejas que requieren energía para funcionar, lleva de 1 a 7

flagelos agrupados en uno de sus polos. Las inmunoglobulinas humanas están dirigidas contra proteínas flagelares de esta bacteria. Se caracterizan por estar cubierto por una vaina lipoproteica que los protege de los ácidos gástricos (Olivares y cols. 2006⁹⁹).

Las cepas con flagelos mutados son menos virulentas que las de tipo silvestre, indicando que son cruciales en la patogenia. Están compuestos por dos flagelinas, FlaA (más abundante, exterior) y FlaB (base) a diferencia del resto que son homopoliméricas. Cuando están ausentes (FlaA- FlaB-) dan resultado a bacterias inmóviles, que conservan la capacidad de adhesión capaces de infectar los estadios tempranos de la infección (Olivares y cols. 2006⁹⁹).

➤ *Radicales libres*

Los radicales de oxígeno (ión superóxido y peróxido de hidrógeno) derivados de los neutrófilos activados que tienen efectos dañinos sobre la mucosa gástrica. Se ha descrito una asociación positiva entre especies reactivas de oxígeno y la infección y daño histológico. La protección de las células está inducida por activación de enzimas secuestradoras de estas especies (superóxido dismutasa o SOD, catalasa y glutatión peroxidasa), se han descrito niveles de actividad más altos en cepas cagA. Además, existe producción de cloramina (NH₂Cl) que es un agente tóxico oxidante que puede atravesar la membrana plasmática celular (Hatakeyama y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Wang y cols. 2009^{54,99,145}).

➤ *Inducción de enzimas y citocinas*

Las enzimas COX catalizan la conversión de ácido araquidónico o prostanoïdes como la prostaglandina E₂, las cuales protegen a la mucosa gástrica de la apoptosis, aumentando la proliferación celular. Existen dos isoenzimas; COX-1, COX-2, la primera es constitutiva y la segunda es inducible en casos de lesión y es mediador de inflamación. Se sabe que la gastritis debida a esta bacteria induce su expresión, dependiendo del tipo de cepa bacteriana, en pacientes con cáncer gástrico existe una sobreexpresión de COX-2, misma que disminuye posteriormente a la erradicación de *H. pylori*, esto se relaciona con el distinto potencial patógeno (Hatakeyama y cols. 2006, Olivares y cols. 2006^{54,99}).

El óxido nítrico (NO) contribuye a la protección de la mucosa gástrica aumentando el flujo sanguíneo e inhibiendo la adhesión de leucocitos al endotelio. En la mucosa gástrica normal no existe enzima NO sintetasa (iNOS), pero su expresión aumenta en los pacientes con gastritis debida a *H. pylori*. Esta enzima y COX-2 son inducidas por citocinas como IL-1β, factor de necrosis tumoral α, interferon γ y lipopolisacáridos bacterianos. Las células gástricas epiteliales contribuyen a la respuesta proinflamatoria mediante la producción y captación de citocinas producidas por la lámina propia y leucocitos intraepiteliales. Los niveles epiteliales de IL-1β, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral-α, sobreexpresión del interferón-γ (sobreexpresión de MCH II y aumento de adhesión) son mayores en

pacientes infectados, lo que sugiere una respuesta inmediata por linfocitos Th1 (Hatakeyama y cols. 2006, Olivares y cols. 2006^{54,99}).

10. Fisiopatología

El *Helicobacter pylori* (HP) es un bacilo que coloniza la mucosa gástrica antral adyacente a las células epiteliales gástricas. Aunque no es invasivo, causa una inflamación aguda y crónica de la mucosa gástrica, denominada gastritis crónica activa; con neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos. La infección se ha asociado también a úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico. Los mecanismos de lesión y la inflamación pueden estar relacionados en parte, con los productos de dos genes, *vacA* y *CagA*. (Buckley , 1998, Tierney y cols. 2006, Torres y cols. 2006, Wang y cols. 2009^{16,137,138,145}).

El estómago, por el bajo pH de su mucosa, tiene una importante actividad bactericida, sin embargo, el *Helicobacter pylori* tiene diversos mecanismos que le permiten evadir esta actividad, colonizar la mucosa gástrica y establecer la permanencia de largo plazo. La bacteria tiene flagelos que le permiten penetrar y anidarse bajo la capa de mucus, la ureasa que le crea un nicho neutro protector y la adhesión a las células epiteliales mediada por adhesinas (BabA) que se unen al grupo sanguíneo Lewis B. (Clyne y cols. 2007, García y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Valenzuela, 2004^{25,41,43,99,141}).

La infección por *H. pylori* en el huésped desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar la bacteria, pero juega un papel fundamental en las distintas formas clínicas que son tan variadas como la gastritis superficial leve, úlcera gástrica o duodenal o cáncer gástrico (García y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Kuster y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{41,43,68,99,138}).

La historia natural de la enfermedad implica que la infección este presente en el individuo por décadas, antes de que se desarrollen úlceras o quizá cáncer gástrico. Por lo cual, es de suma importancia estudiar los resultados a largo plazo de una terapia de erradicación y definir la frecuencia de re-infección (Lundin y cols. 2005, Torres y cols. 2006^{76,138}).

El proceso de la infección incluye:

1. *Fase aguda de la infección:* Se adquiere principalmente por vía oral, destacándose la transmisión por los miembros de la familia (hacinamiento) y por vectores (moscas) que abundan especialmente cuando hay malas condiciones higiénicas y socioeconómicas (Azevedo y cols. 2006, Kasper y cols. 2005, Valenzuela, 2004^{7,65,141}).
2. *Fase crónica:* con el tiempo se desarrolla una respuesta linfocitaria adaptativa, facilitada por la expresión de adhesinas vasculares (VCAM-1 y ICAM-1) que facilitan la migración de los macrófagos a la mucosa gástrica.

Además, las cadherinas junto con las adhesinas vasculares participan en la patogénesis de la inflamación inducida por *H. pylori*. La citotoxina bacteriana vacuolizante VacA, induce de vacuolización de epitelio y apoptosis que es mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF α), lo que resulta en la destrucción lenta y progresiva de la barrera epitelial (García y cols. 2003, Hatakeyama y cols. 2006, Kasper y cols. 2005, Kuster y cols. 2006 Valenzuela, 2004^{41,54,65,68,141}).

3. La interacción entre la bacteria, la respuesta inmunológica y factores ambientales determinará dos tipos de gastritis: una, que compromete principalmente el antro gástrico, con hipersecreción ácida y asociada más frecuentemente a la úlcera duodenal o pilórica, y otra, con compromiso más proximal, que compromete el cuerpo y fondo gástrico, con predominio de atrofia de la mucosa, metaplasia intestinal y asociado más a menudo a cáncer gástrico (Fig. 7) (Hatakeyama y cols. 2006, Kasper y cols. 2005, Valenzuela, 2004^{54,65,141}).

4. *H. pylori* y secreción gástrica de ácido: El efecto de la infección sobre la secreción gástrica es multifactorial y determinado por:

a) Inicialmente la infección disminuye la producción de ácido por acción de citocinas como IL-1B.

b) Posteriormente la secreción del ácido está determinada por la severidad y la localización de la gastritis, determinada según se vio por los alelos IL-1B y IL-1RN (Hatakeyama y cols. 2006, Kasper y cols. 2005, Valenzuela, 2004^{54,65,141}).

El incremento de la gastrina circulante asociado a *H. pylori* es principalmente por la gastrina 17. Esta forma de gastrina se origina principalmente en la mucosa antral, y su incremento selectivo es consistente con la infección afectando predominantemente esta región. La gastrina 17 es también la principal forma de la hormona que aumenta en respuesta a la comida, y es consistente con la hipergastrinemia asociada a *H. pylori* que es más pronunciada postprandialmente (Kasper y cols. 2005, Soriano, 1998^{65,132}).

La liberación de gastrina por la mucosa antral está bajo control fisiológico inhibitorio para prevenir la excesiva secreción de ácido gástrico. La liberación de la gastrina es suprimida cuando el pH luminal antral cae por debajo de 3. Adicionalmente este control inhibitorio ejercido por la liberación de gastrina es también ejercido por la colecistocinina (CCK) y otras enterogastronas liberadas desde el intestino delgado. La inhibición de la liberación de gastrina ejercida tanto por el ácido gástrico y la colecistoquinina esta mediada principalmente por la liberación de somatostatina por las células D de la mucosa antral. Estas células D están en íntima proximidad a las células G, y la somatostatina liberada por ellas, ejerce un control paracrino inhibitorio tanto para la síntesis como para la liberación de gastrina. Así la enfermedad ulcerosa duodenal parece ser resultado de la

combinación de un factor adquirido (hipergastrinemia inducida por *H. pylori*) y un factor del huésped, esto es, la alta sensibilidad a la gastrina (Kasper y cols. 2005, Soriano, 1998^{65,132}).

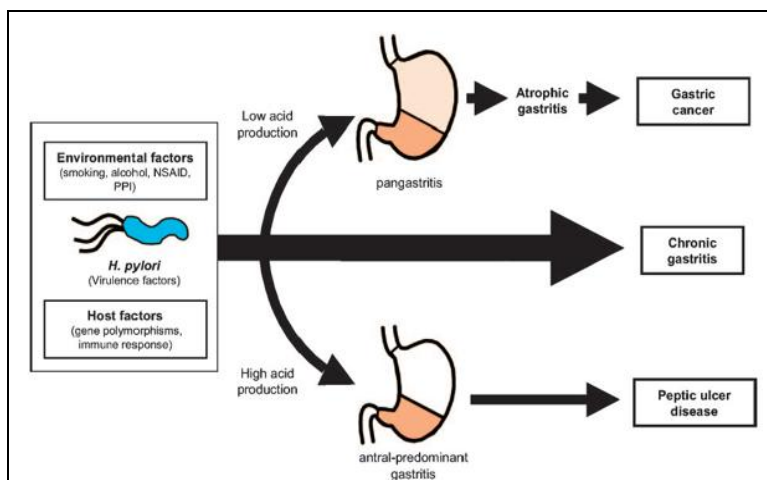


Figura 7. Representación esquemática de la patogénesis de la infección por *H. pylori* (Hatakeyama y Brzozowski, 2006⁵⁴).

11. Mecanismo de adhesión y colonización

H. pylori se asocia a estructuras como adhesinas, factores de colonización y antígenos que median la unión de células de que contienen glicoproteínas de ácido siálico. El organismo también produce hemaglutininas ácido siálico específicas (sección 8). Las cepas de *Helicobacter pylori* se unen principalmente a las glándulas mucosas que están situadas en el antro gástrico. Otros estudios mencionan que *H. pylori* puede adherirse a las glándulas submucosas esofágicas y conductos glandulares, aumentando la posibilidad de que represente un sitio de colonización “silencioso” (Aspholm y cols. 2006, Falk y cols. 1993^{6,31}).

El proceso de adquisición de la infección de *H. pylori* se puede dividir en varias fases: a) adhesión a la capa celular epitelial, b) la inducción de citocinas proinflamatorias (se mencionan características en fisiopatología (sección 9) y c) colonización (García y cols. 2003, Olivares y cols. 2006^{41,99}).

Adhesión

Este proceso juega un papel clave en la liberación eficiente de factores de virulencia. *H. pylori* reside en la mucosa gástrica o adherida a las células epiteliales del estómago. Primero utiliza sus moléculas de adhesión (adhesinas o lectinas) (sección 8), entre las cuales está BabA (Bab A de blood antigen binding adhesin) o la adhesina que se une al ácido siálico (sab A sialic acid binding adhesin), y a su vez en la célula gástrica epitelial (tejido blanco del hospedero) se expresan carbohidratos de superficie, dentro de los cuales se une al epítipo de

Lewis^b (fucosa) y a el antígeno siálico Lewis x (Le^x) respectivamente, dando lugar a una interacción compleja; muchos de estos receptores han demostrado ser glicosfingolípidos, que facilitan la adhesión de las bacterias al epitelio del estómago. Posteriormente, en respuesta a lo anterior, se liberan células inflamatorias. Las adhesinas bacterianas y los sitios de unión correspondientes sobre la superficie del epitelio permiten que la bacteria colonice el tejido gástrico (Aspholm y cols. 2006, Gustafsson y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Petterson, 2006, Quiroga y cols. 2005, Rivas, 2000, Roche y cols. 2004, Rubinsztein-Dunlop y cols. 2004, Walz y cols. 2005^{6,49,99,108,109,117,119,123,144}).

El gen polimórfico de BabA juega un papel crucial en el adenocarcinoma gástrico, úlcera péptica y gastritis crónica. Este gen tiene dos alelos, babA1 y babA2, este ultimo codifica para la proteína babA y su presencia se correlaciona con la de otros genes patógenos (cagA y los alelos s1 y m1 de vacA). Se ha reportado variaciones en la prevalencia de cepas babA2 positivas entre poblaciones asiáticas y occidentales (Olivares y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005, Roche y cols. 2004, Rubinsztein-Dunlop y cols. 2004, Walz y cols. 2005^{99,109,119,123,144}).

Otra proteína implicada en este proceso que funciona como una adhesina, es la proteína activadora de neutrofilos (NAP), codificada por el gen napa y aislada de la fracción proteica de la membrana externa de *H. pylori*. Actúa como bacterioferritina en la captación de hierro y como la afinidad para ceramidas sulfatadas (antígeno Lewis^a y en menor medida Lewis^x). Esta bacteria posee también una hemaglutinina codificada por el gen hpaA que se une a restos de N-acetilneuraminil, α (1,2) lactosa y restos de ácido siálico (Aspholm y cols. 2006, Olivares y cols. 2006, Roche y cols. 2004^{6,9,119}).

Por último, las proteínas de choque térmico (heat-shock protein), también pueden permitir la unión bacteriana a la mucina de las células epiteliales gástricas induciendo la adhesión de *H. pylori* y activando la respuesta inflamatoria (Chmiela, 2006²²).

Se sabe que las diferentes afinidades para adhesinas (lectinas) encontradas influyen en diferentes potenciales patógenos en la infección por *H. pylori*. Lo que se traduce en diferente patología gastroduodeal (Khin y cols. 2000⁶⁶).

La adherencia de *H. pylori*, está relacionada con la gravedad de la gastritis, puesto que se ha observado que a mayor número de bacterias adheridas, mayor daño, mostrando influencia con la severidad de la enfermedad (Fowler y cols. 2005, García y cols. 2003, Kasper y cols. 2006^{37,41,65}).

En conclusión, la presencia de adhesinas permite a la cepa que la posea una mayor capacidad de infección en la mucosa (Olivares y cols. 2006⁹⁹).

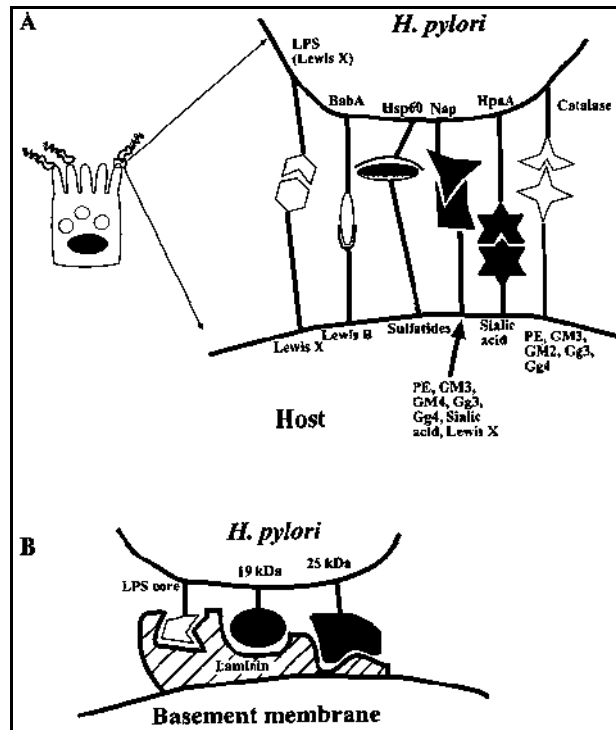


Figura 8. Interacción de las adhesinas de *H. pylori* con los receptores de las células gástricas epiteliales del hospedero (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi>. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics).

Colonización

Helicobacter pylori coloniza la capa de la mucina gástrica de manera persistente, el estómago de la mayoría de la población humana global (y posteriormente se produce la unión a células del epitelio gástrico donde las uniones que se producen son a nivel molecular entre proteínas (lectinas) y receptores (carbohidratos). Puede colonizar cualquier parte de la mucosa gástrica, no así en las áreas de metaplasia intestinal, observándose además que tiene predilección por la mucosa gástrica antral. La colonización por *H. pylori* aumenta con la edad (Chillihua y cols. 2003, García y cols. 2003, Mandado y cols. 2003, Miller-Podraza y cols. 2006, Walz y cols. 2005^{21,41,78,82,144}).

Una vez colonizada la mucosa gástrica, origina un proceso inflamatorio con infiltración de polimorfonucleares y neutrófilos lo que origina cambios a nivel celular y consistencia del moco gástrico. Un dato muy importante que debemos de considerar al realizar el diagnóstico de la infección por *H. pylori* es que esta bacteria no es invasiva al colonizar estómago, por lo que adopta y esta restringida a algunas secciones o "distribución en parches" en las zonas del estómago a nivel del antro, fondo y cardias gástricos reside en condiciones microaerofílicas entre el moco y el epitelio. (Giono y cols. 2006, González y cols. 2004, Wang y cols. 2009^{43,47,145}).

La asociación de *H. pylori* con células epiteliales gástricas y la capa de mucina convierten a la superficie epitelial en un facilitador permanente de colonización del estómago por esta bacteria. Por lo cual, se ha observado que una misma persona puede tener colonizada la mucosa gástrica por dos cepas diferentes de *H. pylori* de manera simultánea (Azevedo y cols. 2006, Walz y cols. 2005^{7,144}).

12. Manifestaciones Digestivas

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial constituyendo la mayor causa de gastritis crónica que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas juega un papel importante para el desarrollo un úlcera péptica (duodenal o gástrica) o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico. También puede desarrollarse un tipo de linfoma, poco frecuente, que es el linfoma gástrico tipo MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*). La infección crónica con este organismo esta asociada a un incremento en el riesgo de úlcera péptica y duodenal, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico (Aguilar y cols. 2004, Baquero y cols. 2004, Carmona-Sánchez y cols. 2004, Fowler y cols. 2005, Gancz y cols. 2008, Kuster y cols. 2006, Linz y cols. 2007, Miller-Podraza, 2006, Mohar y cols. 2002, Olivares y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005, Raczko y cols. 2005, Roche y cols. 2004, Rubinsztein-Dunlop y cols. 2004, Saad y cols. 2005, Torres y cols. 2004, Tsutsumi y cols. 2006^{3,10,17,37,40,68,72,82,83,99,109,110,119,123,126,138,140}).

Dispepsia

Es un síndrome clínico de etiología multicausal, caracterizado por la presencia de dolor abdominal crónico y recurrente (DAR) centrado en el abdomen superior sin causa orgánica identificable por métodos diagnósticos convencionales, que se puede asociar a patología orgánica o trastornos funcionales. En estos pacientes se han demostrado alteraciones de la motilidad gastrointestinal e hipersensibilidad visceral, los que parecen modulados por factores psicosociales. Se estima que la padecen del 11 al 15% de los adultos en países occidentales aunque solo la mitad de ellos buscan atención médica (Abdo y cols. 2007, Carmona-Sánchez y cols. 2004, Ladrón de Guevara y cols. 2004^{1,17,69}).

Se considera que múltiples alteraciones se han implicado en la fisiopatogenia de la enfermedad y en la actualidad no existe tratamiento específico. La frecuencia de infección por *H. pylori* es pacientes con dispepsia funcional es del 5 a 17% en niños y 51 al 80% en adultos. En estos pacientes la mejoría sintomática y en la calidad de vida una vez erradicada la bacteria es limitada, se estima que en dispepsia no ulcerosa la ganancia terapéutica es de apenas un 10%. Sin embargo es importante considerar que la respuesta al dolor abdominal es difícil, pues se trata de una percepción subjetiva en la que participan

diferentes factores como son la virulencia de *H. pylori* relacionada con su genotipo, capacidad de producción de toxinas, cambios inflamatorios en la mucosa del aparato digestivo y su respuesta con la hipersensibilidad visceral (Abdo y cols. 2007, Carmona-Sánchez y cols. 2004, Ladrón de Guevara y cols. 2004^{1,17,69}).

Los síntomas dispépticos se definen como síntoma o conjunto de síntomas que se originan directamente en la pared alta del aparato digestivo, que guardan relación con la presencia o ausencia de alimentos en el estómago y duodeno. Están caracterizados por: sensación de llenura o distensión epigástrica postprandial, acidez, regurgitaciones, náuseas, vómito, eructación excesiva, dolor epigástrico postprandial, dolor con el estómago vacío, calma con la ingestión de alimentos o antiácidos, mantenidos durante un mes (González y cols. 2004⁴⁷).

La estrategia buscar y tratar a los pacientes con esta patología propuesta por algunos consensos, proviene de países con bajas tasas de infección y no pueden extenderse a zonas geográficas donde la mayoría de las personas tiene *H. pylori*, como ocurre en México (Abdo y cols. 2007¹).

Como se menciona anteriormente en México las úlceras, gastritis y duodenitis ocupan el cuarto lugar de morbilidad a nivel nacional (Boletín epidemiológico, 2006¹²⁹).

Gastritis crónica nodular

Entre el 85-90% de los pacientes con gastritis crónica nodular están infectados por *H. pylori*. La gastritis se origina después de la infección por *H. pylori* puede pasar sin manifestaciones clínicas o bien originar la expresión clínica propia de la gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas, vómitos, entre otros), esta infección puede permanecer indefinidamente. La infección crónica dará lugar a una gastritis superficial crónica difusa que podría conducir a una gastritis atrófica multifocal, a una atrofia gástrica y a metaplasia gástrica. En la gastritis antral tienden a presentar una secreción normal o elevada de ácido gástrico y al parecer se incrementa el riesgo de desarrollar una úlcera duodenal (Baquero y cols. 2004, García y cols. 2003, Kasper y cols. 2005^{10,41,65}).

La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad (infiltración inflamatoria aguda). La gastritis crónica por *H. pylori* es un proceso dinámico que evoluciona hacia la atrofia que afecta al antro y a la mucosa transicional y se extiende en dirección al cuerpo. También se puede asociar a metaplasia intestinal como respuesta a la agresión crónica. En áreas metaplásicas no se detecta *H. pylori* y la inflamación es menor que en las no metaplásicas. La atrofia y la metaplasia son dos procesos diferentes que pueden presentarse de forma independiente. (Baquero y cols. 2004, Kasper y cols. 2005^{10,65}).

Úlcera gástrica

Entre el 75-85% de los pacientes con úlcera gástrica (péptica) están infectados por *H. pylori*. Pero solo es desarrollada por menos del 10% de las personas infectadas (Abdo y cols. 2007, Castro M y cols. 2004, García J.A. y cols. 2003, Kasper y cols. 2005^{1,18,41,65}).

La relación entre *H. pylori* y el uso de drogas no esteroideas es controversial, sin embargo el riesgo de úlcera péptica se incrementa en pacientes que toman antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), se ha reportado que existe un sinergismo entre estos dos factores para el desarrollo de esta enfermedad. La úlcera gástrica es rara en tomadores de AINEs, para pacientes negativos a *H. pylori* (Hatakeyama y cols. 2006, Huang y cols. 2002^{54,61}).

Úlcera duodenal

La infección por *H. pylori* representa la etiología más frecuente de úlcera gastroduodenal. Se estima que cerca de un 85-95% de los pacientes con úlcera duodenal están infectados por *H. pylori*, y la mayor parte del resto es producida por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), en los cuales se incrementa el riesgo de presentar esta patología hasta en un 6.13 cuando están ambos factores presentes. Se estima que alrededor del 10 al 15% de las personas infectadas desarrolla la enfermedad. Estos pacientes desarrollan complicaciones como sangrado de tubo digestivo alto o perforación, en las cuales el diagnóstico preciso de la infección por este microorganismo y su erradicación reduce significativamente el riesgo de reactivación de la úlcera y previene nuevos episodios de sangrado (Castro y cols. 2004, García y cols. 2003, Hatakeyama y cols. 2006, Huang y cols. 2002, Kasper y cols. 2005^{18,41,54,61}).

El 90% de los pacientes con úlcera duodenal tienen áreas de metaplasia gástrica en el bulbo duodenal, lo que probablemente corresponde a una respuesta inespecífica al daño, favorecida por hipersecreción de ácido, debido a que la colonización del antro por este microorganismo reduce el número de células delta productoras de somatostatina, aumentando la concentración de gastrina, a su vez mayor secreción de ácido, que induce metaplasia gástrica protectora en el duodeno. En el 50% de los pacientes con esta patología, las áreas de metaplasia están colonizadas por *H. pylori*. Una vez colonizado el duodeno, la bacteria podría inducir úlcera a través de la inflamación o por la liberación de toxinas. Del 20 al 40% de los pacientes con úlcera duodenal muestran cicatrización espontánea de la úlcera. Numerosos estudios han confirmado que la tendencia de esta enfermedad a la recurrencia, alcanza hasta 70% al año de seguimiento (Kasper y cols. 2005, Rollán 1994^{61,123}).

En conclusión, la formación de una úlcera en el duodeno puede depender de la presencia o no de metaplasia gástrica, de una respuesta inmunológica "ulcerogénica", de la producción de toxinas específicas por cepas de esta bacteria y de otros factores aún no identificados (Kasper y cols. 2005, Rollán 1994^{61,123}).

Cáncer gástrico (adenocarcinoma)

Es una de las neoplasias malignas más comunes en el mundo. El papel de *H. pylori* se entiende al conocer que la gastritis crónica es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinomas en la porción distal del estómago, y asociado a menor número de esta patología en el cardias. La frecuencia con la que se asocia la infección por esta bacteria y el cáncer gástrico se considera que es mayor al 90%. Por lo cual, este microorganismo, fue clasificado como carcinógeno de clase I desde 1994 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La adquisición temprana de *H. pylori* y la persistencia de la infección esta asociada a un incremento de riesgo para malignidad gástrica. La epidemiología indica que los países con prevalencia alta de cáncer gástrico (antro y cuerpo) también presentan prevalencia elevada de *H. pylori*. En México la prevalencia de *H. pylori* es alta, pero el índice de cáncer gástrico es bajo. Lo anterior puede deberse a que el origen del cáncer gástrico es multifactorial (género, edad, subtipo histológico). Es probable que esta patología provenga de la lesión progresiva del DNA y la supervivencia de clones anormales de las células epiteliales (Abdo y cols. 2007, Araújo y cols. 2006, García y cols. 2003, Kasper y cols. 2005, Muñoz y cols. 2007, Nyrén y cols. 2006, Quiroga y cols. 2005^{1,4,41,61,87,98,109}).

La modulación de la respuesta inflamatoria para microorganismos como *H. pylori* ha sido determinada como un proceso precanceroso. Estos avances sobre el entendimiento de la patogénesis de esta bacteria relacionado con carcinogénesis son relevantes para designar estrategias en poblaciones de alto riesgo (Correa y cols. 2002²⁶).

En el proceso de la carcinogénesis, la metaplasia intestinal es un paso fundamental que precede al desarrollo de displasia y es resultado de la gastritis atrófica. Se considera una lesión precancerosa y es resultado de un proceso inflamatorio crónico. Es de gran relevancia clínica, la reversibilidad de la metaplasia intestinal en sujetos en los cuales es posible erradicar la infección por *H. pylori* (Abdo y cols. 2007, Hatakeyama y cols. 2006^{1,54}).

Se ha reportado que en pacientes con cáncer gástrico el antígeno de proliferación celular (PCNA) se expresa más en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*, que en la mucosa no infectada. La alta proliferación celular es un principio de carcinogénesis debido a que produce errores de replicación (Gutiérrez y cols. 2006⁵¹).

Linfoma de tipo MALT (Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa)

Este tipo de linfoma de células B poco maligno, originados a partir del tejido linfoide se localiza preferentemente en el antro gástrico, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide, son impulsados por el estímulo de las células T, que a su vez es impulsado por estímulo antigénico crónico debido a la infección por *H. pylori*. Se estima que la prevalencia de infección por esta bacteria es cerca del 90%, varia dependiendo del método diagnóstico que se utilice. Prolifera tras un

proceso inflamatorio crónico. Se sabe que los tumores impulsados por antígenos de *H. pylori* sufren regresión completa tras la erradicación de la bacteria en un 70 a 80% de los casos, aunque se ha observado falla del tratamiento, especialmente en pacientes que presentan translocaciones (11,18) (q21; q21). En algunos enfermos existen anormalidades genéticas que limitan la respuesta al tratamiento de erradicación y suele observarse una progresión a tumores de alto grado de malignidad (Abdo y cols. 2007, Asenjo y cols. 2007, García y cols. 2003, Gustafsson y cols. 2006, Kasper y cols. 2005, Mueller y cols. 2005, Siakantaris y cols. 2009^{1,5,41,49,65,86,131}).

Asociación de *H. pylori* con otras patologías del tracto digestivo

Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)

Recientemente ha surgido interés por la posible función protectora de *H. pylori* contra el reflujo gastroesofágico y adenocarcinoma de esófago y cardias gástrico. El mecanismo que explica este efecto protector es la hipoclohidria secundaria a la gastritis atrófica inducida por *H. pylori*. Se ha observado una relación entre la menor prevalencia por este microorganismo y mayor frecuencia de estas enfermedades. En este caso la erradicación del microorganismo, podría aumentar el riesgo de este padecimiento (Abdo y cols. 2007, Blaser, 1997, Kasper y cols. 2005, Nyrén y cols. 2006^{1,13,65,98}).

Apendicitis Aguda

Existen estudios previos que relacionan la infección por *Helicobacter pylori* con dolor abdominal recurrente (DAR) y apendicitis aguda, sin embargo Paredes, y cols. no observaron relación significativa en la patogénesis de la misma (Paredes y cols. 2007¹⁰⁴).

13. Manifestaciones Extradigestivas

En relación a las manifestaciones extradigestivas asociadas a la infección por *H. pylori*, de manera general se pueden presentar en diferentes aparatos y sistemas del organismo, como lo podemos apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 5. Manifestaciones extradigestivas asociadas a *H. pylori* y los principales biomarcadores que participan en la fisiopatogenia.

Enfermedades asociadas a la infección por <i>H. pylori</i>	Biomarcadores
Cardiovasculares: Aterosclerosis, cefalea primaria, fenómeno de Raynaud (primario).	1) IL-6, PCR, P-selectina, VCAM-1, Metaloproteinasa de la matriz de monocito 9 (MMP-9), factor estimulante de colonias de macrófagos, TNF, (IL)-1 β , citocina 10, IFN- α .2) Se desconoce fisiopatogenia.3) $\downarrow$ Vasodilatación y prostaciclina, $\uparrow$ vasoconstricción: Endotelina-1, Angiotensina II.

Piel: Rosácea, alopecia areata, urticaria idiopática crónica.	1) Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).2) Alelos HLA clase II, Alelo 2 antagonista receptor de interleucina-1.3) Se desconoce fisiopatogenia.
Autoinmunes: Síndrome de Sjogren, Neuropatía isquémica óptica anterior no arterítica.	1) IL-10, IL-4R, TNF α , IL-6, IL-1RA, TGF β 1. 2) Proteína C reactiva
Hepáticas: Encefalopatía hepática	↓ IGM, Opsoninas, C3, fagocitosis y efecto bactericida de PMN, sistema retículo-endotelial y Lectina tipo C.
Respiratorias: Bronquitis crónica, asma bronquial, cáncer de pulmón	1) Proteína C reactiva, IL-1, IL-6, TNF α , ↑ neutrófilos.2)IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, TNF α .3)P53, sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo celular, adhesión celular y metabolismo de nucleótidos (colagenasas y citoqueratinas).
Otras: Hematológicas, Púrpura trombocitopenica inmune	Antígenos plaquetarios para CagA (Ab plaquetarios), Inhibidor-1 activador de plasminógeno, Fc-dependiente de la fagocitosis de las plaquetas (por acción LPS).

Referencias: Falkenhagen K. y cols. 2006, Fica A. 2005, García C. y cols. 2003, Herric A. 2005, López F. y cols. 2007, Martínez T. y cols. 2002, Nagy V. y cols. 2004, Packard R. y cols. 2008, Ramos-Casals M y col. 2005, Roig F. 2008, Segura M. y cols. 2007, ^{32,34,41,74,80,91,100,115,122,130}).

Otras manifestaciones extradigestivas son los trastornos hematológicos como anemia ferropénica, retraso del crecimiento, entre otras. La variabilidad de los datos existentes hace que no sean concluyentes encontrando estudios que demuestran mejorías de determinadas enfermedades tras su erradicación y otros que ni siquiera encuentran correlaciones significativas (Buckley y cols. 1998, Duque, 2004, Ramírez y cols. 1998, García y cols. 2003 ^{16,30,112,41}).

14. Métodos Diagnósticos

Para diagnosticar *Helicobacter pylori*, se utilizan diferentes métodos como los invasivos o no invasivos, directos o indirectos (Aguilar y cols. 2004, Castro y cols. 2004, Mandado y cols. 2003, Morales y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Giono y cols. 2008 ^{3,18,78,85,43,45}).

Métodos invasivos o directos

Comprenden todas las técnicas de detección del microorganismo en la mucosa gástrica e implican la realización de endoscopia para obtener muestras (biopsia del antro gástrico), algunos con más caros, trabajosos y nos ocupan más tiempo como son el aislamiento en cultivo y caracterización por pruebas bioquímicas, o la observación microscópica empleando Warthin-Starry (W-S) o hematoxilina -eosina (H-E); Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (Ab) mono y policlonales y técnicas modernas de Biología Molecular (PCR), hibridación

in situ con sondas de DNA genómico y de oligonucleótidos de RNA ribosomal 16S específicas y PCR para detección en biopsias y fluidos biológicos (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994, Giono y cols. 2008, Mandado y cols. 2003^{3,44,45,78}).

Histología: El diagnóstico de gastritis e infección por *H. pylori* se puede establecer histológicamente. Se requiere panendoscopia con biopsia, la zona de elección para la toma de la muestra es el antro gástrico, la cual permite el estudio anatomopatológico y observar el microorganismo. Se utilizan varios tipos de tinciones para visualizar mejor al microorganismo. Este método ha demostrado ser sensible (90%) y específico (90%) (Aguilar S. y cols. 2004, Blanco-Delgado y cols. 2001, Giono y cols. 1994, Giono y cols. 2008, Mandado y cols. 2003, Parlapianno y cols. 2006^{3,12,44,45,78,105}).

A continuación se describen las tinciones más utilizadas. Aunque es importante mencionar que no existe ninguna técnica de tinción específica para la identificación de *H. pylori* (Aguilar S. y cols. 2004, Blanco-Delgado y cols. 2001, Giono y cols. 1994, Giono y cols. 2008, Mandado y cols. 2003, Parlapianno y cols. 2006^{3,12,44,45,78,105}).

a) Tinción Gram o impronta: Inmediatamente después de la toma de biopsia, se fija la laminilla en alcohol absoluto y se realiza la tinción para buscar la bacteria (características en Tabla 6) (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994^{3,44}).

b) Tinción Giemsa: Es la que mejor resultados da, ya que permite la identificación rápida del microorganismo (Parlapianno y cols. 2006¹⁰⁵).

c) Tinción hematoxilina-eosina (H-E): Permite realizar el estudio histológico (es barata y se realiza muy rápido). Sin embargo, no tiñe específicamente al microorganismo con la tinción de plata o Giemsa y se ha considerado como deficiente para la determinación de un diagnóstico durante la detección de microorganismos (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994^{3,44}).

d) Tinción argéntica de Warthin-Starry (W-S) que consiste en la precipitación de plata sobre la superficie de la bacteria, se observan de mayor tamaño y superficie granulosa oscura, y el moco amarillo. Precipitación inespecífica puede confundirse con la bacteria. Recomendada por Warren y Marshall en 1983. Es una buena técnica para detectar la presencia de *H. pylori*, pero el tiempo que se emplea para su preparación resulta excesivo Giono S. y cols. 1994 (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994^{3,44}).

e) Warthin – Giemsa (W-G): la bacteria se observa purpura y el moco azul claro, en ocasiones no se observa el contorno del tejido. Esta técnica,

fue usada por primera vez por Gray y cols. en 1986. Es frecuentemente recomendada como estudio de rutina para la detección del microorganismo porque es sensible y bajo costo (Giono y cols. 1994, Parlapianno y cols. 2006^{44,105}).

f) Tinción naranja de acridina. Requiere de microscopio de inmunofluorescencia (Giono y cols. 1994⁴⁴).

g) Tinción Gram y violeta de crecilo, menor sensibilidad (Giono y cols. 1994⁴⁴).

También se realiza la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales (Cervantes 2006, Giono y cols. 1994^{20,44}).

Tabla 6. Tinciones más utilizadas para la identificación de *H. pylori*.

Más utilizadas	Otras	Impronta	Referencia
Gram, Gram modificada o bien el examen en fresco utilizando un microscopio con contraste de fases.	Tinciones de Giemsa, carbolfuchina, Tinción triple de carbolfuchina/azul de Alcina/hematoxilina-eosina y tinciones de inmunohistoquímica. Tinción de Gram modificada, utilizando como contracolorante carbolfuchina y dejándola actuar durante un tiempo superior al habitual (de 2-5 minutos).	Impronta densa en el portaobjetos, lo cual se consigue bien impregnando intensamente la biopsia a lo largo del mismo, bien colocando sobre el portaobjetos 2-3 gotas de la biopsia homogeneizada. Para conseguir una buena sensibilidad se recomienda partir de dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo. Se requieren cuatro biopsias, al menos una muestra de antro y, si es posible, dos de cuerpo. Sensibilidad 99% en manos expertas.*	López-Brea y cols. (2004) *Aguilar y cols. (2004)
Gram modificada (Se siguió el método estándar, excepto que se contratiño con fucsina fenicada usada para Ziehl Neelsen en vez de safranina por 15-20 segundos).			Chillihua y cols. (2003)

	Azul de metileno al 2% en muestras obtenidas mediante citología Gástrica por cepillado		Mandado y cols. (2003)
H/E, Warthin- Starry, Coloración de Waisson.			González y cols. 2004, Quiroga y cols. 2005.

El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de metaplasia intestinal (Aguilar y cols. 2004, Brooks y cols. 2002, Giono y cols. 2006^{3,15,43}).

Se pueden emplear muestras de biopsia gástrica para el examen histológico o triturarse finamente en solución salina para usarse para cultivo. La zona de elección para la toma de biopsia es el antro gástrico mediante panendoscopia. Se recolecta la sangre para determinar anticuerpos en suero (Brooks G. y cols. 2002, Giono y cols. 2006^{15,43}).

Algunos autores afirman que la histología aún constituye el estándar de oro “goldstandard” para definir la presencia o ausencia de *H. pylori*, tiñendo la muestra con Giemsa. Debe tomarse la muestra en mucosa antral sana, evitando la región prepilórica y la parte más baja de la curva menor. Es de utilidad en el diagnóstico inicial, aunque por su costo ha sido reemplazada por la prueba de ureasa en biopsias, la serología, y en la confirmación de la erradicación, situación en la que se prefieren las pruebas en aire espirado por su carácter no invasivo (Rollán, 1994¹²³).

Cultivo: Es un método diagnóstico con alta especificidad mayor al 95%, difícil y exigente que es imprescindible en la investigación (los aislados de cultivos permiten ser caracterizados en detalle) y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. No es una técnica de rutina debido a que es difícil de realizar ya que requiere de condiciones muy específicas para su crecimiento, el realizar el cultivo de aislados clínicos es largo y costoso y requiere de una biopsia fresca, sólo está indicado cuando hay resistencia del microorganismo al tratamiento y con fines de investigación. El cual requiere de medios de cultivos especiales, y no es apropiado para el estudio de muestras donde haya otros agentes patógenos en cantidad considerable como sucede con la materia fecal o la saliva. La recuperación conforma el diagnóstico de la presencia de esta bacteria. Además este método diagnostico apoya el estudio de re-infecciones y recurrencias. (Cava F. y Cobas, 2003, Giono, 2006, Giono y cols. 2008, Kuster y cols. 2006, Moncayo y cols. 2006, Morales y cols, 2003,^{19,43,45,68,85}).

En relación a las condiciones sugeridas por diversos autores para la recuperación de *Helicobacter pylori* desde los medios de cultivo más

recomendables, la toma de la muestra (biopsia de antro gástrico) hasta la identificación y conservación bacteriana, se describen las siguientes:

Tabla 7. Reactivos para la recolección de biopsias

Temperatura	Medio de transporte	Referencia
-70° C	Cultivo de <i>Brucella</i> deshidratada, glicerol marca Gibco, agua destilada, tubos nunc de 0.5 mL. Se conservan a – 70 °C hasta ser transportadas en hielo seco.	Sánchez del Monte y cols. (2006).
Procesar muestra en menos de 4 horas	Caldo <i>Brucella</i> suplementado con suero de caballo 10% y transportadas al laboratorio en un tiempo no mayor de 3 horas.	Giono y cols. (2008).
	Caldo <i>Brucella</i> (Gibco BRL) con 20% de glicerol.	Cittelly y cols. (2002).
Conservar a 4°C o -20°C hasta las 72 horas	Caldo <i>Brucella</i> (Gibco BRL) con 20% de glicerol.	Quiroga y cols. 2005
Transporte inmediato	Caldo <i>Brucella</i>	Torres y cols. (2004).
<i>H. pylori</i> permanece viable en suero salino hasta 6 horas, de forma que si la siembra se realiza con posterioridad, la biopsia debe introducirse en medio de transporte semisólido para aumentar la viabilidad de la bacteria hasta 48 h si se conserva en nevera a 4°C. Procesar muestra en menos de 4 horas	La biopsia en un tubo estéril con 0.5 mL de suero salino. Otros autores recomiendan dejar la muestra sobre la pared del tubo sin introducirla en el suero.	López-Brea y cols (2004)
	Solución salina (0.5)	Brooks y cols. (2002), Blanco-Delgado y cols. (2001)
	2 mL. Sol. Fisiológica isotónica (recientes). Vacuntainer estéril	Chillihua y cols. (2003), Parlapianno y cols. (2006).

Tabla 8. Manejo de la muestra clínica

Macerado	Material	Cantidad de muestra	Sitio de toma de la muestra	Referencia
Homogeneización de la biopsia	Mortero de cristal o preferiblemente con un triturador eléctrico en un volumen pequeño de suero fisiológico.	Dos gotas del homogeneizado en un medio selectivo y otras dos en otro no selectivo.	Para conseguir una buena sensibilidad se recomienda partir de dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo. Se requieren cuatro biopsias, al menos una muestra de antro y, si es posible, dos de cuerpo.	López-Brea y cols. (2004)
	Homogeinizador de vidrio			Torres J. y cols. (2004).
Es recomendable dejar un trozo de biopsia triturada, siembra “en hojas de palmera” o en “ruedas de tractor”.	Tubo vacutainer rojo (16x100 mm), macerado (13x100 mm) estéril. *(18x100 mm), macerado (13x100 mm) estéril.		Muestras: antro y cuerpo gástricos. Mucosa enrojecida (eritematosa).	Chillihua D. y cols. (2003) *Blanco-Delgado C.A. y cols. (2001)
			Antro y cerca de la curvatura menor.	González C. y cols. (2004)
Estriar la biopsia (antral) sobre el medio de cultivo.				Sánchez del Monte J. y cols. (2006)
Maceración de biopsia en condiciones asépticas		2 a 3 biopsias		Quiroga A.J. y cols. (2005)
		3 biopsias de antro y 2 de cuerpo		Matteo M.J y cols. (2007)

Sánchez del Monte J. y cols. (2006), reportan que en 210 biopsias gástricas, la densidad bacteriana de *H. pylori* fue similar en antro, cuerpo y fondo del estómago.

La sensibilidad del cultivo puede limitarse por la terapéutica previa, contaminación de bacterias de otras mucosas y otros factores. Crecimiento lento, requiere temperatura de 35-37 °C en condiciones de microaerobiosis (5-10% de O₂, 5-10% CO₂ y 80-90% de N₂), una humedad del 95%, un pH de 5.5-8.0 y un periodo de incubación de 3 a 10 días. En sub-cultivos la recuperación de este microorganismo es difícil (Brooks, 2002, Forbes y cols. 2002, Giono. y cols. 1994, Navarro-Hernández y cols. 2007^{15,35,44,92}).

H. pylori crece óptimamente con un pH de 5.5 a 8.0 (6.0-7.0) y muere o no se desarrolla en el pH de la luz gástrica. El moco gástrico del lado luminal tiene pH bajo (1.0 a 2.0); en el lado epitelial el pH es de casi 7.4. Por lo tanto, *H. pylori* se sitúa profundamente en la capa mucosa cerca de la superficie epitelial donde el pH es fisiológico. *H. pylori* también produce una proteasa que modifica el moco gástrico y disminuye la capacidad del ácido para difundir a través del moco. Este mecanismo junto con la potente actividad de ureasa que genera la producción de amonio, amortigua adicionalmente el ácido (Brooks y cols. 2002¹⁵).

Por ser microorganismo fastidioso o de difícil crecimiento, los medios de cultivos utilizados son: Agar infusión de cerebro corazón (BHI). Agar Columbia, Agar Mueller-Hinton, complementados con sangre de caballo y polienriquecimiento. Al primoaislamiento se deben adicionar los siguientes antibióticos: Polimixina para inhibición de pseudomonas; Anfotericina para hongos; Vancomicina para microorganismos Gram-positivos; Trimetropin para Gram-negativos (Giono y cols. 1994, Kuster y cols. 2006, Parlapianno y cols. 2006^{44,68,105}).

Para el cultivo de *Helicobacter pylori* se utilizan medios complejos, sólidos, líquidos. Con suplementos como sangre o suero, dentro de los cuales podemos mencionar: sangre de caballo, hemoglobina, suero fetal bovino, carbón vegetal o emulsión de yema. Nutrientes: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio y bisulfito de sodio. Para una buena recuperación se adicionan antibióticos que minimizan la colonización de bacterias (Giono y cols. 2008, Navarro-Hernández y cols. 2007^{45,92}).

Medios sólidos más utilizados son: Agar Mueller Hinton, Agar Columbia, Suplementos con sangre y sus derivados. Otros suplementos y nutrientes: Suero de caballo, lisado de eritrocitos, hemina, extracto de levadura, peptona e isovitalex. La cantidad de sangre utilizada del 7-10 % mejora significativamente el crecimiento en comparación al 5%. El tipo de sangre se asocia a crecimiento más denso en sangre de caballo al 10% y lisada al 7%. Antibióticos adicionados son: vancomicina, trimetropin sulfa, polimixina y anfotericina B (Giono y cols. 2008, Navarro-Hernández y cols. 2007^{45,92}).

Goodwin, menciona que cuando *H. pylori* se cultiva en medios sólidos, las verdaderas formas espiraladas pueden ser escasas o estar ausentes, la cuales también aparecen después de la exposición a oxígeno, se asume que estas formas cocoideas son indicativas de un estado latente y sirven de supervivencia en condiciones ambientales desfavorables (Azevedo y cols. 2006, Mandado y cols. 2003^{7,78}).

Los medios selectivos son: Agar Wilkins-Chakgren con 10% de sangre de caballo o cordero/ antibiótico. Agar columbia con 10% de sangre de caballo o cordero / antibiótico. Agar *pylori*, suero de caballo, extracto de levadura y antibiótico (Navarro-Hernández y cols. 2007⁹²).

Navarro-Hernández y cols. 2007, reportan baja recuperación de *H. pylori* en tres medios de cultivos Agar: ATS, BHI, Brucella. Concluyendo en base a los resultados de su trabajo de investigación, ninguno de estos medios puede ser recomendado para el cultivo de esta bacteria, datos que difieren con otros autores (Navarro-Hernández y cols. 2007⁹²).

Tabla 9. Medios de cultivo útiles para el aislamiento de *Helicobacter pylori*

Medios sólidos con sangre de caballo	Medios líquidos con suero de caballo	Medios sólidos sin sangre de caballo
Caldo BHI con 10% de agar. **10% sangre, suplemento nutritivo(isovitalex), e indicador 2,3 difenil tetrazolium	Caldo BHI	Agar Columbia
Agar Brucella*	Caldo Mueller-Hinton	Hemina
Agar Mueller-Hinton	Caldo Brucella	Rojo fenol
Agar Skirrow	Caldo de soya-tripticasa	Isovitalex
Agar Columbia		Urea
Agar <i>Campylobacter</i> modificado		Agar Columbia
Agar chocolate		Carbón activado
Agar base GC		Piruvato de sodio, Hemina
Agar Casman 7.5%	Agar Casman 7.5%	
Base Agar sangre*		
Base Agar sangre con sangre desfibrinada de caballo		
Sangre de caballo lisada: Agar <i>Brucella</i> y Columbia		Kuster J. y cols. 2006

Referencias: Giono y cols. 1994, Matteo y cols. 2007,*Raczko y cols, 2005, **Parlapianno y cols. 2006^{44,81,105}.

Tabla 10. Concentración de sangre de caballo

Sangre laqueada	7.5%
Sangre de caballo	10%
Sangre de caballo	7.5%-10%

Referencias: Giono y cols. 2008, Raczko y cols, 2005^{45,110}.

Tabla 11. Medios de cultivo útiles para el aislamiento de *Helicobacter pylori*

Medios sólidos con sangre de carnero desfibrinada 10%	Agar Casman	Giono y cols. (2008).
Sangre de carnero 5%	Agar <i>Brucella</i>	Forbes y cols. (2002)
Sangre de carnero	Agar <i>Brucella</i>	Kuster y cols. (2006) Torres y cols. (2004).
Sangre de carnero 5%	Agar chocolate	Forbes y cols. (2002), Brooks y cols. (2004).
Sangre de carnero 5%	Agar Thayer-Martin	Forbes y cols. (2002).
Sangre de carnero 5%	Agar Columbia, 1% Vitox	Forbes y cols. (2002).
Sangre de carnero	Agar Columbia	Kuster y cols. (2006)
Medios líquidos con sangre de carnero		
Sangre de carnero 5% con suplemento selectivo (Oxiod, SR147E)	Agar soya tricaséina (Difco)	Sánchez del Monte J. y cols. (2006).
Otros		
Componentes	Medio de Skirrow	Brooks y cols. (2004), Kuster y cols. (2006)
Suero equino al 7% (Sigma)	Agar <i>Helicobacter pylori</i> (Lab M, UK) isovitalax al 1% (Oxoid) y suplemento selectivo <i>Campylobacter</i> (Merck)	Cittelly y cols. (2002).
Suplementados con nutrientes, siendo el más común el suero bovino fetal.	Es difícil de cultivar en medio líquido aunque se logra con menor dificultad a partir de caldo de <i>Brucella</i> , cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soya	López-Brea y cols. (2004), Kuster y cols. (2006)

Suero de caballo al 8%, isovitalex	Agar <i>H.pylori</i> Lab 140	Quiroga y cols. 2005
B- ciclodextrinas o isovitalex, carbón activado	Agar <i>Brucella</i> o Columbia, suplementado con suero bovino fetal	Kuster y cols. 2006
Sangre o derivados: suero de caballo, lisado de eritrocitos y hemina, extracto de levadura, peptona, e Isovitalex. Proporción al 7-10% mejora significativamente el crecimiento en comparación con el 5%. En segundo lugar el tipo de sangre utilizada, encontrándose un crecimiento más denso con sangre de caballo al 10% y lisada al 7%.	Medios de cultivo sólidos base más frecuentes son agar Mueller-Hinton y agar Columbia resultados no son mejores que los obtenidos con suero bovino fetal o sangre. Recientemente se ha mostrado prometedor en el cultivo del microorganismo un extracto obtenido de cianobacterias.	López-Brea y cols. (2004)
Adicionado con suero fetal bovino al 5%	Caldo <i>Brucella</i>	Torres y cols. (2004), Gancz y cols. (2008).
Sangre desfibrinada de conejo al 7%.	“Agar selectivo para <i>Campilobacter</i> ”	Chillihua y cols. (2003)
Sangre de carnero, caballo, humana o productos derivados de la sangre.	Medio rico en nutrientes Medios selectivos	Paredes y cols. 2007
Suplemento selectivo con suero fetal bovino	Caldo de <i>Brucella</i> (BBL)	Sánchez del Monte y cols. (2006).
B- ciclodextrina, colesterol, suero fetal bovino	Medio Ham's F12	Ramos y cols. , (2004)
	Agar Belo Horizonte	Parlapianno y cols. (2006).

Se ha reportado que el método de esterilización del equipo de endoscopia no modifica de manera significativa la sensibilidad del cultivo. Sin embargo, para realizar el cultivo de *H. pylori*, se recomienda utilizar medio selectivo para evitar contaminaciones con otros microorganismos (Gómez, 2001, Paredes y cols. 2007^{46,104}).

Tabla 12. Comparación de inhibidores utilizados para el cultivo de *H. pylori*.

Inhibidores			
Inhibidores Skirrow	Vancomicina	5.0 mg,	Giono y cols. (2008), Kuster y

B-D como Campy BAP	Polimixina B 1250 UI/L, Trimetoprim 2.5 mg/L	cols. (2006), Brooks y cols. (2004), Parlapianno y cols. (2006).
Blaser	Trimetoprim 5 mg/L, Polimixina B 2500 UI/L Cefalotina 15 mg/L Anfotericina B 2mg/L.	Giono y cols. (2008), Giono y cols. (1994), Kuster y cols. (2006)
	Vancomicina, ácido nalidíxico, anfotericina.	Brooks y cols. (2004)
	Utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad. H. pylori es resistente In vitro a la vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cefsulodina y polimixina B, los cuales pueden utilizarse en los medios selectivos para su aislamiento.	López-Brea y cols. (2004)
Thayer-Martin	Vancomicina, Colistina y Nistatina	Chillihua y cols. (2003), Murray y cols. (2003)
	Kanamicina y/o cloramfenicol	Raczko y cols. , (2005)
	Vancomicina	Sánchez del Monte y cols. (2006), Gancz y cols. (2008).
Suplemento selectivo para campilobacter (Merck)		Quiroga y cols. (2005)
	Anfotericina y Vancomicina	Matteo y cols. (2007)

Su cultivo presenta algunas dificultades, ya que requiere un tiempo de incubación superior al de la mayoría de las bacterias, es decir, 5 días en vez de 24 horas; además, se debe utilizar medios de cultivo enriquecidos. Por lo cual el cultivo, solo se recomienda para estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos (Martínez y cols. 2002, Navarro-Hernández y cols. 2007^{80,92}).

Tabla 13. Comparación entre las diferentes condiciones de incubación del cultivo.

Temperatura	Ambiente microaerofílico	Días de incubación	Referencia
37 °C	CO ₂ 10%	3-5 días	Giono y cols. 2008
37 °C	5% de O ₂ , 10% de CO ₂ y 85% N ₂	7-10 días	Gancz y cols. (2008).
34 a 40 °C. 37 °C (crecimiento óptimo)	2-5% de O ₂ , 5-10% de CO ₂ , 85% N ₂ .	3-14 días (crecimiento de 1-3	Kuster y cols. 2006).

	Humidificado	días)	
35-37 °C	Humidificado	4-7 días	Forbes y cols. (2002)
37°C		3-6 días	Brooks y cols. (2004), Cittelly y cols. (2002).
37°C	5-10% de O ₂ , 5-10% de CO ₂ y 80-90% de N ₂ , 95% humedad, cabinas o sobres comerciales.	Hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo.	Mandado y cols. (2003)
37°C	Fco. Vidrio, Vela encendida, una tableta de Alka Seltzer en una bolsa plástica pequeña con 15 ml de agua (5% O ₂ , 10% CO ₂ , 85% N ₂).	Durante 7 días. Identificación: 3-7 días. Promedio 4.6 días.	Chillihua y cols. (2003)
Temperatura óptima 37°C , no crece ni a 25 °C ni a 42 °C		3 a 7 días	Buckley y cols. 1998, Giono y cols. (1994), Fox y cols (1989).
35 °C	Baja concentración de O ₂ y 5-10% CO ₂	7 a 10 días	Paredes y cols.(2007)
37°C	Jarra de cultivo anaeróbico, utilizando sistema GasPak (BBL). CO ₂ 10%.	2-5 días	Sánchez del Monte y cols. (2006), Torres y cols. (2004).
37°C	Sistemas generadores CO ₂ (Gaspak o Campygen Oxoid).	5-7 días	Aguilar y cols. (2004).
	15% de CO ₂ y 5%O ₂	10 días	Quiroga y cols. (2005)

*Espacios en blanco: son condiciones que no reportan los autores.

El cultivo sería el método diagnóstico idóneo, pero no se aplica a la práctica diaria, porque la técnica es cara, trabajosa, lenta y sólo especialistas de mucha experiencia logran altos niveles de sensibilidad (Mandado y cols. 2003⁷⁸). Es importante considerar los porcentajes positivos reportada en estudios previos dentro de los cuales podemos mencionar a Chillihua D. y cols. (2003), reportan de 75 pacientes el 69.4% positivos. En Canadá de 71 pacientes es de 40.8% positivos y en Inglaterra de 21 pacientes de 38.0 % positivos. Existen diversos factores que influyen en obtener una baja recuperación en muestras clínicas sometidas a cultivo dentro de los cuales se encuentran: Distribución parcelar, anestésico local, antibióticos previos. Por lo cual se recomienda que el cultivo se realice de parte de la biopsia obteniéndose un mayor número de colonias (Aguilar y cols. 2004, Chillihua y cols. 2003, Mandado y cols. 2003^{3,21,78}).

Otro factor determinante como se menciona anteriormente, consiste en la propiedad de *H. pylori* para no propagarse por toda la mucosa gástrica, generalmente lo hace en forma de “parches” y esto puede ser la causa de falsos negativos en reiteradas ocasiones, al no tomarse una biopsia con cantidad significativa de microorganismos. Por lo que la distribución de este patógeno en el estómago es en forma de parche, esto hace que el muestreo por endoscopia sea erróneo, resultando falsos negativos en ureasa y cultivo (Aguilar y cols. 2004, Chillahua y cols. (2003), Mandado y cols. 2003^{3,21,78}).

Para la conservación de cepas existen diversos medios, diferentes tipos de sangre, leche descremada, conservadores comerciales y caldos de cultivo con glicerol a diferentes concentraciones, variando su almacenaje de -20 °C a -196 °C y su viabilidad. Se utilizan: Mucina de cerdo al 10%, Suero fetal bovino -70 °C y 193% C, Liofilización (utilizando ácido L-glutámico al 20%, viabilidad por 7 años a -20 °C) (Giono y cols. 1994⁴⁴).

Tabla 14. Medios de conservación de *Helicobacter pylori*

-20°C	Liofilización con uso de ácido glutámico al 20%
-40 °C	Con glicerol: suero de ternera fetal 25%, BHI 15%, sangre de caballo al 10% y caldo peptonado 1%/25%.
	Sin Glicerol: Suero de caballo, leche descremada, sangre de caballo, Sangre de bovino, sangre de carnero, mucina de estómago de cerdo, Campylobacter Albimi cysteine.
-196 C	Con glicerol: Caldo nutritivo 10%, Caldo nutritivo con perlas de vidrio/ 10% y BHI/30%.
	Sin glicerol: Caldo Brucella
-70° C	En criotubos de 1.5 mL. Cada criotubo contenía 800µL de caldo Brucella con suero fetal bovino al 10% y 25% de glicerol.
-80°C*	Infusión de cerebro-corazón, caldo Brucella, suplementado con 15 a 20% de glicerol. Para la viabilidad óptima se requieren cultivos menores a 48 horas (Más del 90% de formas espirales).
-70 °C**	Caldo Brucella (Difco, EUA) con suero fetal de ternera al 10% y glicerol al 15%, hasta su uso.

Referencia: Giono y cols. (1994) *Kuster y cols. 2006, **Torres J. y cols. (2004)
44,68,138

Citología gástrica por cepillado: En el diagnóstico morfológico de *H. pylori* mediante la citología gástrica por cepillado en pacientes con gastritis crónica y/o úlcera gástrica, Mandado y cols. reportan la presencia de bacterias espiraladas en forma de S simple o doble en medio del mucus gástrico o células glandulares,

cocos, bacilos, monilias, infiltrado inflamatorio y material necrótico. Bacilos y diplococos cubrían las células escamosas (contaminación). Citología exfoliativa mostro una sensibilidad de 72%, especificidad 100% y eficiencia 77% en relación con la histología “Prueba de oro”, debido a que el cultivo no se realiza de manera rutinaria. Considerando que *H. pylori* tiene colonización en parches, una de las principales ventajas es que abarca mayor superficie. Informan sobre la presencia de *H. heilmannii*, lo cual nos sugiere que “no siempre *H. pylori* es la bacteria responsable de la presencia de ureasa en el estómago humano”. *H. pylori* con azul de metileno al 2% se detecto en un 65%. Concluyen que es la técnica de tinción que ofrece mayor contraste, resalta la morfología, es sencilla y barata (Aguilar y cols. 2004, Mandado y cols. 2003^{3,78}).

Prueba de la ureasa: Se ha extendido mucho el empleo de pruebas rápidas en las muestras para la presunta identificación de *H. pylori* mediante la detección de la actividad de la ureasa, no es costosa y permite tener un diagnóstico en un corto tiempo. El material de la biopsia gástrica puede colocarse sobre un medio que contenga urea y un indicador de color. *H. pylori* hidroliza la urea por la producción de la ureasa, produciendo iones amonio, aumenta el pH de la solución (viraje en el color del indicador). Las más utilizadas CLO-Test, caldo de Christensen y soluciones de urea (Brooks y cols. 2002, Castro y cols. 2004, Cervantes, 2006^{15,18,20}).

En Cuba, desde 1991 se ha implementado el método rápido de la ureasa utilizando Urepyl-L 25,27—diagnóstico enzimático. Se agrega un fragmento de la mucosa gástrica, una solución sustrato amarilla pajiza en presencia de la ureasa cambia a color rosado rojizo (Mandado y cols. 2003⁷⁸). Sin embargo, en los pacientes con úlceras gastroduodenal disminuye la sensibilidad (falsos-negativos) de esta prueba, debido a que intervienen otros factores como puede ser el sangrado o la terapia con inhibidores de la bomba de protones como omeprazol, lanzoprazol o pantoprazol. Se reporto en un estudio comparativo de ureasa en placa dental y cultivo, que el test de ureasa fue positivo en un 99.3%, pero no hubo aislamiento de *H. pylori* en ninguno de los pacientes estudiados, por lo cual consideran que el test de ureasa no es un método diagnóstico específico para la detección de este microorganismo (Castro y cols. 2004¹⁸).

Para el diagnóstico de *H. pylori* en la práctica clínica, el test de ureasa es barato, rápido y fácil de realizarse, pero no se tienen datos sobre la intensidad de la inflamación. Falsos-positivos pueden ocurrir debido a la presencia de otros organismos productores de ureasa. La presencia de otras bacterias nos pueden ocasionar resultados falsos positivos de ureasa, como las siguientes: *H. heilmannii* (reportado mediante tinción de citología gástrica en Cuba, 2003), *H. felis* (de estas dos especies bacterianas sus hospederos habituales son los animales domésticos como perros y gatos) y no han podido ser cultivadas In vitro. Algunas de las especies bacterianas más frecuentemente halladas en el jugo gástrico (deglutidos con la saliva o moco nasal), flora ambiental y del intestino de los seres humanos como son *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *estafilococos* y *estreptococos*. Lo

anterior sucede cuando el pH se mantiene por arriba de 4, estableciéndose una flora residente que en adición a los microorganismos orales hace que aparezcan estas especies (Díaz y cols. 1998, Mandado y cols. 2003^{29,78})

Pruebas moleculares: Reacción en cadena de polimerasa (PCR). Consiste en la amplificación de fragmento de DNA. Los fragmentos que más se han estudiado son los del gen de subunidades A y (A y B) de la ureasa. El fragmento del DNA Ag especie-específico de *H. pylori*. Todos tienen el 100% de especificidad y se detectan hasta con un mínimo de 10 a 70 bacterias. El DNA bacteriano en placa dental y saliva, con una especificidad menor que en biopsias (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994^{3,44}).

Esta prueba por lo general se realiza en estudios de investigación, ya que requiere de un equipo sofisticado y personal capacitado. Tiene una sensibilidad y especificidad elevadas, cercanas al 100%. Existen diferentes aspectos técnicos que pueden influir en la variabilidad y reproducibilidad de sus resultados. Algunos estudios reportan la posibilidad de obtener falsos positivos y en variantes como PCR en saliva, en la cual algunos investigadores no han podido detectarla en saliva incluso en los pacientes con infección gástrica. Los genes *rRNA* 16s *rRNA*, *ureA* y el *glmM* han sido utilizados para identificación de la bacteria. Sin embargo, Perrone M. y cols. (2006) reportan que solo 1/69 muestras (1,4%) fueron positivas para la amplificación de *glmM*, obtenidas de muestras de placa dental, en esta investigación la prevalencia de la bacteria fue muy baja, no pudiéndose identificar los genotipos más frecuentes en este tipo de muestra biológica. Su uso es por la alta sensibilidad, el PCR es muy utilizado en estudios epidemiológicos ligados a la identificación de reservorios ambientales, y también en trabajos de determinación del modo de transmisión de esta bacteria. (Cava y Cobas G. 2003, Cervantes. 2006, Giono y cols. 1994, Perrone y cols. 2006^{19,20,44,106}).

El hallazgo de *Helicobacter* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva: también se apoya en reacciones positivas de ureasa en muestra de saliva; pero otras bacterias de la flora oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada (Rivas y Hernández, 2000¹¹⁷).

La dificultad de aislar *Helicobacter pylori* a partir de heces se relaciona con su alta susceptibilidad *In vitro* a los antimicrobianos empleados en medios de cultivos selectivos. Por otra parte, los métodos de PCR han permitido su identificación en heces; no obstante, estas técnicas han enfrentado limitaciones debido a metabolitos como polisacáridos ácidos que han llevado a resultados erráticos (Rivas y Hernández, 2000¹¹⁷).

Resultados de un estudio realizado en México en el 2006, indicaron que las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes, dieron un mayor porcentaje de polimorfismo en los tres genes asociados a virulencia, *cag A*, *bab A*, *oipA* que el observado en otras cepas de origen occidental (Giono y cols. 2006⁴³).

Las técnicas de Biología Molecular actualmente tienen las desventajas siguientes: alto costo, áreas específicas para el manejo de la muestra. El material es sensible a contaminación. Se requiere contar con el cultivo bacteriano, para la obtención de la muestra del uso de métodos invasivos y la sensibilidad depende que la muestra sea representativa (Giono y cols. 1994 ⁴⁴).

La hibridación *In situ*. permite identificar la presencia de *H. pylori* en biopsias de antro gástrico. Se basa en la Hibridación de sondas marcadas con ³²P de DNA genómico de la bacteria y oligonucleótidos producidos para una secuencia específica del RNAr (16S). Es un método más sensible que específico. Una de sus desventajas es que requiere de uso de radiactividad. Algunos marcadores no radiactivos son la biotina, peroxidasa y digoxigenina (Giono y cols. 1994 ⁴⁴), su costo es muy elevado.

Métodos indirectos o no invasivos

Comprenden todos los métodos diagnósticos que no requieren de la realización de métodos endoscópicos ni la toma de biopsia. Dentro de los cuales podemos citar la detección de anticuerpos específicos contra algunas estructuras de Hp (pruebas de aglutinación, de fijación de complemento y ensayo inmunoenzimático (ELISA), detección de productos de la bacteria como es la ureasa en la prueba de aliento (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994 ^{3,44}).

1) **Inmunofluorescencia indirecta.** Se basa en la reacción Antígeno-Anticuerpo. Mediante la detección de anti-anticuerpos marcados con fluoresceína. Tiene una sensibilidad del 93-96% y una especificidad del 95-98% (Giono y cols. 1994 ⁴⁴).

2) **Prueba el aliento con urea marcada (¹³C ó ¹⁴C):** fácil de realizar, sin molestias y bien tolerada. Si hay *H. pylori* la actividad de la ureasa genera CO₂ marcado que puede detectarse en el aire espirado por el paciente. Detecta la infección activa con pequeñas cantidades del microorganismo. Las muestras son analizadas por un contador de centelleo para ¹⁴C o espectrofotometría de masas para ¹³C. Este último isótopo por ser más estable, puede ser usado en niños y mujeres embarazadas. Tiene una sensibilidad 97% y especificidad del 80%. Sus ventajas son que es una prueba rápida, no invasiva, de gran utilidad para el seguimiento de la terapia antimicrobiana. Unas de sus desventajas son el costo y la utilización de material radiactivo. Además, pueden ocurrir falsos-positivos debido a la hidrólisis de la urea por bacterias de la cavidad oral, o falsos-negativos en el caso que el examen sea después de una semana del uso de bismuto, o antimicrobianos o después de una cirugía gástrica. (Aguilar y cols. 2004, Brooks y cols. 2002, Cervantes, 2006, Giono y cols. 1994 ^{3,15,20,44}).

3) **Serología:** Se han desarrollado varios análisis para detectar anticuerpos específicos contra antígenos de *Helicobacter pylori*. Es una

prueba sencilla y barata basada en la detección de anticuerpos específicos contra antígenos de *Helicobacter pylori*, debida a una reacción inmunológica del individuo. Este examen se basa en la detección de anticuerpos específicos [inmunoglobulina G (IgG)] contra esta bacteria, encontradas en las muestras de suero de las personas infectadas. Esta técnica no diferencia entre infección activa y enfermedad de pacientes infectados pero que son asintomáticos por tanto la función de las pruebas de anticuerpos en el diagnóstico de infección activa o después del tratamiento es limitada, ya que la mayoría de los pacientes es necesario de 6 a 12 meses para que la reacción de IgG baje a 50%, o a valores mas bajos, anteriores al tratamiento (Aguilar y cols. 2004, Brooks y cols. 2002, Cervantes , 2006, Giono y cols. 1994^{3,15,20,44}).

Se ha demostrado que niveles de anticuerpos contra *H. pylori* se asocian en individuos infectados con sintomatología no así en individuos asintomáticos. La sensibilidad e especificidad varía de acuerdo al antígeno utilizado. La sensibilidad se encuentra alrededor del 96% y especificidad superior al 80%. La ventaja es que son métodos rápidos y no invasivos. Su desventaja es que no permiten la diferenciación entre infección activa y anterior (Giono y cols. 1994⁴⁴).

4) **Detección de anticuerpos en suero:** Aglutinación, fijación del complemento, ELISA, Detección de anticuerpos (Ab) específicos para *Helicobacter pylori*, Antígenos de bacterias completas, formiladas, sonicado, proteínas de superficie extraídas con glicina ácida y ureasa, Antígeno extraído de la ureasa es el más específico (98.7%) (Aguilar y cols. 2004, Giono y cols. 1994^{3,44}).

5) **Detección de anticuerpos en otros fluidos biológicos.** Sistemas de colección de saliva y exudados de encías para medir Anticuerpos de IgG por método de ELISA. Esta técnica se ha utilizado en pacientes con VIH mostrando una sensibilidad 99.5% y especificidad 98.7%. Sus ventajas son que es un método rápido, sencillo, no invasivo (Giono y cols. 1994⁴⁴).

6) **Detección del antígeno de *H. pylori* en muestras de materia fecal:** es un método apropiado para verificar la curación de pacientes con infección conocida por *H. pylori*, quienes ya se sometieron a tratamiento (Brooks y cols. 2002¹⁵).

Para elegir uno u otro método hay que tener en cuenta el objetivo del diagnóstico (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro que realice el estudio (experiencia del personal y disponibilidad de medios) y las características del paciente (prevalencia de *H. pylori* en la población, edad del paciente, medicación previa, etc.). No se debe olvidar que mientras que todos los métodos pueden servir para diagnosticar la infección por *H. pylori* (con diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad), la endoscopia con toma de biopsia para estudio histológico permite además diagnosticar el tipo de enfermedad. Por

otra parte, el cultivo es imprescindible para conocer la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de aplicar el tratamiento más efectivo en cada paciente, pero también para conocer los porcentajes de sensibilidad en cada población.

15. Tratamiento

H. pylori es sensible amplia variedad de antimicrobianos *In vitro*, sin embargo no son efectivos *In vivo*. La actividad farmacológica se modifica por el pH del estómago y modificaciones de la secreción gástrica. La combinación de medicamentos es más efectiva que su uso individual. Se sabe que la densidad bacteriana, no se relaciona con la respuesta al tratamiento (Giono y cols. 1994, Sánchez del Monte y cols. 2006^{44,128}).

En los últimos años se han realizado diferentes reuniones de consenso sobre la infección por *H. pylori*. Entre ellas destacan la del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. por ser el primero que recomendó el tratamiento erradicador en pacientes infectados por *H. pylori* y úlcera duodenal, pero también las que se realizaron en Canadá en 1997 y 1999, el Consenso Asiático (Asia Pacific Consensus Conference, 1999), el Consenso Latino-americano (2000), el Consenso Europeo (Europeo: Maastrich Consensus, 1997 y 2000), y el Consenso Español (1999) (Fendrick A. y cols. 1997, Lozano J. y cols. 2006, Rollán R, y cols. 1994^{33,75,123}).

El Consenso Mexicano realizado en el 2007 considera que el tratamiento para la erradicación de *H. pylori* esta absolutamente indicado en los siguientes pacientes:

- Úlcera péptica gástrica o duodenal activa o no, con o sin complicaciones asociadas.
- En presencia de complicaciones primero estas deberán resolverse y luego iniciarse el tratamiento de erradicación. Se recomienda iniciar el esquema cuando los síntomas hayan desaparecido para favorecer el apego.
- Gastritis atrófica y metaplasia intestinal.
- Linfoma gástrico tipo B de la zona marginal tipo MALT.
- Después de una resección gástrica por cáncer.
- Familiares de primer grado de personas que han tenido cáncer gástrico y tienen *H. pylori*.

- Uso crónico de inhibidores de la bomba de protones.
- Uso crónico de AINEs en pacientes con antecedentes de úlcera péptica, con sin complicaciones y factores de riesgo asociados.
- Púrpura trombocitopénica idiopática y anemia por deficiencia de hierro de causa no precisada.
- No se llega a consenso en cuanto al tratamiento de enfermos con gastropatía nodular.

Se consideran indicaciones relativas:

- Uso crónico de AINEs en pacientes sin antecedentes de úlcera péptica y factores de riesgo asociados.
- Solicitud expresa de la persona (Abdo y cols. 2007 ¹).

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 o 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso, que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. Numerosos antimicrobianos han demostrado actividad *in vitro* frente a *H. pylori*. Sin embargo, cuando se han aplicado en pautas de tratamiento han demostrado escasa actividad. Entre los antimicrobianos que han mostrado buena utilidad clínica se encuentran: amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina. La furazolidona, rifabutina o las fluoroquinolonas son otras opciones terapéuticas (Giono y cols. 1994, Sánchez del Monte y cols. 2006 ^{44,128}).

Entre los compuestos anti-ulcerosos se han utilizado con preferencia inhibidores de la bomba de protones (IBP) (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol), seguido de compuestos de bismuto (citrato de bismuto, salicilato de bismuto, ranitidina citrato de bismuto) y en mucha menor frecuencia los antagonistas de los receptores H₂ (ranitidina, cimetidina, famotidina, etc) (Giono y cols. 1994, Sánchez del Monte y cols. 2006 ^{44,128}).

La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 10 días, aunque algunos autores han probado pautas cortas, de 3 a 5 días que incluyen 3 antibióticos y otros recomiendan pautas largas, de 10 a 14 días (Kasper y cols. 2005, Peterson y cols. 2000 ^{65,107}).

Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. Se recomienda la pauta de tratamiento triple con un IBP y dos antimicrobianos como primera opción. Si este tratamiento falla, se debe evitar repetir dos veces la misma pauta y recomienda realizar estudios microbiológicos antes de iniciar una nueva pauta (Kobayashi y cols. 2007, Rodgers y cols. 2007 ^{67,120}).

Tratamiento de primera elección

La primera pauta eficaz utilizada fue la "triple clásica" que asocia un imidazol (metronidazol o tinidazol) con tetraciclina y amoxicilina (1 g dos veces al día) durante dos semanas. Ésta fue sustituida por otras que combinan un IBP (normalmente omeprazol) con dos antibióticos (fundamentalmente amoxicilina, claritromicina y metronidazol). Son más fáciles y cómodas para el paciente, logrando tasas de erradicación superiores al 90%. La asociación de un IBP (generalmente omeprazol) con claritromicina y amoxicilina (conocida como la OCA) es la pauta más utilizada. También se puede utilizar una triple terapia con un IBP, amoxicilina y metronidazol. Es preferible reservar la pauta que incluye IBP

con metronidazol y claritromicina como de segunda línea para evitar que se pueda desarrollar resistencia a los dos antimicrobianos (Abdo y cols. 2007, Kasper y cols. 2005, Nyrén y cols. 2006, Rodgers y cols. 2007^{1,65,98,120}).

Tratamiento de segunda elección

La combinación de un IBP y dos antibióticos con las sales de bismuto se conoce como "terapia cuádruple", alcanza altas tasas de erradicación pero debe reservarse también para cuando fallen otras terapias. Recientemente se han propuesto pautas que asocian un IBP con fármacos como rifabutina o levofloxacino y amoxicilina, aunque con ellas se tiene todavía poca experiencia (Abdo y cols. 2007, Kasper y cols. 2005, Rodgers y cols. 2007^{1,65,120}).

Tratamiento secuencial

Se inicia con inhibidores de la bomba de protones (IBP) en dosis dobles, y amoxicilina 1 g dos veces al día durante cinco días, seguido por IBP en doble dosis más claritromicina y tinidazol 500 mg dos veces al día y 1 g dos veces al día respectivamente por cinco días (Abdo y cols. 2007¹).

Tratamiento de tercera elección

IBP en doble dosis más azitromicina, 500 mg al día por tres días, seguidos de IBP en dosis doble más furazolidona, 200 mg tres veces al día, por 10 días (Abdo y cols. 2007¹).

La adhesión al tratamiento y la resistencia al metronidazol son los factores que tienen mayor influencia en la tasa de erradicación. El método estándar en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* está constituido por la así llamada "triple terapia". Sin embargo, la resistencia a antibióticos esta alterando la eficacia del tratamiento de erradicación y el tratamiento en individuos asintomáticos sigue siendo discutible (García C. y cols. 2003, Giono y cols. 2006, Kobayashi y cols. 2007, Rollán, 1994^{41,43,67,123}).

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento, factores del paciente y factores de las cepas. Entre los primeros podemos citar las dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento y el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones utilizado. Entre los factores del paciente destaca el cumplimiento del tratamiento (por el elevado número de dosis, por los efectos secundarios, etc.) y el país donde se realizó el ensayo. Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa (Abdo y cols. 2007, López-Brea, 2005^{1,73}).

Algunos de los factores que más influyen en el apego al tratamiento de erradicación son el número de tabletas que el paciente tiene que ingerir al día y la aparición de efectos adversos, entre los que se encuentran: diarrea, alteraciones del gusto, náusea o vómito, dolor epigástrico, cefalea, estomatitis y erupción cutánea. De manera general se considera que son leves y transitorios, y la suspensión del tratamiento se reporta que es menor al 10% (Abdo y cols. 2007¹).

El desarrollo de resistencia a amoxicilina y tetraciclina es poco frecuente. Sin embargo, la resistencia al metronidazol es muy elevada en algunas poblaciones y a la claritromicina está aumentando en diferentes poblaciones, siendo un problema cada vez mayor. La infección por cepas resistentes a claritromicina o a metronidazol supone una importante contrariedad porque se relaciona con fallo del tratamiento (Kobayashi y cols. 2007, López-Brea, 2005^{67,73}).

Un estudio realizado en México en el 2006 reportó que no existe diferencia en la sensibilidad entre la población mestiza y las poblaciones indígenas. A pesar de que la población mestiza ha sido sometida a múltiples tratamientos antimicrobianos, lo que ha favorecido la selección de cepas resistentes, en cambio la población indígena ha tenido menos acceso a los tratamientos con antibióticos. La erradicación da como resultado una disminución de la gastritis, cicatrización de úlceras y remisión de maltomas (MALT), así como la disminución de recaídas. El potencial efecto benéfico de la erradicación de la bacteria en la prevención del cáncer gástrico aún no ha sido demostrado. (Ladrón de Guevara y cols. 2004, País y cols. 2006, Torres y cols. 2004^{69,101,138}).

Se ha reportado que las recaídas posteriores al tratamiento de erradicación son para úlcera duodenal (2.6%) y de úlcera gástrica (2%), son significativamente más bajas que las observadas en pacientes en quienes no se eliminó la infección (58% y 53% respectivamente). Eliminar la infección por *H. pylori* reduce la necesidad de usar medicamentos para contrarrestar la acidez. Las tasas de erradicación varían desde el 1 al 20%, y esta variación depende de la terapia que se utilice y de la existencia de resistencia a los antimicrobianos. Además, es importante lograr diferenciar entre reinfección y recrudescencia y para esto, es necesario cultivar las cepas de *H. pylori* aisladas antes del tratamiento de erradicación y compararlas con las cepas aisladas después de tratamiento, empleando diferentes métodos de genotipificación y fenotipificación, para definir si se trata de la misma cepa (recrudescencia) o de cepas diferentes (reinfección) (Torres y cols. 2004¹³⁸).

16. Prevención

Debido a que la infección *H. pylori* constituye un problema de salud pública y que adquiere desde edades tempranas de la vida, es de suma importancia considerar los factores de riesgo principales para establecer medidas de prevención en la población general como son evaluar cada niño basados en

factores como: genotipo, dieta, región geográfica, prevalencia de enfermedades particulares en su comunidad, prescribir una cepa o cepas de esta bacteria para colonizar el estómago y así optimizar sus oportunidades de salud (desarrollo de vacunas) (González C. y cols. 2004 ⁴⁷).

Con el incremento de control de parámetros del agua y la calidad de los alimentos se observó durante el siglo pasado, una disminución de la colonización por *H. pylori* en países desarrollados (Azevedo N. y cols. 2006 ⁷).

17. Parámetros para realizar la estandarización de una metodología de cultivo bacteriano

El control de reactivos, colorantes, medios de cultivo y patrones de referencia constituye uno de los parámetros más importantes para garantizar la calidad de las investigaciones en el campo de la microbiología (Weng y cols. 2004 ¹⁴⁷).

El empleo de cepas aisladas como microorganismos de ensayo en los laboratorios, que garanticen la calidad de los medios de cultivo y reactivos, es una alternativa posible cuando se tienen limitaciones en la adquisición de material biológico certificado, siempre que la pureza y estabilidad de las cepas sean garantizadas (Weng y cols. 2004 ¹⁴⁷).

Existe la necesidad en los laboratorios de análisis clínicos de poseer un control de calidad en el área de microbiología que evalúe las etapas de aislamiento e identificación de microorganismos en muestras biológicas. En México, el control de la calidad de los medios de cultivos esta establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA-93. Medios de cultivos, en la cual se describen las especificaciones que deben de tener los medios de cultivos para microorganismos en general (Zarate M.S. y cols. 2007 ¹⁵¹).

Los diferentes medios y técnicas de cultivo son esenciales en el laboratorio de Microbiología de un hospital, pues sirven para identificar las bacterias causantes de las enfermedades infecciosas y los antibióticos a los que son sensibles esas bacterias (Zarate y cols. 2007 ¹⁵¹).

Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de una cepa aislada. Se deberá evitar realizar el antibiograma en forma directa a partir del material clínico. En el caso de que la naturaleza de la infección se desconozca y la muestra contenga un cultivo mixto o flora normal en el cual el microorganismo probablemente guarde poca relación con el proceso infeccioso a ser tratado, las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos no son necesarias y el informe de los resultados obtenidos puede llevar a interpretaciones inadecuadas. Estas pruebas son también la base del control epidemiológico de las bacterias patógenas para el hombre. Tal control suministra un punto de partida para elegir adecuadamente un tratamiento empírico (primera línea de terapia) y para detectar

la aparición y/o la diseminación de cepas bacterianas resistentes así como los determinantes de la resistencia en diferentes especies de bacterias (Manual de la OIE. 2004, NCCLS- 2001^{79,93}).

La selección de una metodología apropiada debe estar basada en los siguientes principios:

- Facilidad de realización
- Flexibilidad
- Adaptación a sistemas automatizados o semiautomatizados
- Costo
- Reproducibilidad
- Fiabilidad
- Exactitud

Estructura organizativa de un laboratorio de Microbiología

Debe contar con tres zonas diferentes para la realización de las siguientes actividades: lavado y preparación del material a esterilizar y del equipo, de preparación de medios de cultivos, disoluciones y diluciones necesarias. Y por último una zona o cuarto de siembra con temperatura controlada para transferir los cultivos microbianos o manipular materiales patógenos (Robert y cols. 2006¹¹⁸).

Control de Calidad

Cepa de Referencia

Este control se realiza utilizando cepas control de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection o ATCC) o de alguna otra institución internacional que se dedique a la producción y mantenimiento de cepas bacterianas. Estas cepas, presentan patrones de sensibilidad conocidos, por lo que al montar una prueba de sensibilidad, ésta debe encontrarse dentro de los límites máximos o mínimos impuestos por las regulaciones internacionales. Debe ser efectuado al menos una vez por semana, cada vez que se cambia el lote del medio del cultivo o se prepara medio fresco y cada vez que se cambia un antibiótico o se inicie el uso de uno nuevo (Herrera y cols. 1999, NOM-065-SSA-93^{56,97}).

Reactivos

Medios de cultivos

El medio de cultivo es el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar microorganismo, así como efectuar pruebas de susceptibilidad. Generalmente se presenta desecado en forma de polvo fino o granular. Puede presentarse también hidratado y preparado (Análisis aspecto del medio). Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne; y deben contener una serie de compuestos que se emplean como fuente de energía, y para sintetizar los constituyentes celulares, estos son el agua, C, N, S, P, Ca, K, Na, Mg, Mo, Cu y Zn (NOM-065-SSA-93⁹⁷).

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial deben de reunir una serie de condiciones como son: Temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (NOM-065-SSA-93⁹⁷).

La mayoría de las bacterias patógenas requieren de nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso la base de muchos medios de cultivos es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes (NOM-065-SSA-93⁹⁷).

Por su aspecto físico los cultivos preparados pueden ser:

- Líquidos. Se emplean fundamentalmente para cultivar microorganismos y obtener grandes cantidades de los mismos, estimular y promover la selección de uno e identificación mediante pruebas bioquímicas (no contiene agar-agar).
- Semisólidos. Se utilizan para identificaciones bioquímicas y movilidad.
- Sólidos. Se usan para obtener colonias aisladas de microorganismos. Contiene entre 1.5 a 2% de agar-agar. Constituyen la mayor parte de los medios de cultivos que se emplean en Microbiología (NOM-065-SSA-93⁹⁷).

En función de su composición, distinguimos dos grupos de medios de cultivo:

- Medios sintéticos o definidos: Son aquellos que contienen cantidades precisas de sustancias orgánicas e inorgánicas puras disueltas en agua destilada.

- Medios complejos o indefinidos: Contienen sustancias altamente nutritivas, pero de composición indefinida. Suelen llevar sustancias como extractos de carne, peptona, extractos de levadura, entre otros. La ventaja de este medio de cultivo es que contiene muchos factores de crecimiento, por lo que podemos cultivar un gran número de microorganismos.

Por su uso se clasifican en:

- Medios selectivos. Sólidos que contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos microorganismos, permiten aislar y recuperar el germen de interés.
- Medios selectivos de enriquecimiento. Sólidos o líquidos que estimulan la multiplicación de algún germen (determinado) e inhiben la producción de otros. Algunos microorganismos no son capaces de desarrollarse en medios de cultivo normales. Para cultivarlos necesitamos añadir sustancias altamente nutritivas como sangre, suero, extractos de tejidos animales, etc. Los microorganismos que crecen en ellos son microorganismos *exigentes* o *fastidiosos*.
- Medios para cultivar gérmenes anaerobios. Para aquellos microorganismos que requieren condiciones de anaerobiosis o microaerofilia.
- Medios diferenciales. Contienen distintos compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquiere coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada.
- Medios de transporte, sirven para transportar los especímenes que contienen a los microorganismos del sitio de toma del producto hasta el laboratorio donde va a efectuarse el estudio. Estos impiden que se altere la proporción original de la flora microbiana de los especímenes. La muestra debe ser recolectada en el medio adecuado para la supervivencia y transportada dentro de un marco de tiempo y a una temperatura que asegure que el microorganismo está en buenas condiciones. Este paso es fundamental para poder obtener una buena muestra, y posteriormente realizar las pruebas de laboratorio (Nelson A. y cols. 2007, NOM-065-SSA-93⁹⁷).

Muestreo

El muestreo del medio debe realizarse de acuerdo con Norma Oficial Mexicana NOM-Z-12 “Muestreo para la Inspección por Atributos”, parte 1 y 2. La viabilidad de los medios debe probarse con cultivos tipo de microorganismos de la ATCC u otras cepas certificadas (Análisis comportamiento del medio). Centros de referencia de cultivos tipo SSA o IMSS (NOM-065-SSA-93⁹⁷).

Los medios de cultivo para poder ser utilizados y garantizar que los resultados obtenidos a partir de ellos sean confiables deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Disponibilidad de nutrientes
- Consistencia adecuada del medio
- Presencia o ausencia de Oxígeno y otros gases
- Condiciones adecuadas de humedad (mantener en frigorífico)
- Luz ambiental
- pH adecuado.
- Temperatura
- Esterilidad (Análisis de esterilidad del medio).

Evitar contaminaciones

Uno de los problemas más frecuentes en el cultivo a partir de tejidos en general es el de las contaminaciones. Tanto la mayoría de las bacterias como las levaduras tienen tasas de crecimiento muy elevadas. Para evitarlo se utilizan una serie de técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, así como la esterilización de material (controles sobre soluciones y recipientes usados) y realizando el trabajo en ambientes estériles (cabina de flujo laminar o cerca de un mechero de bunsen). Asimismo se utilizan combinaciones de sustancias antimicrobianas y antifúngicas en el medio aunque en muchas de ocasiones no es posible usarlas o bien no son suficientes para prevenir la aparición de microorganismos (Cultek, 2006 ²⁷).

Cultivos puros: medios de obtención

Los microorganismos en estado natural crecen de forma heterogénea o mixta. Cuando queremos estudiar un microorganismo dado, debemos aislarlo. Un cultivo puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo. El modo de obtener estos cultivos consiste en obtener colonias aisladas, que provienen de una sola célula (son clones). Para obtenerlos se utiliza la técnica de siembra por agotamiento o en estría cruzada (Zarate M.S. y cols. 2007 ¹⁵¹).

Métodos de identificación patógenos

- Cultivo: Mediante la propagación de microorganismos en un medio de crecimiento con nutrientes (cultivo en agar sólido, semisólido o líquido). Se considera el “patrón de oro” debido a que el crecimiento del organismo proporciona un diagnóstico definitivo. Aunque puede estar limitado por la calidad de la muestra a partir de la cual se cultiva el organismo y no todos los patógenos son cultivables. Este método también puede ser usado para aumentar la cantidad de microorganismos disponibles para llevar a cabo

otro tipo de pruebas, como son la detección de antígenos o pruebas moleculares (Nelson A. y cols. 2007⁹⁴).

- Microscopía: consiste en la observación de organismos bajo aumento las muestras se ponen en un porta objetos y se examinan con un microscopio básico, en la cual se pueden confirmar las características morfológicas bacterianas del crecimiento colonial en el cultivo (Nelson A. y cols. 2007⁹⁴).

Almacenamiento en ultracongelación (-70°C)

En este procedimiento las células se congelan con un agente protector (glicerol o dimetil sulfóxido). Los especímenes congelados se guardan en refrigeradores con nitrógeno líquido.

El laboratorio de Microbiología Clínica requiere, en cada una de las etapas del procesamiento de las muestras un adecuado control de calidad (Zarate M. y cols. 2007¹⁵¹).

III. SITUACION

Hasta donde sabemos, no existe un método estandarizado por lo tanto el tener un procedimiento que nos permita evaluar la identificación de *Helicobacter pylori* y la realización de diversos estudios desde el punto de vista clínico los antibiogramas y de investigación tipificación celular, caracterización molecular (genotipificación), entre otros.

En la mayor parte de las instituciones no realiza el cultivo de *Helicobacter pylori* de manera rutinaria, debido a que se considera un método diagnóstico, difícil, exigente, lento y costoso comparado con otros métodos utilizados actualmente. Además de que no existe personal capacitado. Esto dio lugar a la realización del presente trabajo.

IV. JUSTIFICACION

El cultivo es el método diagnóstico más específico para el diagnóstico de *H. pylori* y es imprescindible en el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y en la investigación (fenotipificación y genotipificación), motivo por el cual debe realizarse de manera rutinaria.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las mejores condiciones para realizar el cultivo de *Helicobacter pylori*?

VI. HIPOTESIS

Utilizando Agar *Brucella* y Agar Casman con diferentes suplementos y en condiciones microaerofilicas se puede recuperar *Helicobacter pylori*, a partir de muestras de pacientes con Gastritis Crónica Nodular, Úlcera Gástrica y Duodenal.

VII. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizo estudio experimental, longitudinal, y prospectivo.

VIII. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general:

Estandarizar el procedimiento y las condiciones que favorecen el crecimiento bacteriano de *H. pylori*.

8.2. Objetivos específicos:

- Identificación de la presencia de *Helicobacter pylori* en cultivos de aislados clínicos.
- Establecer cuales medios nos proporcionan mayor recuperación de la bacteria.

Identificar cuales son las condiciones de cultivo que favorecen el crecimiento bacteriano de *Helicobacter pylori*.

IX. MATERIAL

1. Población en estudio

Los pacientes que acuden al Servicio de Endoscopia previamente fueron valorados por Médico Gastroenterólogo, el cual basándose en los datos clínicos de los pacientes y la evolución solicita la realización del estudio endoscópico. Es importante mencionar que esta Institución recibe referencias de pacientes valorados en cualquier Hospital de los Servicios de Salud de Michoacán a nivel estatal, por lo tanto nuestra muestra estudiada esta constituida por pacientes que residen en los diferentes municipios del estado.

Se analizaron muestras (biopsia de antro gástrico) de pacientes adultos entre 18 y 75 años de edad, que acudieron al Servicio de Endoscopia, en el período comprendido entre febrero de 2008 a enero de 2009. Las biopsias fueron tomadas por Gastroenterólogos Endoscopistas.

Se seleccionaron tres grupos de pacientes que con diagnósticos de patología gastroduodenal (n= 44), género femenino 21 (47.7%) y masculino 23 (52.3), promedio de edad de 48 años, a los cuales se les realizó identificación de *Helicobacter pylori*. En relación con el diagnóstico endoscópico, los grupos se clasificaron de la siguiente manera:

Grupo 1: Pacientes con Gastritis Crónica Nodular (n= 32). Al realizar el estudio endoscópico se observó el patrón en “empedrado” en la mucosa gástrica característico de esta patología asociada a la infección por *Helicobacter pylori*.

Grupo 2: Pacientes con Úlcera Gástrica o Péptica (n= 6).

Grupo 3: Pacientes con Úlcera Duodenal (n= 6).

Previo firma de la carta de consentimiento bajo información y hoja de recolección de datos de cada paciente participante en el proyecto de investigación.

2. Criterios de inclusión:

- Pacientes que por endoscopia se documentó gastritis crónica nodular, úlcera gástrica y con úlcera duodenal.
- Edad entre 18 y 75 años.
- Antecedente de suspensión de tratamiento (inhibidor de la bomba de protones, durante los 7 días previos a la endoscopia).
- Pacientes sin antecedentes de ingesta de AINES.

3. Criterios de no inclusión:

- Pacientes en los cuales por endoscopia se documentó presencia de hemorragia activa.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes que estuvieran inmunodeprimidos o patología oncológica que no sea de origen gástrico.
- Pacientes que no hayan suspendido el tratamiento 7 días previos a la endoscopia.

4. Criterios de eliminación:

- Pacientes que decidieron no participar en el estudio.
- Pacientes con alguno de los criterios de no inclusión mencionados anteriormente y que no se consideraron antes de realizar el cultivo.

A todos los pacientes que acudieron al Servicio de Endoscopia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, se les realizó verbalmente una serie de preguntas de inclusión y exclusión previamente al estudio, así como una valoración clínica y endoscópica para determinar si eran candidatos a participar en el protocolo basándonos en los criterios antes mencionados. Posteriormente se les informo sobre los objetivos del estudio de investigación y con firma de la carta de consentimiento informado de los participantes, se inicio el procedimiento de recolección de información y procesamiento de la muestra (Anexo 1, 2, 3).

5. Control Positivo

Se utilizo la cepa de referencia: NCTC 11637 (ATCC 43504) adquirida del Departamento de Microbiología. Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

6. Reactivos

- Base Agar Brucella: (BD Difco, No Cat. 211086), Caldo Brucella; (BD Difco, No. Cat 296185), Base Agar Casman (BD BIOXON); Inhibidor: Skirrow, Isovitalex; Sangre de carnero y Sangre laqueada de caballo (Laked Horse Blood OXOID SR0048C). Sangre Laqueada de caballo, y Suero de caballo (Laboratorios MICROLAB (uso *In vitro*, estéril). Polienriquecimiento (BD Bioxon).Catalogo: 211655. Preparación: Se adiciona 1 ml por cada 100 mL de medio de cultivo. Base agar urea BIOXON.
- INHIBIDOR VCN LIOFILIZADO BIOXON (Inhibidor de medios de cultivo) Vancomicina 330 mcg, Colistina 750 mcg, Nistatina 250 unidades. Becton Dickinson de México, COD: 211654. Vancomicina (actúa sobre microorganismos gram positivos). Colistina (actúa sobre microorganismos gram negativos), Nistatina (actúa sobre hongos).
- Campilobacter Selective Supplement (Skirrow). SR0069E. Vancomicina 5.0 mg, Polimixina B 1250 UI y trimetropin 2.5 mg.
- Reactivos de grado analítico.

X. METODOS

1. Toma de biopsia gástrica

Se realizo panendoscopia o endoscopia de tubo digestivo alto, previa aplicación de anestésico local Lidocaína al 10% en orofaringe, posteriormente se introduce un endoscopio flexible marca Fujinon de visión frontal, el cual es previamente

esterilizado durante un promedio de 20 a 30 minutos con solución Esterilife entre cada endoscopia, efectuándose toma de biopsias (2) de antro gástrico con forcéps Wilson cooke.

Durante el estudio endoscópico se seleccionaron a los pacientes que por imagen endoscópica tuvieran diagnóstico de Gastritis Crónica Nodular, Úlcera gástrica (péptica) y/o Úlcera Duodenal. Se recolectaron dos biopsias tomadas del antro gástrico y se depositaban directamente en el medio de transporte con las pinzas del endoscopio.

Durante el período en el que se realizó este proyecto, se efectuaron 331 procedimientos endoscópicos, de los cuales solo 44 pacientes reunieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en este proyecto, por lo tanto fueron incluidos.

Además, se enviaron cuatro biopsias a el Departamento de Anatomía Patológica para el diagnóstico histológico y a su vez la identificación de *H. pylori*, mediante tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) o naranja de acridina como prueba confirmatoria en algunos pacientes. El diagnóstico de Anatomía Patología se reporta en base a la clasificación de Sidney para gastritis, la cual es un sistema internacional de clasificación basada en los aspectos histológicos y endoscópicos, en los siguientes tipos de gastritis: atrófica y no atrófica, metaplasia leve, moderada y severa, asociada a esta bacteria y se entrega a los pacientes en el transcurso de 2 semanas posteriores a la toma de biopsia, para ser valorados posteriormente por su médico tratante.

2. Transporte de la muestra

El tejido (biopsias de antro gástrico), fue transportado en un microtubo Euro con 1.5 mL de medio de transporte (1.5 mL de caldo *Brucella*, 10% de suero de caballo y 20% de glicerol), se etiqueto y transportó en un periodo menor a 4 horas del Departamento de Endoscopia para ser procesadas inmediatamente en el Laboratorio de Microbiología (Giono y cols. 2008, Henry y cols. 2007^{45,58}).

3. Macerado de la muestra

Se efectuó homogeneización de la biopsia, en mortero de porcelana en caldo *Brucella*, dos gotas se utilizaron para la prueba de ureasa, y posteriormente se depositaron otras dos gotas en cada medio de cultivo utilizado. El resto de la muestra se congelo a -70°C (Giono y cols. 2008⁴⁵).

4. Cultivo y atmósfera microaerófila

Se realizó el cultivo de biopsias de antro gástrico (de 2 a 4 biopsias). Realizando la siembra del tejido homogeneizado, mediante la técnica de estría cruzada para el primo-aislamiento en placas petri e incubando a 37°C, en condiciones microaerófilas (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% N₂), utilizándose bolsas ziploc (27X28 cm) gasificando diariamente y colocando únicamente dos placas en cada bolsa, dejando suficiente espacio dentro de la misma para obtener la

concentración de gases adecuada que permitiera el crecimiento bacteriano (este sistema de microerofilia, se utilizó en un estudio previo para la recuperación de *Campilobacter*, con resultados exitosos). Revisando cultivos a las 48 horas y posteriormente diariamente por un periodo máximo de 10 días, después de este tiempo las muestras fueron consideradas negativas (Giono y cols. 2008, López-Brea, 2004^{45,73}).

5. Identificación de *Helicobacter pylori*

Se observó crecimiento en promedio de las 48 a 72 horas en agar Casman y hasta de 10 días en agar *Brucella* con y sin suplemento antimicrobiano. Se seleccionaron las colonias típicas y características de *H. pylori* de < 1 a 2 mm de diámetro, circulares, lisas, elevadas, borde entero, color grisáceo o translúcidas como “gotas de rocío” y aspecto brillante. Pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa positivas (Giono y cols. 2008, López-Brea, 2004, Murray y cols. 2003^{45,73,90}).

Utilizando las colonias pequeñas sugestivas de *Helicobacter pylori*. Se realizan pruebas bioquímicas y tinción obteniéndose los siguientes resultados en las muestras positivas:

Prueba de la oxidasa

Enzima capaz de oxidar el tetrametil p-fenilendiamina formando un compuesto púrpura en presencia de oxígeno. Se tomó con un asa estéril una de las colonias sugestivas de *Helicobacter pylori*, y se depositó sobre el centro de un disco para la detección de oxidasa (BD, BBL). La reacción positiva se produjo de 5 a 10 segundos y se evidenció por el viraje de las colonias oxidasa positivas a un color púrpura intenso (Chillua y cols. 2003, López-Brea, 2004^{21,73}).

Prueba de la Catalasa

Enzima capaz de descomponer el agua oxigenada y convertirla en agua liberando oxígeno. Esta prueba consistió en recoger el centro de una colonia pura sobre un portaobjetos e inmediatamente se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y se procedió a observar la formación de burbujas (Chillua y cols. 2003, Giono y cols. 2008, López-Brea, 2004^{21,45,73}).

Prueba de la ureasa

Enzima capaz de hidrolizar la urea produciendo amoníaco. Se tomó con un asa estéril una de las colonias sugestivas de *Helicobacter pylori*, y se depositó en el tubo con la prueba de ureasa, se incubó a 37°C, y se realizó lectura de la misma a partir de las 24 hasta las 72 horas, para ver el cambio del indicador rojo fenol de ácido (amarillo) a alcalino (color rosa mexicano) indicando la hidrólisis de la urea

por la enzima ureasa de esta bacteria. Cabe mencionar que la elaboración de este reactivo se estableció específicamente para la realización este proyecto en el Laboratorio de Microbiología, ya que no se utilizó el de marca comercial, verificándose su calidad y eficacia mediante una prueba con una cepa de *Proteus* como control positivo, y otra de *E. coli* como control negativo, antes de ser utilizada con las muestras de biopsias gástricas (Chillua y cols. 2003, Giono y cols. 2008, López-Brea, 2004^{21,45,73}).

Por otro lado, debido a que en la muestra que analizamos pueden existir otras bacterias ureasas positivas que nos pueden ocasionar resultados falsos positivos y como prueba confirmatoria de la presencia de *H. pylori*, también se realizó la prueba de ureasa de colonia, mediante la toma directa de la colonia sugerente de esta bacteria e incubando a 37°C utilizando los mismos criterios de lectura de resultados a la prueba realizada con la muestra del paciente (Mandado y cols. 2003⁷⁸).

Tinción Gram modificada

Mediante la cual se confirma la presencia de *Helicobacter pylori*. Se siguió el método estándar, excepto que se contratiño con fucsina fenicada usada para Ziehl Neelsen en vez de adicionar safranina, dejándose durante 5 minutos, observándose la morfología microscópica característica de *H. pylori* (Aguilar y cols. 2004, Chillua y cols. 2003, López-Brea, 2004^{3,21,73}).

6. Cuantificación de crecimiento bacteriano

Se cuantifico el crecimiento bacteriano mediante la clasificación de Totten modificada (utilizada anteriormente para evaluar otros microorganismos fastidiosos, 1982), considerando el número de colonias por cuadrante. De la siguiente manera: 1+, menos de 10 colonias en la zona de descarga inoculación; 2+, mas de 10 colonias en la zona de descarga y menos de 10 en la segunda; 3+, mas de 10 colonias en la 2a zona y menos de 10 en la tercera; 4+, mas de 10 colonias en la tercera zona y menos de 10 en la cuarta; 5+, mas de 10 colonias en la cuarta zona de la caja de petri (Totten y cols. 1982¹³⁹).

Purificar las cepas de *H. pylori*

En los cultivos positivos para esta bacteria y que presentaron contaminación en el primo-aislamiento, posteriormente para poder aislar las colonias puras en el sub-cultivo se efectuó mediante la técnica de siembra en reguilete, tomando las colonias con un asa estéril se suspendieron en un tubo con solución salina, y por ultimo se estas mismas se sembraron en los medios de cultivo usando un asa nueva para cada estría para evitar el crecimiento por contaminantes, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Conservación de las cepas

Cada cepa aislada se sembró en masivo en una caja de petri de cada medio de cultivo utilizado. Posteriormente se recolectó la biomasa cada cepa obtenida de las muestras positivas tanto en el primo-aislamiento como en los subcultivos se guardaron en microtubos Euro y se congelaron a -70°C (1.5 mL de caldo *Brucella*, 10% de suero de caballo y 25% de glicerol) a las 48 horas posteriores a la observación de crecimiento bacteriano positivo para *Helicobacter pylori*, en las cuales están presentes de manera dominante los bacilos cortos, espirales y filamentosos de manera aislada en más del 90% (Giono y cols. 2008, López-Brea, 2004^{45,73}).

7. Métodos y Técnicas de recolección de la información.

7.1. Departamento de Endoscopia

A cada paciente que aceptó participar en el protocolo y que reunió los criterios de inclusión se le realizó un cuestionario para la llenar la hoja de recolección de datos. Se valoraron los antecedentes y factores que con mayor frecuencia se relacionan con la presencia de enfermedad gastroduodenal asociada a *Helicobacter pylori* y a la recurrencia de la misma. Efectuándose el análisis de las variables socio-demográficas de la población en estudio.

7.2. Departamento de Microbiología

- Control de calidad y preparación: medios de transporte, cultivo, reactivos y esterilización de material (Anexo 5).
- Control diario del uso de la campana de flujo laminar.
- Control diario de temperatura de la incubadora y del ultracongelador.
- Registro de pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa y catalasa) y tinción gran modificada.
- Cultivo de *Helicobacter pylori* (características de crecimiento).
- Diagnóstico histológico.

7.3 Análisis estadístico.

Se analizaron las variables en estudio con el paquete estadístico SPSS versión 17. Utilizando estadística descriptiva; promedio y desviación estándar. Así como prueba de Kruskal-Wallis para las variables cualitativas; Anova y Wilcoxon, para las variables cuantitativas y Correlación de Spearman y X^2 para los datos clínicos. Se tomaron como estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

Tabla 15. Variables en estudio.

Variables de los datos socio-demográficos	Variables de los datos experimentales
➤ Genero. ➤ Edad. ➤ Estado civil. ➤ Domicilio. ➤ Antecedentes personales de enfermedad gastroduodenal ➤ Síntomas ➤ Hábitos alimenticios. ➤ Calidad del agua que consume. ➤ Tabaquismo. ➤ Alcoholismo. ➤ Endoscopia previa. ➤ Tratamiento : mejoría y Adherencia	➤ Gastritis crónica nodular. ➤ Úlcera gástrica. ➤ Úlcera duodenal. ➤ Ureasa ➤ Cultivo ➤ Histología

7.4. Consideraciones éticas

Se le informo a cada participante del protocolo en que consistía el estudio y su participación en el mismo, los pacientes que aceptaron firmaron el consentimiento bajo información.

La información recabada mediante este estudio se manejo de manera anónima y se le informo a cada participante de manera individual y confidencial su resultado.

7.5. Aprobación del Trabajo

El proyecto fue autorizado por el Comité de Investigación y Bioética del Departamento de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH. Con un numero de registro: 0015.P.5/2008, de manera simultánea fue aprobado por el Comité de Enseñanza, Investigación y Ética del Hospital General "Dr. Miguel Silva", reviso y aprobó este protocolo con numero de oficio 5009/160/08.

XI RESULTADOS

Población en estudio

Del tamaño total de la muestra el 38.6% de los pacientes son de Morelia y el resto de diferentes municipios del estado de Michoacán. El grupo de edad con mayor prevalencia de las enfermedades gastroduodenales fue de 40-59 años ($\bar{x}$ = 43.2). En relación a la ocupación encontramos dos principales en género femenino labores del hogar (36.4%) y en masculino campesinos (22.7%). La escolaridad más frecuente es la de primaria incompleta (31.8%) y el estado civil casados (56.8%). Las familias estuvieron conformadas de 1 a 8 integrantes, teniendo la mayoría 5 integrantes (22.7%). En relación a los antecedentes familiares de enfermedades gastroduodenales encontramos: 2 pacientes con antecedente de Gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori*, 1 Úlcera péptica y 1 de Cáncer gástrico. De estos solo 1 estaba en tratamiento actualmente. La mayoría comía en casa n= 38 (86.4%). 37 pacientes consumen agua de purificada (84.1%). En relación a tabaquismo 20 pacientes (45.5%) tuvieron un índice tabáquico >20 cigarrillos, y 22 (50%) con alcoholismo ocasional. 19 pacientes (43.2%), con antecedentes personales dispepsia, 1 paciente (2.3%) con gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori*, 9 pacientes (20.5%) con gastritis crónica, 2 pacientes (4.5%) con úlcera gástrica, 1 paciente (2.3%) con linfoma y el resto sin antecedentes. 15 pacientes (34.1%) con antecedente de endoscopia previa y el tratamiento que recibieron con mayor frecuencia fue inhibidores de la bomba de protones. De estos 26 pacientes (59.1%) mostraron mejoría posterior al tratamiento con una adherencia del 63.6%. El síntoma más frecuente encontrado fue dolor abdominal agudo recurrente (DAR) en un 63.6%, seguido de pirosis, sensación de plenitud, náuseas y síntomas laríngeos. El tiempo de evolución del padecimiento fue desde 1 mes hasta 30 años, siendo mayor la población con 8 años (15.9%).

Tabla 16. Población en estudio por grupos de edad y el diagnóstico endoscópico.

Grupos de edad	Diagnóstico endoscópico (No. de pacientes)			Total
	gastritis crónica nodular	úlceras gástrica o péptica	úlceras duodenal	
<20	3	0	0	3
20-39	6	1	3	10
40-59	16	2	1	19
>60	7	3	2	12

Cultivo

1. Prueba inicial con la cepa de referencia

En la prueba inicial se probó la efectividad de los medios utilizando la cepa de referencia (ATCC 43504) adquirida del Departamento de Microbiología. Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Se emplearon medios usualmente recomendados en la literatura, base agar *Brucella*, 10% sangre de carnero y suplementado con inhibidor VCN o Thayer Martin que se utiliza para el crecimiento de otros microorganismos fastidiosos como *Neisseria gonorrhoeae* y base agar Casman con suero de caballo sin inhibidores (Murray y cols. 2003⁹⁰).

Tabla 17. Cultivo cepa de referencia ATCC 43504 utilizando base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero, con y sin inhibidor VCN.

Muestras	Primo-aislamiento	Crecimiento bacteriano	Subcultivo	Crecimiento bacteriano
ATCC 43504	Positivo	+5 /+5	Negativo	Negativo
Identificación bacteriana de colonias sugerentes de <i>H. pylori</i>	Ureasa	Oxidasa	Catalasa	Tinción Gram modificada
	Positiva	Positiva	Positiva	Bacilos gram-negativo, pleomórficos forma de “S”, “alas de gaviota”, “herradura”

Como se aprecia en la Tabla 17, teniendo como resultado crecimiento bacteriano masivo a las 72 hrs. en base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero y suplementado con inhibidor VCN. Se obtuvo un significativo crecimiento de +5, en los cuatro cuadrantes de la caja de petri, lo que se muestra en la Figura 9A. Se recolectaron las colonias, se colocaron en un vial y se almacenaron a -70°C. Los cultivos en los que se utilizó base agar Casman con suero de caballo sin inhibidores mostraron contaminación de la flora bacteriana acompañante. Sin embargo, al realizar el subcultivo fue negativo. Posteriormente se realizan pruebas de identificación bacteriana mediante microscopía donde se observaron las formas típicas de *Helicobacter pylori*, lo que se muestra en la Figura 9B.

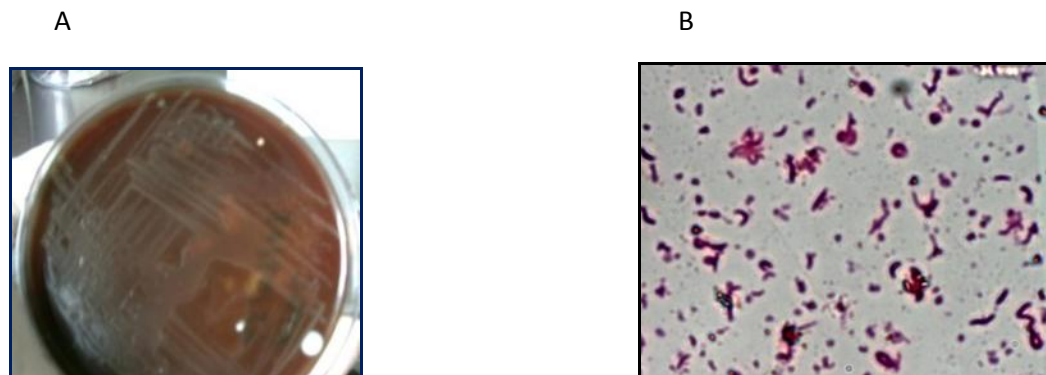


Figura 9. Crecimiento de la cepa de referencia ATCC 43504.

- A. Fotografía de crecimiento en los cuatro cuadrantes de la caja de petri (+5).
- B. Micrografía (1000X). Se observan bacilos Gram negativos largos y cortos, pleomórficos predominando las formas de “S”, “alas de gaviota”, “herradura” y algunas formas cocoides Gram negativas.

Debido a que se obtuvieron resultados positivos se procedió a realizar las primeras pruebas con pacientes. En este primer análisis se cultivaron cuatro muestras de pacientes.

2. Prueba piloto con muestras de pacientes

Se aplicaron las condiciones de cultivo de la cepa de referencia y para corroborar el resultado de las muestras de pacientes, se realizaron las mismas pruebas de identificación bacteriana descritas anteriormente. Utilizando como medio de transporte tubo (13x100 mm) con 1.5 mL de solución salina, considerando que el tiempo transcurrido desde la toma de la biopsia hasta su procesamiento fue menor a 4 horas (Blanco-Delgado y cols. 2001, Brooks y cols. 2002, López-Brea y cols. 2004^{12,15,73}).

Adicionalmente se analizaron los diferentes métodos descritos para el manejo de las muestras de tejido de biopsias de antro gástrico, como son las siguientes:

1. Homogeneización del tejido
 - a) Mortero de porcelana (Giono y cols. 2008⁴⁵).
 - b) Tubos (16x100 y de 13x100 mm) (Chillihua y cols. 2003, Blanco-Delgado y cols. 2001^{12,21}).
 - c) Dispersión de tejido sin macerarlo (Sánchez del Monte y cols. 2006¹²⁸).

El mejor resultado (positivo) se obtuvo al realizar la homogeneización del tejido utilizando un mortero de porcelana, por lo que esta metodología fue aplicada en todas las muestras procesadas posteriormente.

2. Prueba de ureasa. Se analizaron dos variantes:

- a) Depositando un fragmento de la biopsia de antro gástrico directamente dentro del tubo con ureasa e incubando a 37°C, verificando resultados de en un periodo de 24 a 72 horas como máximo.
- b) A partir del tejido homogeneizado, depositando dos gotas dentro del tubo con ureasa bajo las mismas condiciones que el anterior.

Resultando en ambos casos positiva. Por lo cual, con la finalidad de contar con mayor cantidad de muestra para el cultivo de *H. pylori*, se realizó la prueba de ureasa a partir del tejido homogeneizado.

3. Número de biopsias.

Al inicio se realizó el procesamiento y cultivo de una sola biopsia de antro gástrico, aunque para poder evaluar los datos reportados anteriormente se requería de mayor cantidad de muestra, así como aumentar la posibilidad de recuperación, por lo que se determinó utilizar dos biopsias (Giono y cols. 2008, Quiroga A.J. y cols. 2005^{45,109}).

La Tabla 18 muestra los resultados al emplear la primera combinación de medios de cultivo, como se puede observar, solo se obtuvieron resultados positivos con la muestra de un paciente, en el resto los resultados fueron negativos. En la muestra del paciente 2 se obtuvieron resultados positivos de crecimiento bacteriano en la zona de descarga (+1), hasta los 10 días, sin importar el uso o no de inhibidor en el medio de cultivo, observándose mayor contaminación en el medio sin inhibidor. Sin embargo, el número de colonias fue escaso y el subcultivo resultó negativo. Se aplicaron las pruebas bioquímicas ureasa (de la biopsia y de toma directa de colonia sugerente de esta bacteria), oxidasa y catalasa siendo positivas para la identificación de *H. pylori*, al igual que la tinción Gram modificada confirmando la presencia de la bacteria.

Tabla 18. Cultivos de la prueba piloto utilizando base agar *Brucella* con, 10% sangre de carnero con y sin inhibidor VCN.

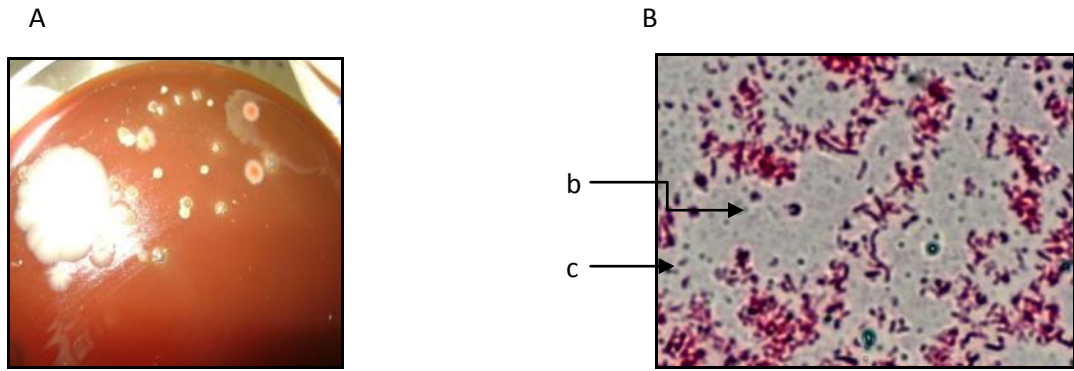
Muestras	Primo- aislamiento	Crecimiento bacteriano		Subcultivo	Crecimiento bacteriano
		-VCN	+VCN		
1	Negativo	NA	NA		NA
2	Positivo	+1	+1		Negativo
3	Negativo	NA	NA		NA
4	Negativo	NA	NA		NA
Identificación bacteriana de colonias sugerentes de <i>H. pylori</i>	Ureasa	Oxidasa		Catalasa	Tinción Gram modificada
	Positiva	Positiva		Positiva	Bacilos gram- negativo, pleomórficos forma de “S”, “alas de gaviota”, “herradura”

*-VCN: sin inhibidor VCN, +VCN: con inhibidor VCN, NA: no aplicado.

Es importante señalar que aunque se obtuvo crecimiento esta muestra se encontraba contaminada por bacterias y hongos, como se muestra en la Figura 2A. Al ser analizadas con mediante tinción Gram modificada se demostró la presencia *H. pylori* (Figura 2B).

Al aplicar la segunda combinación de medios de cultivos (base agar Casman con suero de caballo) el resultado fue negativo y altamente contaminados debido a que no se utilizó inhibidor y a que la mayoría de las bacterias a diferencia de *H. pylori* tienen una tasa de crecimiento alta, no fueron valorables para el diagnóstico de esta bacteria.

En relación al resultado negativo del subcultivo esta relacionado probablemente con un número bajo de bacterias, y concuerda con lo reportado en la literatura, ya que se ha descrito que el aislamiento de *H. pylori* en subcultivo es difícil (Giono y cols. 2008 ⁴⁵).



*b: bacilos Gram negativos, c: formas cocoides

Figura 10. Cultivo positivo para *H. pylori* utilizando base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero. A) Fotografía de crecimiento bacteriano en la zona de descarga (+1) de la caja de petri, muestra del paciente 2. B) Micrografía (1000X). Se observan bacilos Gram negativos largos y cortos, pleomórficos predominando las formas de “S”, “alas de gaviota”, “herradura” y algunas formas cocoides Gram negativas.

3. Fase I. Cultivo de las muestras

Como obtuvimos resultados positivos, se decidió aplicar a las muestras de los pacientes incluidos en el protocolo la combinación de base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero y suplementado con inhibidor VCN (Forbes y cols. 2002, Murray y cols. 2003^{35,90}).

Las pruebas bioquímicas aplicadas a estas cinco muestras con primo-aislamiento positivo fueron positivas y la morfología bacteriana microscópica mediante la tinción Gram modificada confirma la presencia de *H. pylori* (Figura 3). Se obtuvo crecimiento en un periodo de 72 horas hasta 10 días.

En todos los casos el crecimiento fue muy bajo imposibilitando obtener un subcultivo exitoso. Además, es importante señalar que aunque se utilizó antibiótico en todos los casos positivos se obtuvieron cultivos con crecimiento de flora acompañante.

Tabla19. Cultivo de muestras Fase I.

Muestras	Primo- aislamiento	Crecimiento bacteriano		Subcultivo	Crecimiento bacteriano
		-VCN	+VCN		
1.	Negativo	NA	NA	NA	NA
2.	Negativo	NA	NA	NA	NA
3.	Positivo	+1	+1	Negativo	NA
4.	Negativo	NA	NA	NA	NA
5.	Positivo	+1	+1	Negativo	NA
6.	Negativo	NA	NA	NA	NA
7.	Negativo	NA	NA	NA	NA
8.	Positivo	+1	+1	Negativo	NA
9.	Positivo	+1	+1	Negativo	NA
10.	Positivo	+1	+1	Negativo	NA
11.	Negativo	NA	NA	NA	NA
12.	Negativo	NA	NA	NA	NA
13.	Negativo	NA	NA	NA	NA
14.	Negativo	NA	NA	NA	NA
15.	Negativo	NA	NA	NA	NA
16.	Negativo	NA	NA	NA	NA

*-VCN: sin inhibidor VCN, +VCN: con inhibidor VCN, NA: no aplicado.



Figura 11. Cultivo positivo para *H. pylori* utilizando base agar Brucella con 10% sangre de carnero. Micrografía (1000X). Se observan bacilos Gram negativos cortos, pleomórficos predominando las formas de “S”, “alas de gaviota”, “herradura” y algunas formas cocoides Gram negativas, confirmándose la presencia de *H. pylori*.

Ante esta situación valoramos la opción de utilizar otros medios reportados en la literatura como útiles para el crecimiento de *Helicobacter pylori*, realizando la siembra de la muestra por técnica de estría cruzada con hisopo estéril en lugar del asa con la finalidad de obtener mayor crecimiento bacteriano. Los medios alternativos que probamos y los datos más importantes observados fueron los siguientes:

Se realizaron siembras de este medio con hisopos utilizando base agar chocolate y asa, observándose crecimiento escaso, colonias pequeñas, con presencia de otras colonias no sugestivas de *Helicobacter pylori*. Y Tioglicolato (Medio líquido), se realiza siembra mediante toma directa de la colonia de *Helicobacter pylori* (cajas de petri con Agar *Brucella*), se coloca el hisopo en el tubo con el medio y se coloca en incubadora. Se realiza tinción gram a las 24, 48, 72 horas, observándose morfología bacteriana no sugestiva de esta bacteria. Por lo cual se descarta la utilización de estos medios y técnica de siembra con hisopo en el presente proyecto.

En base a los resultados obtenidos y posteriormente a una capacitación en la Facultad de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se modificaron los medios de transporte de la muestra del Departamento de Endoscopia al Laboratorio de Microbiología, la base agar del cultivo y suplementos, siguiendo la misma metodología para realizar el cultivo de las muestras.

4. Fase II. Cultivo de las muestras

Las muestras de biopsias gástricas se recolectaron en caldo *Brucella* con 10% suero de caballo con la finalidad de mantener las biopsias en óptimas condiciones y posteriormente ser transportadas al Laboratorio para su análisis. Utilizando base agar Casman con 10% de sangre de carnero desfibrinada al 10% sin antibiótico y sangre laquada de caballo al 10% con y sin suplemento antimicrobiano Skirrow (Vancomicina, Polimixina y Trimetropin) para disminuir el sobre-crecimiento de cualquier flora competitiva. Las placas se incubaron bajo las mismas condiciones descritas previamente (Brooks y cols. 2004, Giono y cols. 2008, Kuster J. y cols. 2006, Parlapiano y cols. 2006^{15,45,68,105}).

Resultando negativas las muestras de la 17 a la 24.

Es importante mencionar que se analizo una variante sobre la atmósfera microaerofílica que se requiere para el crecimiento de *H. pylori*, aplicándose a la cepa de referencia (ATCC 43504) utilizando Alkaseltzer (dos tabletas efervescentes, en cada revisión de los cultivos) para la liberación de CO₂ en un frasco de vidrio perfectamente cerrado, obteniéndose crecimiento de *H. pylori* masivo (+5), congelándose a -70°C a las 72 horas. De manera simultánea se utilizo esta misma técnica para las muestras 19, 20, 21,22 obteniendo resultados negativos al igual que con la utilización de concentración de gases utilizadas en el resto de las muestras, por lo que se decide continuar con esta ultima para generar el ambiente microaerofílico.

Fase III. Cultivo de las muestras

Posteriormente debido que recuperación que se obtuvo, a partir de la muestra número 25 se realizó la preparación de medios de cultivo de manera frecuente (cada semana), ya que la vida media de los antimicrobianos es corta. Se utilizó base agar Casman con 10% sangre laqueada de caballo con y sin suplemento antimicrobiano Skirrow, adicionamos polienriquecimiento o 1% isovitalex (BD Bioxon) liofilizado usado para mejorar el crecimiento de microorganismos exigentes.

Tabla 20. Cultivo de muestras con base agar Casman, sangre laqueada con y sin Antibiótico Skirrow, 1% isovitalex.

Muestras	Primo- aislamiento	Crecimiento bacteriano		Subcultivo	Crecimiento bacteriano
		-Skir	+ Skir		
25	Negativo	NA	NA	NA	NA
26	Negativo	NA	NA	NA	NA
27	Positivo	+2	+2	Positivo	+2
28	Positivo	+2	+2	Positivo	+2
29	Negativo	NA	NA	NA	NA

*-Skir: sin Skirrow, + Skir: con Skirrow, NA: no aplicado.

Se obtuvieron resultados positivos en dos muestras incrementándose el número de colonias a +2 en comparación con los métodos antes probados y en ambos casos el subcultivo fue positivo, congelándose a -70°C a las 72 horas en caldo *Brucella*, 10% de suero de caballo y 25% de glicerol (Tabla 19). Las pruebas bioquímicas y la tinción Gram modificadas realizadas para la identificación de *H. pylori* fueron positivas. Es importante señalar que el periodo de días para la identificación de *H. pylori* fue de 3 a 7 días, significativamente mas corto que las primeras incubaciones.

La Figura 4 muestra una comparación del crecimiento bacteriano al emplear el medio antes descrito con y sin antibiótico, como se puede observar en los dos casos se observó un crecimiento únicamente en la zona de descarga, sin embargo en A, el cual carece del antibiótico, presenta crecimiento de otras bacterias. El análisis de histología comprobó la presencia de *H. pylori* con diferentes formas (Figura 4C).

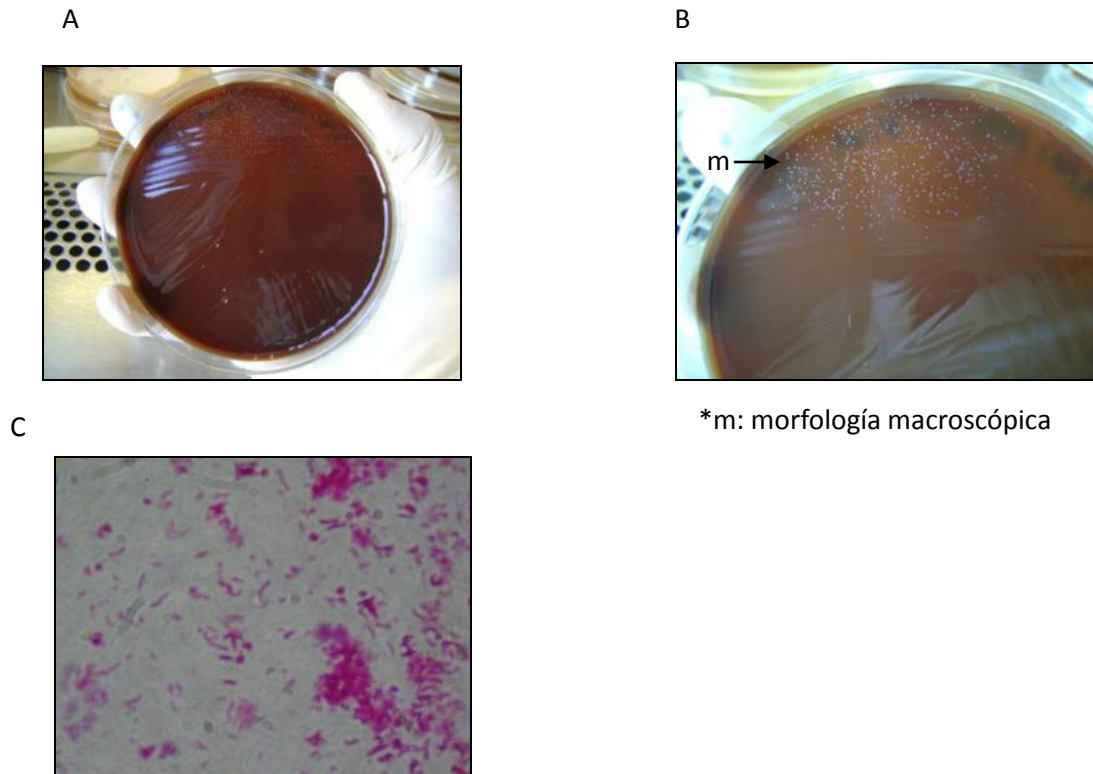


Figura 12. Cultivo positivo para *H. pylori* utilizando base agar Casman con 10% sangre laqueda de caballo con y sin suplemento antimicrobiano Skirrow y 1% isovitalex. A) Fotografía de crecimiento bacteriano en la zona de descarga (+2) de la caja de petri, observándose la morfología característica de las colonias de *Helicobacter pylori*, muestra del paciente 27 (sin suplemento inhibidor skirrow). **B)** Fotografía de crecimiento bacteriano en la zona de descarga (+2) de la caja de petri, observándose la morfología característica de las colonias de *Helicobacter pylori*, muestra del paciente 27 (con suplemento inhibidor skirrow). **C)** Micrografía (1000X). Se observan bacilos Gram negativos largos y cortos, pleomórficos predominando las formas de “S”, “alas de gaviota”, “herradura” y algunas formas cocoides Gram negativas, confirmándose la presencia de *Helicobacter pylori*.

5. Fase IV Condiciones Finales. Análisis Comparativo

Debido a que en las condiciones anteriores se obtuvieron resultados positivos en el primo-aislamiento, se aplicó la misma metodología, analizándose como prueba final las combinaciones de base agar usadas anteriormente, modificando el inhibidor VCN por Skirrow y adicionando polienriquecimiento (1% Isovitallex), corroborando la importancia de utilizar estos dos componentes para la obtención de mayor cantidad de crecimiento bacteriano en cada uno de los medios de cultivo utilizados. Así como, en base a lo reportado previamente en otros

estudios, se adiciona 20% glicerol al medio de transporte caldo *Brucella* con 10% suero de caballo, para obtener una mejor conservación de la muestra desde su recolección hasta su procesamiento (Sánchez del Monte J. y cols. 2006 ¹²⁸).

Debido a que existen varios reportes en la literatura de la realización de Cultivos con *Base Agar Brucella*, y a que con el VCN uno de los problemas que se presentaron fue el crecimiento de contaminantes, decidimos prepararlo suplementado con inhibidor por Skirrow y Isovitalax. Por lo que se utilizaron las siguientes combinaciones en esta fase:

- a) Base Agar *Brucella* con 10% sangre de carnero con y sin suplemento inhibidor Skirrow e Isovitalax.
- b) Base Agar Casman con 10% de sangre laqueada de caballo Base Agar con y sin suplemento Skirrow e Isovitalax.
- c) Base Agar Casman con 10% de suero de caballo con suplemento Skirrow e Isovitalax.

No se utilizó base agar Casman con sangre de carnero desfibrinada debido a que en las muestras anteriores los resultados fueron negativos.

Obtuvimos colonias de manera aislada, cultivos puros de *H. pylori*, el periodo de días para la identificación de esta bacteria fue de 3 a 7 días realizándose las pruebas bioquímicas antes mencionadas y la tinción Gram modificada con resultados positivos. Así como un primo-aislamiento con crecimiento en los cuatro cuadrantes (+5) y obteniendo en todas las muestras subcultivos positivos.

Como se puede apreciar en la tabla 21, en las muestras en que se obtuvieron resultados positivos, observándose diferencias en relación al crecimiento en la zona de descarga (+1) y crecimiento de >10 colonias en la primera zona y < 10 en la segunda (+2). Además, de que el uso de suplemento inhibidor Skirrow disminuye la cantidad de crecimiento de la flora acompañante, permitiendo el aislamiento con mayor facilidad y la recuperación de mayor número de colonias de *H. pylori* en los subcultivos. En relación a la cuantificación del crecimiento bacteriano por número de colonias en los subcultivos se observó recuperación en las ocho muestras positivas, teniendo incremento en el número de colonias en algunas muestras en los cuatro cuadrantes (+5).

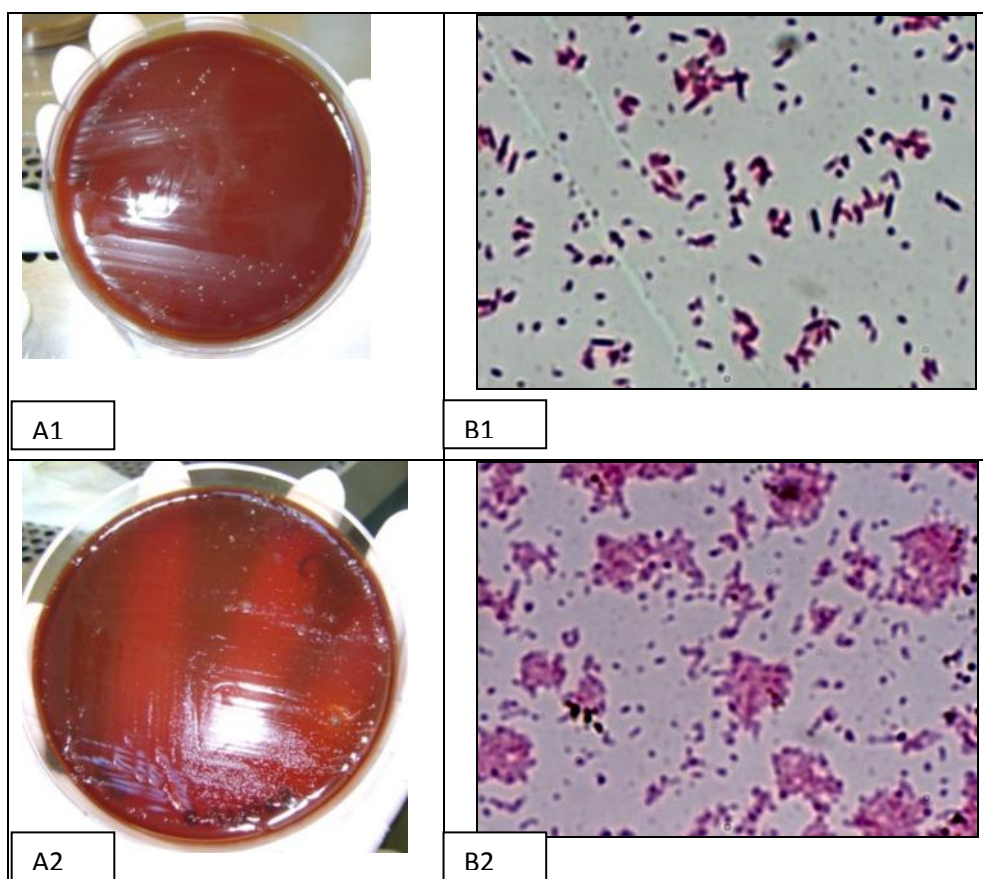
Tabla 21. Crecimiento de *H. pylori* utilizando diferentes condiciones de cultivo.

Muestras	Primo-aislamiento	Crecimiento bacteriano					Subcultivo	Crecimiento bacteriano
		AB	ABS	ACL	ACLS	ACsS		
30.	Positivo	+5	+5	+5	+5	+5	Positivo	+5
31.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
33.	Positivo	+2	+2	+2	+2	+2	Positivo	+3
34.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
35.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
36.	Positivo	+1	+1	+1	+2	+2	Positivo	+2
37.	Positivo	+1	+1	+1	+1	+2	Positivo	+2
38.	Positivo	+1	+1	+2	+2	+3	Positivo	+5
39.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
40.	Positivo	+1	+4	+1	+2	+4	Positivo	+3
41.	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
42.	Positivo	+1	+1	+1	+1	+2	Positivo	+2
43.	Positivo	+1	+1	+1	+1	+2	Positivo	+3
44.	Positivo	+1	+2	+2	+2	+3	Positivo	+2

* AB: Base Agar *Brucella* con 10% sangre de carnero e Isovitallex. ABS: con suplemento inhibidor Skirrow. ACL: Base Agar Casman con 10% de sangre laqueada de caballo e Isovitallex. ACLS: Base Agar Casman con 10% de sangre laqueada de caballo e Isovitallex con suplemento inhibidor Skirrow. ACsS: Base Agar Casman con 10% de suero de caballo con suplemento Skirrow e Isovitallex.

Como se muestra en la Figura 5. Se obtuvieron resultados positivos con los medios utilizados colonias de manera aislada, cultivos puros de *H. pylori*, el periodo de días para la identificación de esta bacteria fue de 3 a 7 días realizándose la pruebas bioquímicas antes mencionadas y la tinción Gram modificada con resultados positivos. Así como un primo-aislamiento con crecimiento en los cuatro cuadrantes (+5) y obteniendo en todas las muestras subcultivos positivos.

Como se puede apreciar en las muestras en que se obtuvieron resultados positivos, observándose diferencias en relación al crecimiento en la zona de descarga (+1) y crecimiento de >10 colonias en la primera zona y < 10 en la segunda (+2). Además, de que el uso de suplemento inhibidor Skirrow disminuye la cantidad de crecimiento de la flora acompañante, permitiendo el aislamiento con mayor facilidad y la recuperación de mayor número de colonias de *H. pylori* en los subcultivos. En relación a la cuantificación del crecimiento bacteriano por número de colonias en los subcultivos se observó repuración en las ocho muestras postivas, teniendo incremento en el número de colonias en algunas muestras en los cuatro cuadrantes (+5).



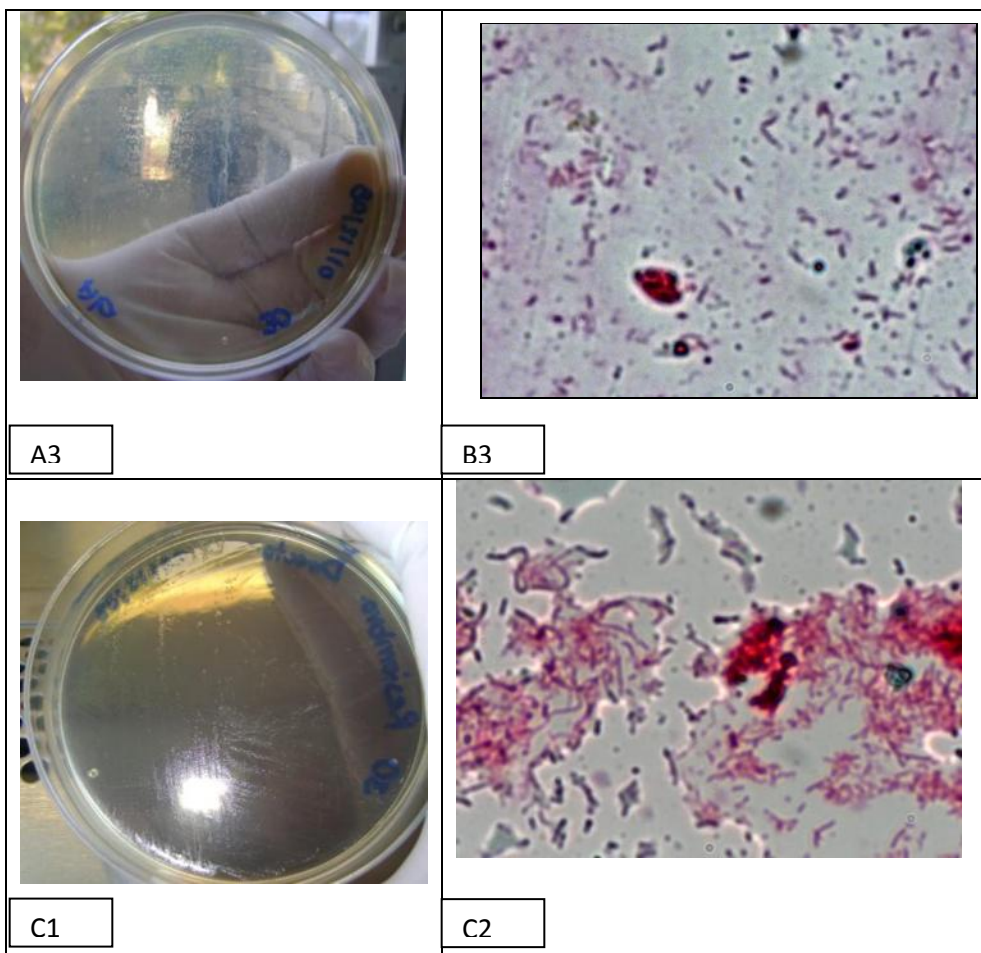


Figura 13. Cultivo positivo para *H. pylori*: Se utilizaron las combinaciones con base agar *Brucella* con 10% sangre de carnero y Casman base agar Casman con 10% sangre laqueda de caballo con y sin suplemento antimicrobiano Skirrow y 1% isovitalex. **A)** *Primo-aislamiento de *H. pylori* muestra del paciente número 30, en la cual se observa crecimiento bacteriano en los cuatro cuadrantes de la placa de petri (+5).* A1: agar *Brucella*; A2: Agar Casman con sangre laqueda; A3: Agar Casman con suero de caballo. **B)** Micrografía (1000X). Se observan bacilos Gram negativos largos y cortos, pleomórficos predominando las formas de “S”, “alas de gaviota”, “herradura” y algunas formas cocoides Gram negativas, confirmándose la presencia de *Helicobacter pylori*. B1: agar *Brucella*; B2: Agar Casman con sangre laqueda; B3: Agar Casman copn suero de caballo. **C)** Subcultivo positivo para *H. pylori* utilizando Agar Casman con suero de caballo muestra del paciente número 30 (C1). Micrografía (1000X), observándose la morfología característica de *Helicobacter pylori* (bacilos largos) (C2).

Resultados de análisis de bioestadística

Al realizar la comparación de proporciones entre la muestra de cada uno de los tres grupos estudiados y el diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante cultivo, encontramos lo siguiente:

- De 32 casos con Gastritis Crónica Nodular, obtuvimos 9 casos con crecimiento positivo en cultivo para *Helicobacter pylori*, teniendo una proporción de (9/32).
- De 6 casos con Úlcera Gástrica o péptica, obtuvimos 4 casos con crecimiento de *Helicobacter pylori*, con una proporción de (4/6).
- De 6 casos con Úlcera Duodenal, obtuvimos 3 casos con crecimiento de *Helicobacter pylori*, siendo una proporción de (3/6).

La proporción observada en los tres grupos estudiados es menor a la reportada previamente en la literatura (comparación de proporciones). Y debido a que la infección por *Helicobacter pylori* se presenta con igual proporción en las 3 patologías, concluimos que no hay diferencia estadística entre las tres proporciones, resultando una “proporción global” de 16/44.

En relación a la prueba de ureasa, encontramos los siguientes resultados:

Grupo 1 (Gastritis crónica nodular). Ureasa predice bien los verdaderos positivos (sensibilidad $9/9 = 1$). Once son falsos negativos teniendo una especificidad $12/23 = .52$.

Grupo 2 (Úlcera gástrica). Ureasa predice bien los verdaderos positivos (sensibilidad $4/4 = 1$). Dos son falsos negativos teniendo una especificidad $0/2 = 0$.

Grupo 3 (Úlcera duodenal). Ureasa predice bien los verdaderos positivos (sensibilidad $3/3 = 1$). Una resultado falso negativo teniendo una especificidad $2/3 = .66$.

Es importante mencionar que debido al tamaño de la muestra los valores no son representativos de la población. Se encontró correlación estadísticamente significativa entre la prueba de ureasa y los medios de cultivo utilizados para la identificación de *H. pylori* ($p=0.015$, correlación de Spearman).

En base a los resultados de las muestras de los últimos 15 pacientes donde se usaron de manera comparativa los medios utilizados se encontró que:

Al utilizar Casman/SLC/Skirrow se obtuvo mayor crecimiento bacteriano por número de colonias y en más cuadrantes que con Brucella (Wilcoxon), y a su vez al utilizar Casman/Suero/Skirrow el crecimiento bacteriano fue mayor que con Cassman/SCL/Skirrow. Al correlacionar Casman contra suero y sangre laqueada

obtuvimos una $p=0.016$ mediante la prueba de Wilcoxon, indicando que el suero es el que proporciona el mejor resultado.

En relación a las variables socio-demográficas, se encontró una correlación estadísticamente significativa en género ($p=0.023$, χ^2), en género femenino el 43.2% con diagnóstico de Gastritis Crónica Nodular, 4.5% úlcera duodenal, a diferencia del género masculino con 29.5% Gastritis Crónica Nodular, 13.6% úlcera gástrica o péptica y 9.1% úlcera duodenal. En el análisis del resto de las variables no se encontraron datos estadísticamente significativos.

Por otro lado, se encontró que 17/44 muestras (38.6%), tuvieron diagnóstico de metaplasia, la cual se considera una lesión premaligna y que puede dificultar la recuperación de *H. pylori* en el cultivo. Sin embargo, obtuvimos 5 cultivos positivos (+1) que tenían este diagnóstico histológico. Así como también 4 cultivos negativos que por histología se diagnóstico infección por esta bacteria. Encontramos que se asocio más frecuentemente a la Gastritis Crónica Nodular, seguida de Úlcera Gástrica y por último Úlcera Duodenal, afectando el grupo de edad de 40 a 59 años (52.9%), de igual manera que la frecuencia observada para enfermedades gastroduodenales, pero sin diferencias en género.

XII. DISCUSION

Debido a que no existe un método estandarizado para el desarrollo de cultivos, la incongruencia y contradicciones en la literatura, éste trabajo de tesis, se enfocó en desarrollar la metodología necesaria para obtener un cultivo de *Helicobacter pylori*. Hasta donde sabemos es el primer trabajo en el que basado en los datos de la literatura, se desarrollaron diferentes combinaciones y se comparan los resultados.

Inicialmente se realizó el cultivo de *Helicobacter pylori* utilizando los medios recomendados por la literatura, ya que existen datos que fundamentan que se puede recuperar esta bacteria utilizando base agar *Brucella* con 10% de sangre de carnero con VCN y base agar Casman con 10% de suero de caballo, se realizó la siembra de la cepa de referencia ATCC. Nuestros resultados fueron positivos para ambos casos, sin embargo, al usar base agar Casman con 10% de suero de caballo, el índice de contaminación fue alto debido a que esta combinación es un medio de cultivo enriquecido y no se utilizó antibiótico para inhibir el crecimiento de contaminantes. Además para poder estudiar esta bacteria se requiere aislarla en subcultivo (mínimo dos cajas de petri) para obtener mayor número de colonias puras de *H. pylori* y asegurar la recuperación después de congelar la biomasa bacteriana a -70°C para poder realizar posteriormente estudios tanto de Microbiología clínica como de Biología Molecular. No obtuvimos cultivos positivos debido al crecimiento de flora acompañante, y estas a diferencia de *H. pylori* tienen una tasa de crecimiento alto, por lo que impidieron obtener resultados positivos.

El crecimiento de la cepa de referencia se espera que sea abundante y se distribuya de manera masiva en los cuatro cuadrantes de la caja de petri, ya que el vial congelado de la misma contiene la recolección del crecimiento de obtenido a partir cuatro cajas de petri. A diferencia de los aislados clínicos (muestras de pacientes) en las cuales la densidad bacteriana es menor y además varía por factores relacionados con el hospedero y la fisiología de la bacteria. Se realizó la identificación bacteriana a partir de las colonias sugerentes de la presencia de esta bacteria, mediante las pruebas bioquímicas ureasa, oxidasa y catalasa, las cuales fueron positivas, observándose en la tinción Gram modificada las características de la morfología microscópica de *H. pylori* confirmándose el diagnóstico. Lo cual concuerda con lo reportado previamente (Giono y cols. 2008⁴⁵), por lo que se decidió aplicar esta misma metodología en una prueba piloto con las muestras de cuatro pacientes, seleccionándolos en base a nuestros criterios de inclusión.

Debido a que en el cultivo de la cepa de referencia los resultados fueron positivos, se decidió corroborar este resultado utilizando muestras de pacientes, bajo las mismas condiciones de incubación y atmósfera microaerófila, a su vez evaluando otros parámetros como son número de biopsias, macerado y ureasa.

Se obtuvo mejor resultado al homogeneizar el tejido en un mortero de porcelana en comparación con el uso de tubos y dispersión de tejido, esto se debe a que las bacterias se localizan junto a las células del epitelio gástrico (intercelular) o sobre la capa de mucina, de manera que al homogeneizar el tejido se liberan estas bacterias y es mucho más factible el cultivo realizándolo en condiciones adecuadas. Es importante señalar esta técnica no afecta la recuperación de esta bacteriana. Para corroborar cual de las dos zonas (antro gástrico y borde de la úlcera) es la más adecuada para el cultivo a partir de las biopsias tomadas en los pacientes con úlcera gástrica y duodenal, aplicándose ureasa (biopsia) de manera simultanea siendo ambos resultados positivos, encontrando que el sitio más adecuado es el antro gástrico debido que se sabe que *H. pylori* se adhiere y coloniza por años esta zona y además los cultivos de muestras tomadas de borde de úlcera tuvieron crecimiento de flora acompañante en mayor proporción que las de antro. Posteriormente se analizaron los medios de cultivo.

Con el objetivo de verificar las condiciones de la cepa de referencia se decidió realizar una prueba piloto obteniéndose resultado con una de cuatro muestras de pacientes analizadas. Esto puede deberse a que diferentes características relacionadas con el paciente como son el diagnóstico endoscópico, tratamientos previos, tiempo de evolución, recidivas de la patología, que ocasionan modificaciones en la densidad bacteriana y por lo tanto en el resultado del cultivo bacteriano. Por otro lado la diferencia entre la densidad bacteriana contenida en la cepa de referencia y los aislados clínicos es mayor.

Por otro lado es importante señalar que los resultados de Anatomía Patológica fueron positivos para dos pacientes de las cuatro muestras, lo cual se explica porque los cultivos de la primera se desecharon antes de los 10 días debido a contaminación con bacterias y hongos.

En las condiciones finales (comparativas) una vez que se obtuvieron resultados positivos con incremento en el número de colonias, así como resultados positivos en los subcultivos. Se determino utilizar estas mismas condiciones utilizando el suplemento inhibidor Skirrow, el cual esta documentado como uno de los antibióticos más recomendados para el cultivo de *H. pylori*, el cual también se utiliza para el aislamiento de *Campilobacter*, actúa disminuyendo el crecimiento de la mayor parte de patógenos que se encuentran en las muestras que manejamos en este trabajo de investigación, sin afectar la recuperación de *H. pylori*. Es interesante mencionar que cuando se utilizo este inhibidor se redujo notablemente el número de contaminaciones, permitiendo el aislamiento adecuado y la recuperación en el subcultivo. De igual manera se decidió usar polienriquecimiento ya que es un aditivo que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos exigentes como son vitaminas, aminoácidos, enzimas, hierro y dextrosa (Giono y cols. 2008 ⁴⁵).

Otro aspecto importante es que al confirmarse el diagnóstico presuntivo de *H. pylori* mediante el resultado de ureasa se demostró que la cantidad de bacterias

es diferente en cada paciente, ya que en algunas se requería de la colocación de mayor cantidad de muestra para poder obtener el resultado positivo, lo que explica la variación en la densidad bacteriana en cada una de las muestras. Los resultados en la prueba de ureasa a partir de la biopsia y de anatomía patológica marcan radicalmente los resultados obtenidos mediante el cultivo de este patógeno, ya que influyen de manera característica las condiciones específicas implícitas en cada paciente.

El tiempo de incubación para aislar *H. pylori* utilizando base agar Casman con y sin Skirrow fue del 2 a 7 días de los cultivos positivos siendo el promedio de 2 a 3 días, con crecimiento en los cuatro cuadrantes (+5) y subcultivos positivos, fue menor en relación a los cultivos con Base Agar *Brucella* con y sin VCN si observamos crecimiento de colonias fue en la zona de descarga, y el crecimiento de flora acompañante, sin lograrse aislar para subcultivo y el periodo de días para la identificación de *H. pylori* fue de 3 a 10 días. Sin embargo, al modificar el inhibidor por Skirrow y Isovitalex, obtuvimos colonias de manera aislada y en menor cantidad que en los otros dos medios de cultivo, y el periodo de días para la identificación de *H. pylori* fue de 3 a 7 días, con crecimiento en los cuatro cuadrantes (+5), y los subcultivos positivos.

Se obtuvo un 68.2% de prueba de ureasa positivas, 36.4% de positividad por cultivo y 50% por histología de un total de 44 muestras, estos porcentajes de positividad para el diagnóstico de *H. pylori* es menor a lo reportado en la previamente literatura. No obstante, en relación al resultado de la prueba ureasa debemos considerar que como reportan varios autores en el antro gástrico pueden estar presentes otras bacterias además de *H. pylori* como son *pseudomona*, *estafilococos*, *estreptococos*, entre otros, que son productoras de ureasa en las muestras de biopsias gástricas, por lo que podemos obtener resultados falsos positivos. Por lo anterior, es importante considerar que la ureasa es un diagnóstico presuntivo de la presencia de *H. pylori* y no es una prueba concluyente. Que puede dar resultados falsos positivos y a su vez generar tratamientos inadecuados (Mandado y cols. 2003 ⁷⁸).

El número de biopsias es un aspecto fundamental para obtener mejores resultados en el cultivo, iniciamos con una sola biopsia, y debido a las pruebas realizadas durante el estudio piloto se determino que se usarían dos para el protocolo. Es importante resaltar que en la fase comparativa final se utilizaron cuatro biopsias, con la finalidad de evaluar si podía existir un incremento en el porcentaje de recuperación de esta bacteria, encontrándose que de 5 muestras procesadas 4 fueron positivas, esto puede ser resultado del análisis de cuatro zonas diferentes y al aumento de la densidad bacteriana utilizada para el cultivo (López-Brea, 2004 ⁷³).

Cuando se utilizó VCN o Thayer Martin se observó que el crecimiento de *H. pylori* es menor, requiere mayor cantidad de días para obtener resultados y la inhibición de la flora acompañante es menor observando contaminación del cultivo

desde las 24 horas, y debido a que el crecimiento de esta bacteria es en promedio a partir de 48 a 72 hasta 10 días, en algunas muestras es difícil valorar la presencia o ausencia de *H. pylori* (Chillihua y cols. 2003, Murray y cols. 2003^{21,90}).

El porcentaje de los derivados sanguíneos de caballo tanto la sangre laqueada como el suero, algunos autores manejan incluso sangre completa de caballo también influye de manera importante en los resultados, por lo cual utilizarlos al 10% mejora el crecimiento bacteriano (Giono y cols. 2008⁴⁵).

En cultivos viejos después de las 72 horas los bacilos toman formas cocoides, misma que se considera un periodo latente de la bacteria en el cual ya no se recupera ni en resiembra, ni en congelación. Además que pruebas bioquímicas como la catalasa se modifica, dando resultados positivos dudosos (Buckley y cols. 1998¹⁶).

Se compararon los resultados obtenidos en las diferentes bases de agar adicionados con sangre de carnero, sangre laqueada y suero de caballo, utilizados para el cultivo ya que son ampliamente recomendados, aunado a que obtuvimos resultados positivos con el uso de los mismos.

Las características de las colonias bacterianas encontradas fueron en base agar *brucella* colonias pequeñas, lisas, grisáceas predominantemente, a diferencia de los cultivos en base agar Casman en los cuales se observaron colonias translúcidas como “gotas de rocío”, la morfología microscópica encontrada fueron bacilos cortos en forma de “S”, “herradura” y “alas de gaviota”, sin embargo en algunas muestras se observaron bacilos largos que solo han sido reportados por algunos autores (Kasper y cols. 2005, Quiroga y cols. 2005^{65,109}), estas variantes podrían estar relacionadas con los factores de virulencia, cambios de adaptabilidad al ambiente o las características de las diferentes cepas infectantes. Esto indica que el medio de cultivo permite el crecimiento sin embargo, si existen diferencias en las bacterias, lo cual indica que para analizar estas variaciones encontradas en los aislados clínicos de deben realizar tipificaciones fenotípicas y genéticas.

La recuperación de *Helicobacter pylori* en los aislados clínicos puede estar relacionada con la densidad bacteriana que tenga el paciente, así observamos que en los pacientes con diagnóstico de Úlcera Duodenal tuvimos mayor número de cultivos positivos. Este dato coincide con lo reportado en la literatura en relación a que la correlación de Úlcera duodenal se asocia con mayor frecuencia a la presencia de *H. pylori* comparado con la Gastritis Nodular Crónica y Úlcera Gástrica (Péptica) (Pajares y Gisbert, 2006¹⁰³).

Obtuvimos un grupo de pacientes con diagnóstico de Gastritis Nodular Crónica debido a que de los tres diagnósticos que consideramos como criterios de inclusión fue el diagnóstico más frecuente en los pacientes que acudieron a la consulta del Servicio de Endoscopia. Además la mayoría de los pacientes con diagnóstico de Úlcera Gástrica (Péptica) y Úlcera duodenal que acudieron se trato

pacientes que estaban en el Servicio de Urgencias y Medicina Interna debido a sangrado de tubo digestivo alto y en tratamiento (Inhibidores de la bomba de protones, antibióticos, etc.), los cuales debido a su mecanismo de acción pueden causar una disminución de la densidad bacteriana *H. pylori* a nivel de la mucosa gástrica y a su vez resultados falsos negativos en el cultivo.

Otro aspecto interesante es que en estos pacientes se observó que frecuentemente tenían diagnóstico de enfermedades crónico-degenerativas como Diabetes Mellitus o enfermedades que causan inmunosupresión como infecciones virales (Hepatitis), entre otras, lo cual nos sugiere que la respuesta inmune desempeña un papel fundamental en relación a las manifestaciones clínicas asociadas a la infección por *H. pylori*. Estas características de los pacientes los excluían del proyecto de investigación. Lo anterior ocasiono que en los grupos por diagnóstico endoscópico quedaran formados con diferente número de pacientes y sobre todo en menor número con úlcera gástrica y duodenal.

Es importante considerar que no encontramos correlación estadísticamente significativa entre los resultados de cultivos positivos y el diagnóstico histológico (Hematoxilina-Eosina) positivos a *H. pylori*, esto puede estar relacionado con que esta bacteria coloniza la mucosa gástrica en forma de parches (sitios de toma de biopsia son diferentes) y a la presencia de formas cocoides en el paciente. Por otro lado, es importante mencionar que mediante el análisis de las biopsias utilizando la tinción de hematoxilina/eosina en el departamento de anatomía patológica, se encontró que 17/44 muestras (38.6%), tuvieron diagnóstico de metaplasia, la cual se considera una lesión premaligna y que puede dificultar la recuperación de *H. pylori* en el cultivo, ya que se ha reportado que esta bacteria no coloniza zonas de metaplasia (Baquero y cols. 2004, Kasper y cols. 2005^{10,65}). Sin embargo, obtuvimos 5 cultivos positivos (+1) que tenían este diagnóstico histológico. Así como también 4 cultivos negativos que por histología se diagnóstico infección por esta bacteria. Encontramos que se asocio más frecuentemente a la Gastritis Crónica Nodular y Úlcera Gástrica, en relación al primer grupo debemos considerar que es el grupo de pacientes de mayor tamaño y afectando el grupo de edad de 40 a 59 años (52.9%), al igual que la presencia de infección por *H. pylori*, sin diferencias en género. Por lo que la metaplasia es un factor importante que influye probablemente en la densidad bacteriana y a su vez en los resultados en el cultivo.

El porcentaje de recuperación de *H. pylori* a partir de aislados clínicos en cultivo, coincide con lo reportado en estudios previos a nivel Nacional (Giono y cols. 2008⁴⁵).

De los pacientes estudiados se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p= 0.023$), en género femenino el 43.2% con diagnóstico de Gastritis Crónica Nodular, 4.5% úlcera duodenal, a diferencia del género masculino con 29.5% Gastritis Crónica Nodular, 13.6% úlcera gástrica o péptica y 9.1% úlcera duodenal. Se han reportado diferencias en genero de la respuesta de la mucosa a la infección de *H. pylori* y la atrofia y metaplasia intestinal en cuerpo gástrico, es

más severa en hombres que en mujeres, particularmente en pacientes de edad avanzada, probablemente asociada a una alta inducción de expresión del mRNA de COX-2, observándose mayor porcentaje de úlcera gástrica y duodenal en este grupo de pacientes y a su vez mayor frecuencia de Gastritis Crónica Nodular en mujeres. Siendo el grupo de edad con mayor frecuencia de enfermedades gastroduodenales de 40-59 años 19/44 (43.2%). Por otro lado, aunque algunos autores recomiendan que el cultivo se realice posterior a un periodo de uno a tres meses de suspensión de tratamiento, en este trabajo de investigación se observó dificultad para encontrar pacientes que fueran a endoscopia y que estuvieran sin tratamiento previo de una semana (Del Valle y cols. 2008, Maghidman y cols. 2001, Murakami y cols. 2006^{28,77,89}).

El síntoma más frecuente fue el dolor abdominal recurrente (63.6%), dato reportado previamente en estudios realizados en niños con infección por *H. pylori* (Giono y cols. 2006⁴³). Debido a que esta bacteria puede colonizar de manera crónica se observó que el tiempo de evolución de las enfermedades gastroduodenales presentes en los pacientes participantes fue desde un mes hasta 30 años. Se encontraron 1 caso de Úlcera Gástrica y 3 casos de Úlcera Duodenal en el grupo de 20 a 39 años de edad, lo cual podría estar relacionado con la adquisición de la infección por esta bacteria en etapas tempranas de la vida (Torres y cols. 2004¹³⁸).

Se encontraron 4 pacientes con antecedente familiar de enfermedades gastroduodenales de los cuales 1 está en tratamiento actualmente. Estos datos son importantes debido a que se ha identificado que la infección de miembros de la familia como un factor de riesgo para la transmisión de *H. pylori*. Debido a que se ha encontrado homología en el genoma de *H. pylori* en miembros de la misma familia (Azevedo N. y cols. 2006, Morales y cols. 2003, Tierney L. y cols. 2006^{7,85,137}).

El 45.5% del total de los pacientes tuvieron un índice tabáquico > 20 cigarrillos, este dato concuerda con lo reportado en la literatura, ya que el tabaquismo está considerado como un cofactor importante en la manifestación de estas patologías (Kasper y cols. 2005⁶⁵).

Los mejores resultados en la fase comparativa final de medios de cultivo, se encontró que al utilizar Casman/SLC/Skirrow se obtuvo mayor crecimiento bacteriano por número de colonias y en más cuadrantes que con Brucella (Wilcoxon), y a su vez al utilizar Casman/Suero/Skirrow el crecimiento bacteriano fue mayor que con Cassman/SCL/Skirrow ($p=0.016$, Wilcoxon). Por lo cual para la identificación de *H. pylori* la base agar más recomendable es Casman con 10% de suero de caballo y suplementado con inhibidor Skirrow.

El aislamiento mediante cultivo de *Helicobacter pylori* es sin duda el método más específico en el diagnóstico del microorganismo, por lo cual es importante que se realice de manera rutinaria en las Instituciones de salud, y de esta manera otorgarle al paciente un tratamiento individualizado, así como un mejor seguimiento del mismo.

XIII. CONCLUSIONES

- Hasta donde sabemos es el primer estudio donde se reporta la estandarización del método para el cultivo de *Helicobacter pylori*, utilizando todos los datos reportados en la literatura. Se obtuvo un método de cultivo sensible, eficiente y reproducible. El cultivo de esta bacteria utilizando las condiciones antes mencionadas se obtiene en un promedio de 2 a 4 días (3 días).
- Para el crecimiento y recuperación de *H. pylori* se requieren de medios de cultivos enriquecidos que proporcionen todos los nutrientes necesarios.
- Existe una variación importante en la densidad bacteriana de cada paciente, que afecta directamente los resultados obtenidos mediante el cultivo.
- Debido a que la muestra que es aislada a partir de la biopsia de antro gástrico, es necesario el uso de medios de cultivo adicionados con antibióticos.
- No se encontró correlación significativa entre el resultado del diagnóstico microbiológico (cultivo e histológico), esto puede deberse a que la distribución de *Helicobacter pylori* en el estómago es en forma de “parches” y no de manera difusa, resultando falsos negativos en los distintos métodos diagnósticos que se utilizan para su identificación.
- De los medios utilizados en el que observamos mayor crecimiento de *Helicobacter pylori* es la base Agar Casman con 10% de suero de caballo suplementado con inhibidor Skirrow y 1% de isovitalex.
- Debido a que el polienriquecimiento (Isovitalex) contiene un alto valor nutritivo mejora la recuperación bacteriana de aislados clínicos en los cuales la densidad bacteriana varía dependiendo de las características específicas de cada paciente.

XIV. PERSPECTIVAS

Realizar los siguientes estudios, a partir de aislados clínicos positivos a *H. pylori*:

- Microbiología Clínica (Estudio de bacterias). Además de generar información, realizar las pruebas de identificación, ensayos de susceptibilidad y determinar patrones de resistencia a antimicrobianos y orientar al Médico para otorgar al paciente tratamiento individualizado y adecuado.
- Biología Molecular (Genética). Para la realización de genotipificación, clasificación de cepas, estudios en relación a factores de virulencia como la Isla de Patogenicidad (PAI) y diversidad genética a partir de las bacterias recuperadas.

XV. REFERENCIAS

1. Abdo J. M. Uscanga L. Sobrino-Cossio S. Rivera-Ramos J.F. Huerta-Iga F. Tamayo. Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex. Vol. 72, No.3. p. 323-38. (2007).
2. Acosta C.P. Arboleda Y. Sierra C.H. *Helicobacter pylori*: Infección y Enfermedad. J Infect Dis.Vol.178. No.1.p.1089-1094. (1998).
3. Aguilar S. Majalca- Martínez C. León-Espinosa F. Avila-Vargas G. Sánchez-Medina R. y cols. Estudio comparativo entre las pruebas de ureasa rápida y el estudio de histológico para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Mex. Vol. 69.No. 3.p. 136-142. (2004).
4. Araújo F. Brandao N. Pinheiro A. Azebedo M. Freire A. Medeiros C. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in advanced gastric carcinoma Arq Gastroenterol. Vol. 43. No.4.p. 288-292 (2006).
5. Asenjo L. Gisbert J. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en el linfoma MALT gástrico: una revisión sistemática. Rev Esp Enferm Dig. Vol. 99. No. 7.p.398-404. (2007).
6. Aspholm M. Olfat F. Nordén J. Sondén B. Lundberg C. y cols. SabA Is the *H. pylori* Hemagglutinin and Is Polymorphic in Binding to Sialylated Glycans. PLOS Pathogens. Vol.2. No.10. p. 0989-0998. (2006).
7. Azevedo N. Guimareas N. Figueiredo C. Keevil C. Vieira M.A new Model for the Transmission of *Helicobacter pylori*: Role of Enviromental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity.Critical Reviews in Microbiology. Vol. 1. No. 33. p.157-169. (2007).
8. Ballesteros M.A. y cols. *Helicobacter pylori* y metaplasia gástrica duodenal. Rev Gastroenterol Mex. Vol. 69. No. 4.p. 210. (2004).
9. Baltrus D. Amieva M. Covacci A. Lowe T. Merrell S.Otteman K, y cols.The complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27.J. Bacteriol. Vol.191. No.1. p.447-448. (2009).
10. Baquero M. Domingo D. López- Brea, Royo G. Manual de Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. No. 17. (2004).
11. Barresi G. Vitarrelli E. Giuffré G. Grosso M. Tuccari G. Simple mucin-type carbohydrate antigens in *Helicobacter pylori*-positive chronic active gastritis. Virchows Arch. Vol. 435. No. 1.p. 458-459. (1999).
12. Blanco-Delgado C.A. Rivera P. Hernández F. Hevia F.Guillén F. y cols. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital de San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Rev Biomed. Vol.12. No.1.p.1-4. (2001).
13. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* eradication and its implications for the future. Aliment Pharmacol Ther. Vol.11. No.1.p. 103-7. (1997).
14. Boren, Falk P. Roth KA. , Larson G. Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens.

- Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine. *Science*. Vol. 262. No. 17. p. 1892 – 1895. (1993).
15. Brooks, G.F. Butel, J.S. Morse, S A. *Helicobacter pylori*. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17a Edición. Editorial Manual Moderno. p. 293-301. (2002).
 16. Buckley M. O'Morain. *Helicobacter* biology-discovery. British Medical Bulletin. Vol. 54 No. 1. p. 7-16. (1998).
 17. Carmona-Sánchez R. y cols. Erradicación de *Helicobacter pylori* en dispepsia no ulcerosa. *Rev Gastroenterol Mex*. Vol. 69. No. 4. p. 288-289. (2004).
 18. Castro M. Sánchez D. García M. Galán V. Rodríguez C. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using ureasa rapid test in patients with bleeding duodenal ulcer: influence of endoscopic signs and simultaneous corporal and antral biopsies. *Rev Esp Enferm Dig*. Vol. 96. No. 9. p. 599-605. (2004).
 19. Cava F. y Cobas G. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. Centro de Biología Molecular. España. *VacciMonitor* 1. Año 12. No. 1. (2003).
 20. Cervantes-García E. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Rev. Fac. UNAM*. Vol.49.No.4. p. 163-167. (2006).
 21. Chillihua D. Palomino H. Aguilar A. Aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas en pacientes con gastritis en el hospital regional de cusco, Perú. *Situa*. Vol. 13.No. 1: 15-18. (2003).
 22. Chmiela M. Michetti P. Inflammation, Immunity, Vaccines for *Helicobacter* Infection. *Helicobacter*. Vol.11. No. 1.p. 21-26. (2006).
 23. Citelly P, Diana M, Huertas, Mónica G, Martínez, Julián D *et al*. Los genotipos de *Helicobacter pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico en Colombia. *Rev. méd. Chile*. Vol.130. No.2. p.143-151. (2002).
 24. Citelly, D. Henao, S. Orozco, O. Martinez, J. Detección de *Helicobacter Pylori* en Colombia: diferentes metodologías aplicadas a su estudio en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. *Rev. Colomb. Gastroenterol*. Vol. 14. No. 3. p.164-169. (1999).
 25. Clyne M. Dolan B. Reeves E. Bacterial factors that mediate colonization of stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *Fems Microbiol Lett*. Vol. 268. No.1.p.135-143. (2007).
 26. Correa I. Gastric neoplasia. *Curr Gastroenterol Rep*. Vol. 4. No. 6.p. 463-470. (2002).
 27. Cultek. Soluciones y cultivos celulares. Protocolos y técnicas. p.7-19. (2006).
 28. Del Valle M.C. Suárez de la Torre Y. Casamayor Z. *Helicobacter pylori*, prevalencia y asociación con enfermedades digestivas. *Revista Electrónica Portales Médicos*. Vol. 3. No. 4. p.1- 22 (2008).
 29. Díaz J. Tantaleán E. Calipuy W, Villacorta R, Sánchez L. Castañeda A. Microflora Intragástrica endógena en cáncer de estómago. *Rev. Gastroenterol. Perú*. Vol. 18. No.3.p. 102-108. (1998).
 30. Duque M.X. Efecto de la infección por *Helicobacter pylori* sobre la respuesta a la suplementación semanal con hierro y vitaminas en usuarios de los

- albergues escolares del Instituto Nacional Indigenista en Huejutla, Hidalgo. Revista Mexicana del Seguro Social. Vol.34. No. 1. p. 101-113. (2004).
31. Falk P. y cols. An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropismo in the human gastric epithelium. Microbiology. Vol.90.p. 2035-2039. (1993).
 32. Falkenhagen K. Lanier V. Braziel R. White C. Rosenbaum J. y cols. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Receptors in Acne Rosacea. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. No. 47. Vol. 1.p. 598. (2006).
 33. Fendrick A. McCort J. Chernew M. y cols. Immediate eradication of *Helicobacter pylori* in patients with previously documented peptic ulcer disease: clinical and economic effects. Am J Gastroenterol. Vol. 92. No. 11.p. 2017-2024. (1997).
 34. Fica A. Diagnóstico, manejo y prevención de infecciones en pacientes con cirrosis hepática. Rev Chil Infec. Vol.22. No.1. p.63-74. (2005).
 35. Forbes B.A. Sahm D. Weissfeld A. S. Bailey, Scott's. Diagnostic Microbiology. Eleventh Edition. Edit. Mosby. p. 474-481. (2002).
 36. Forné M. Monés J. Viver J.M. *Helicobacter pylori* y tratamiento de la infección en pacientes con Úlcera Duodenal. Universidad Autónoma de Barcelona. Depto. De Medicina.p. 1-176. (2001).
 37. Fowler, Thomas J.R. Atherton J. Roberts I.S. High N. J. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. Cellular Microbiology 8 (1). Vol.18. p. 44-54. (2006).
 38. Fox J. Chilvers T. Goodwin S. Taylor N. Edmonds P. y cols. *Campylobacter mustelae*, a New Species Resulting from the Elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *Mustelae* to Species Status.Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 39. No. 3. p. 301-303. (1989).
 39. Fuentemayor B. Cavazza M. Beltrán de luengo H. Gallegos B. Inciarte A. y cols. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastrointestinal benigna. Rev. Soc. Venez. Microbiol. No.22.Vol.1. p. 27-31. (2002).
 40. Gancz H. Jones K. Merrell S. Sodium Chloride Affects *Helicobacter pylori* Growth and Gene Expression. J. Bacteriol. Vol.190. No.11.p. 4100-4105. (2008).
 41. García-Campos J.A. Alarcón T. López-Brea M. La infección por *Helicobacter pylori*. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. No. 8.Vol.1. (2003).
 42. Gené E. Azagra R. Calvet X, Cubells MJ. Manejo de la infección primaria por *Helicobacter pylori* en la atención primaria. Aten Primaria. Vol. 29. No. 8. p. 486-94. (2002).
 43. Giono S. Carmolina P. Aguilar G. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad cag de *Helicobacter pylori*. Rev Latinoam de Microbiol. Vol. 48. No.2.p. 99-104. (2006).

44. Giono S. Escobar G. Valdespino G. Diagnóstico de laboratorio de infecciones Gastrointestinales. México. INDRE. Secretaria de Coordinación y Desarrollo. p. 61-71, 295-307. (1994).
45. Giono S. Ochoa S.A. Majalca C. Torres M. Torres J. Importancia del diagnostico microbiológico y de la genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Departamento de Microbiología. Unidad de Enfermedades infecciosas y Parasitarias. CMN Siglo XXI, IMSS. (2008).
46. Gómez J. Caracterización molecular de cepas de *Helicobacter Pylori*. Reproducción del modelo animal en ratones y estudio de los mecanismos de la inflamación. Universitat de Barcelona. p. 1- 69. (2001).
47. González-Carbajal M, Rojas Z. Grá O. Ávalos G. Alteraciones histológicas en la mucosa gástrica y prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos. Rev Panam Infectol; 6(4):8-14. (2004).
48. Goodwin, C.S. Armstrong, J.A. Shievers, T. Peters, M. Collins, M.D. y Sly, L. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov and *Helicobacter mustelae* comb. nov. Int. Syst. Bacteriol. No. 39. Vol.1. p. 397-405. (1989).
49. Gustafsson A. Hultberg A. Sjostrom R. Kacs Kovics I. Breimer M.E. Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonización using porcine milk. Glicobiology. Vol. 16. No. 1 pp. 1-10. (2006).
50. Guruge J.L. y cols. Epitelial alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. Microbiology. Proc Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95. March. p. 3925-3930. (1998).
51. Gutiérrez Y. Márquez R. Peraza S. Becker J.C. Romero S. y cols. Análisis inmunohistoquímico de *p53*, *CERB-B2*, *EGFR* y *PCNA*. Gen Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. Vol. 60. No. 3. P. 183-185. (2006).
52. Hancock R. Bacterial outer membranes: evolving concepts. ASM news. Vol. 57. No. 1. p. 175-182. (1991).
53. Harris P.D. Serrano H.C. Venegas E. A. Vacunas en desarrollo: *Helicobacter pylori*. Universidad católica de Chile. Facultad de Medicina, Departamento de pediatría, sección Gastroenterología. (2006).
54. Hatakeyama M. Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. Vol.11. No.1.p.14-20. (2006).
55. Heijenoort J.V. Formation of glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglucan. Glicobiology. Vol.11. No.3. p. 25-36. (2001).
56. Herrera M. L. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. Rev. Med. Hosp Nac Niños (Costa Rica). Vol. 34. No.1.p. 33-41. (1999).
57. Heric A. Pathogenesis of Raynaud's Phenomenon. Rheumatology. Vol. 44. No.1. p. 587-596. (2005).
58. Henry B y cols. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Edición homenaje a Tood-Sanfor y Davidsohn. Editorial Marbán. P. 148-156. (2007).

59. Higashi H. Tsutsumi R. Fujita A, Yamazaki S. Asaka M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. PNAS. Vol.99. No. 22. p. 14428-14433. (2002).
60. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap11/>). Morales.
61. Huang J. y cols. Shidhar S. Hunt R. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic. Ulcer disease: a meta-analysis. Lancet. Vol. 14. No. 22. p. 359. (2002).
62. Huguet J, Zamudio M. El gen de una proteína de membrana externa OMP22 como un nuevo blanco para la detección de *Helicobacter pylori* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Rev Peru Med Exp Salud Pública; 19 (supl). p. 27. (2002).
63. Hynes S.O. Broutet N. Wadstrom T. Mikelsaar M. O'Toole P.W. Telford J. Engstrand, Kamiya S. Mentis A. F, Moran A.P. Phenotypic Variation of *Helicobacter pylori* Isolates from Geographically Distinct Regions Detected by Lectin Typing. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40, No. 1. Jan. p. 227-232. (2002).
64. Hynes O. S. Hirno S. Wadstrom T. Moran P. A. Differentiation of *Helicobacter pylori* Isolates Based on Lectin Binding of Cell Extracts in an Agglutination Assay. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 37. No.6. June. p. 1994-1998. (1999).
65. Kasper D. Braunwald E. Fauci S.A. Hauser L. S. Longo L.D. y Jameson J.L. . Harrison Principios de Medicina Interna. 16ª Edición. Vol. II. Ed. Mc GrawHill. Chile. p.1024-1057. (2005).
66. Khin M.M. Song H. J. Cong N.H. Wadstrm T. Ho B. Agglutination of *Helicobacter pylori* coccoids by lectins. World Journal of Gastroenterology. Vol. 6. No. 2. p. 202-208. (2000).
67. Kobayashi I. Murakami K. Kato M. Kato S. Azuma T y cols. Changing Antimicrobial Susceptibility Epidemiology of *Helicobacter pylori* Strains in Japan between 2002 and 2005. J. Clin. Microbiol. Vol. 45. No.12. p.4006-4010. (2007).
68. Kuster J. van Vliet A. Kuipers E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin. Microbiol. Rev. Vol.19. No.3. p. 449-490. (2006).
69. Ladrón de Guevara L. y cols. Evaluación de sintomatología y calidad de la dispepsia funcional antes y después del tratamiento de erradicación de *H. pylori*. Rev Gastroenterol Mex, Vol. 69, No. 4. p. 203-208 (2004).
70. Larrosa-Haro y cols. Eficacia de dos esquemas de erradicación de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente. Rev Gastroenterol Mex, Vol. 69, No. 4. p. 76-81 (2004).
71. Lee S. Choe G. Kim H. Song J. and Park KU. Expression of Lewis antigens and their precursors in gastric mucosa: relationship with *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis. J Pathol. p. 209:88-94. (2006).
72. Linz B. Balloux F. Moodley Y. Manica A. Liu H. y cols. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. Vol.445.No. 22.p. 915-918. (2007).

73. López-Brea M. La infección por *Helicobacter pylori*: Premio Nobel de Medicina. Rev Esp Quimioterap. Vol. 18. No. 4. p. 271-272. (2005).
74. López F. Santa-Olalla M. Custardoy J. EPOC y enfermedad cerebrovascular. Rev Clin Esp. Vol. 207. No.1. p.22-26. (2007).
75. Lozano J. Lucena M. Fuentes Y. Prevalencia de infección por *H. Pylori* en pacientes con gastritis. Correlación anatomopatológica. Experiencia personal. Gen Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. Vol. 60. No. 3. p. 196-199. (2006).
76. Lundin A. Bjorkholm B. Kupersmidt I. Unemo M. Nilsson P. y cols. Slow Genetic Divergence of *Helicobacter Pylori* Strains during Long- Term Colonization. Infect. Immun. Vol. 73. No. 8.p. 4818-4822. (2005).
77. Maghidman S. Cok J. Bussalleu A. Hallazgos histopatológicos en la gastritis nodular. Experiencia en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. Rev. gastroenterol. Perú. Vol. 21. No. 4 .p. 21-28 (2001).
78. Mandado P. y cols. Diagnóstico morfológico de *Helicobacter pylori* mediante citología gástrica por cepillado. Rev Cubana Med.Vol. 42. No.1.p.27-33. (2003).
79. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Métodos de laboratorio para ensayos de sensibilidad de bacterias frente a antimicrobianos. Capítulo I.1.10. (2004).
80. Martínez T. Martínez G. *Helicobacter pylori* ¿un nuevo factor de riesgo cardiovascular?. Rev Esp Cardiol. 55(6).pp. 652-656. (2002).
81. Matteo M.J. Granados G. Perez C. V. Olmos M. Sánchez C. y Catalano M. *Helicobacter pylori* cag pathogenecity island genotype diversity within the gastric niche of single host. Journal of Medical Microbiology. Vol. 56. No.1.p. 664-669. (2007).
82. Miller- Podraza, Lanne B. Angtrom J. Teneberg S. Abul Milh M. y cols. Novel Binding Epitope of *Helicobacter pylori* Found in Neolacto Carbohydrate Chains. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 280. No. 20. Pp. 19695-19703. (2005).
83. Mohar A. Ley C. Guarner J. Herrera-Goepfert R. Sánchez L. Halperin D. Parsonnet J. Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta a tratamiento en Chiapas, México. Gac Méd Méx Vol. 138. No.5. pp. 405-410. (2002).
84. Moncayo J. I. Santacruz J.J. y cols. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío. Colombia Médica. Vol.37. No. 3. Julio-septiembre. (2006).
85. Morales E. M. Castillo-Rojas G. López-Vidal Y. Cravioto A. *Helicobacter pylori*. Lab. De inmunología Molecular Microbiana. Facultad de Medicina, UNAM. (2003).
86. Mueller A. O'Rourke, Chu P. Chu A. Dixón M. y cols. The Role of Antigenic Drive and Tumor-Infiltrating Accesory Cells in the Pathogenesis on *Helicobacter*-Induced Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. AJP. Vol. 167. No. 3. P.797- 812 (2005).
87. Muñoz L. Gonzalez-Gonzalez G. Pérez-Pérez G.I. Giono-Cerezo S. Muñoz O. Torres J. A comparison of Lewis X y Lewis Y Expresion in *Helicobacter*

- pylori* Obtained from Childrens and Adults. JID. Vol. 183.No. 1. P. 1147-1151. (2001).
88. Muñoz L. Carmolina M. Hernández R. Giono S. Ramòn G. Muñoz O. Torres J. Immune and Proliferative Cellular Responses to *Helicobacter pylori* infection in the Gastric Mucosa of Mexican Children. Journal compilation, *Helicobacter* 12: 224-230. (2007).
 89. Murakami K. Kodama M. Fujioka T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. Vol. 12. No. 17.p. 2713-2720. (2006).
 90. Murray P. Jo Baron E. Pfaller M.A. Tenover J.C. Tenover J.C. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 8 TH Edition. Washinton D.C. p. 915-923 (2003).
 91. Nagy V. Facsco A. Takacs L. Balazs E. Berta A. Balogh I. Edes I, Czuriga I, Pfliegler G. Activated protein C resistance in anterior ischaemic optic neuropathy. *Acta Ophthalmol Scand*. Vol. 82 No 2. p. 140-143. (2004).
 92. Navarro-Hernández y cols. Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *Helicobacter pylori*. *Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias*. Vol. 12. Edición especial III. p. 79-89. (2007).
 93. NCCLS. Documento M31-A. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Subsecretaria de Investigación y Tecnología. Buenos Aires. (2001).
 94. Nelson A. Bradley L. Diagnóstico de laboratorio: Un resumen general. *Focus on Field Epidemiology*. Vol. 4. No.3. (2007).
 95. Neumann H. Wex T. Vieth M., Peitz U. Roessner A. Malfertheiner P. Gastroesophageal reflux disease leads to major alterations in lectin-binding in the columnar epithelium of the gastroesophageal junction. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Volume 42, Issue 7. p.791 – 798. (2007).
 96. Norma ISO 17025. Aseguramiento de la calidad de medios de cultivos y reactivos.
 97. Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA-93. Medios de cultivos, Generalidades.
 98. Nyrén O. Blot W. *Helicobacter pylori* Infection: Mainly Foe but Also Friend? Editorials. *Journal of the Cancer Institute*. Vol. 98. No. 20.p. 1432- 1434. (2006).
 99. Olivares D. Gisbert J.P. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig*. Vol.98. No. 5.p. 364-386. (2006).
 100. Packard R. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction *Clinical Chemistry*. Vol. 54. No. 1. p. 24–38. (2008).
 101. País M. Carmolina P. Gonzalez V. Torres L. Giono C. Sensibilidad a antibióticos en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de población mestiza e indígena mexicana. *Rev Latinoam Microbiol*. Vol. 48. No. 2.p.105-112. (2006).

102. Pajares J.M. Functional dyspepsia and *Helicobacter pylori* –A stable coexistence?. Rev Esp Enferm Dig (Madrid).Vol.100. No. 9. p. 525-531. (2008).
103. Pajares J. M y Gisbert J.P. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. Rev. Esp. Enferm. Dig. Vol. 98. No. 10. p. 770-785. (2006).
104. Paredes E. Muñoz V. cols. Implicación del *Helicobacter* en la etiopatogenia de apendicitis aguda. Estudios preliminares. Cir pediátr. Vol. 20. No. 3.p. 156-158 (2007).
105. Parlapianno D. Villasmil L. Casanova G. Milano M. Vázquez L. Determinación del *Helicobacter pylori* en la placa dental por el test de la ureasa en pacientes dispépticos. Gen Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología. Vol. 60. No. 3. p. 179-182. (2006).
106. Perrone M, González-Valencia G, Carmolina M. Correnti M, Cavazza M. y cols. Identificación de genotipos de *Helicobacter pylori* provenientes de muestras de placa dental en la población Venezolana. Vol. 44. No. 1.p.1-8. (2006).
107. Peterson W. Fendrick A. Cave D. Peura D. Garabedian-Ruffalo S. *Helicobacter pylori*-related disease: guidelines for testing and treatment. Arch Intern Med. Vol.160. No.9. p. 1285-1291. (2000).
108. Petersson, Ch. Forsberg, M. Aspholm, M. Olaf F. O. O. Forslund, T. Borén, T. and Magnusson KE. *Helicobacter pylori* SabA adhesin evokes a strong inflammatory response in human neutrophils which is down-regulated by the neutrophil-activating protein. Med. Microbiol Immunol.Vol. 194. No.4.p. 195-206. (2006).
109. Quiroga A. J. Cittelly D. M, Bravo M. M. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *cag A* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. Revista Biomédica. Vol. 25. No. 3. p.1-9. (2005).
110. Raczko A. y cols. Characterization of new DsbB-like thiol-oxireductases of *campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and clasification of the DsbB family base on phylogenomic, structural and funtional criteria. Microbiology. Vol.1. No. 151. p. 219-231. (2005).
111. Rafols C. y cols. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in primary health care. Aten Primaria. Vol. 25. No. 8.p. 563-567. (2000).
112. Ramírez-Mayans J.A. y cols. Enfermedad ácido péptica y *Helicobacter pylori* en pediatría. Servicio de Gastroenterología y Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría. Acta Pediatr Mex (1998).
113. Ramírez-Ramos A. y cols. Comparación de la prevalencia de infección del estómago por el *Helicobacter pylori*, en el Perú en población japonesa y peruana. Acta de Gastroenterol Latinoam. Vol.35, No.4.p. 219-224. (2005).
114. Ramos A.M. Majalca C. Meléndez E. Aguilar O.A. Cravioto A. y cols. Medio químicamente definido como alternativa de cultivo para *Helicobacter pylori*. Bioquímica. Vol. 29. No.1.p. 96. (2004).

115. Ramos-Casals M. Font J. Primary Sjögren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts; Rheumatology. Vol. 44. No. 1. Pp. 1354–1367. (2005)
116. Ratman S. Fitzgerald B. Semiquantitative Culture of *Gardnerella vaginalis* in Laboratory Determination of Nonspecific Vaginalis. J. Clin. Microbiol. Vol.18. No. 2. P. 344-347. (1983).
117. Rivas-Transverso F. Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Revista Biomédica. Vol.11. No. 3. P. 187-205. (2000).
118. Robert M. Mayarí R. Martínez V. Criterios para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 37. No.1. (2006).
119. Roche N. Angstrom J. Hurting M. Larsson T. Boren T. y cols. *Helicobacter pylori* and complex Gangliosides. Infection and Immunity. Vol. 72. No. 23. pp: 1519-1529 (2004).
120. Rodgers C. van Zanten S. A meta-analysis of the success rate of *Helicobacter pylori* therapy en Canada. Can J Gastroenterol. Vol. 21. No. 5. P. 295-300. (2007).
121. Rodicio R. Mendoza M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clín. Vol. 22. No.4. p.238-245. (2004).
122. Roig F. Papel de los biomarcadores moleculares en la detección precoz de cáncer de pulmón. REV PATOL RESPIR. Vol. 11. No.4. p.149-150. (2008).
123. Rollán-Rodríguez Antonio. *Helicobacter pylori* y Úlcera Péptica. Boletín Escuela de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.; 23:No. 3. p. 130-135. (1994).
124. Rubinszten-Dunlop S. Guy B. Lis solo L. Fisher H. Identificación Journal of Medical Microbiology. Vol. 72. No. 3.pp: 54, 427-434 (2005).
125. Ryan J. K. Ray J.C. Sherris. Microbiología Médica. 4a. Edición. Mc GrawHill. México. p. 405-417. (2005).
126. Saad R. Chey W. A clinician's guide to managing *Helicobacter pylori* infection. Cleve Clin J Med. Vol. 72. No. 2. P. 109-110. (2005).
127. Salama N. González-Valencia G. Deatherage B. Aviles-Jimenez F. Atherton J. Genetic Analysis of *Helicobacter pylori* Strain Populations Colonizing the Stomach at Different Times Postinfección. J. BACTERIOL. Vol. 189. No. 10. P. 3834-3845. (2007).
128. Sánchez del Monte J. Sobrino S. Hernández G. Ayala G. Lárraga O. Relación entre la densidad bacteriana y los genes *VacA* y *cagA* con la respuesta al tratamiento para *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera péptica y/o gastritis crónica folicular. Endoscopia. Vol. 18, No. 2, p. 126-137, Año. (2006).
129. Secretaria de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Num. 25. Vol. 24. 17-13. Junio. (2007).

130. Segura M. Murillo G. Rojas-Dotor S. Rico G. Martínez H. Marcadores inflamatorios relacionados con asma e índice de masa corporal. *Revista Alergia de México*. Vol.54. No. 6. P. 196-200. (2007).
131. Siakantaris M. Pangalis G. Dimitriadou E. Kontopidou F. Vassilakopoulos T. y cols. Early-Stage Gastric MALT Lymphoma: Is It Truly Localized Disease? *The Oncologist*. Vol.14. No.1. p.148-154. (2009).
132. Soriano-Alvarez C. El rol del *Helicobacter pylori* en la fisiopatología de la enfermedad ulcerosa duodenal y cáncer gástrico. *HNREM-IPSS*. Vol. 1. No. 2. P. 25-32. (1998).
133. Stasi R. Sarpatwari A. Segal J. Osborn J. Evangelista M.L. Cooper N. y cols. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood*. Vol. 113. No.6. pp. 1231-1240. (2009).
134. Stryer L. Berg M. J. Tymoczko, J.L. *Bioquímica*. 5ª Edición. Editorial Reverté, S.A. España. p.295-318. (2004).
135. Sugimoto M. Furuta T. Shirai N. Kodaira C. Nishino M. y cols. Role of angiotensinogen gene polymorphism on *Helicobacter pylori* infection-related gastric cancer risk in Japanese. *Carcinogenesis*. Vol. 28. No. 9. p. 2
136. Tejeda A. Hernández M.R. Solís F. El microcosmos biológico ¿aliado o adversario de la salud humana? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Vol. 16. No.3. p.28-31 (2003).
137. Tierney Lawrence- Mc Pee Stephen J- Papadakis Maxine A. *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*. 41ª Edición. Ed. Manual Moderno. México. pp. 502-506, 515-518. (2006).
138. Torres J. González G. Dehesa V. Madrazo A. Pérez G. y cols. Infección por *Helicobacter pylori* en niños y adultos: factores asociados a la enfermedad y persistencia de la infección. *Revista Mexicana del Seguro Social*. Vol.34. No. 1. P. 18-28. (2004).
139. Totten P. Amsell R. Hale J. Piot P. Holmes K. Selective Differential Human Bilayer Media for Isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 15. No.1. p. 141-147. (1982).
140. Tsutsumi R. Takshashi, Azuma T. Higashi H. Hatakyama M. Focal Adhesion Kinase and Downstream Effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter pylori* Cag A. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 26. No. 1. Pp. 261-276 (2006).
141. Valenzuela E. J. *Helicobacter pylori*: 20 años después. *Revista Médica Chile*. Vol.132. p. 1339-1344. (2004).
142. Vargas A. Porras T. Henao R. S.C. Martinez M. J.D. Jaspe E. Detección de anticuerpos contra mucosa gástrica en pacientes con gastritis superficial, gastritis crónica atrófica y úlcera duodenal infectados por *Helicobacter pylori*. *Rev Colomb Gastroenterol*. Vol. 16. p.127-131. (2001).
143. Vollset S.E. Igland J. Jenab, Fredriksen A. Meyer K. y cols. The Association of Gastric Cancer Risk with Plasma Folate, Cobalamin, y Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Vol.16. No. 11. P. 2416-2424. (2007).

144. Walz A. Odenbreit S. Mahdavi J. Boren T. Rulh S. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*. Vol. 15. No. 7. Pp. 700-708. (2005).
145. Wang G. Olczak A. Forsberg L. Maier R. An oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in *Helicobacter pylori*. *J Biol. Chem.* Vol.1. No.1.p. 1-28. (2009).
146. Warren R. Marshall B. Undetected curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. Vol.1. No.1. p. 1273-1275. (1983).
147. Weng Z. Iglesias B. Abreu M. Beltrán J. R. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. *Revista Cubana Higiene y Epid.* Vol. 42. No.1. (2004).
148. Williams J. C. McInnis A. and Testerman T. L. Adherence of *Helicobacter pylori* to Abiotic surfaces Is Influenced by Serum. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.74, No. 4. p. 1255-1258. (2008).
149. Wu Y. Tsai H. Lin W. Hsu P. Shun C. y cols. Upregulation of CCL20 and Recruitment of CCR6+ Gastric Infiltrating Lymphocytes in *Helicobacter pylori* Gastritis. Vol. 75. No. 9. P. 4357-4363. (2007).
150. William J. McInnis K. Testerman T. Adherence of *Helicobacter pylori* to Abiotic Surfaces Is Influenced by Serum. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, No. 4.p. 1255-1258. (2008).
151. Zarate M.S. Dadamio J. Alí S. Giordanelli A. Smayevsky J. Torres M. Desarrollo y evaluación de una muestra para el control de calidad de Microbiología. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* Vol. 41. No. 1. (2007).

Anexo 1



UNIVERSIDAD MICHOACANA SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR.
IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Carta de Consentimiento informado

Tipificación de de *Helicobacter pylori* utilizando lectinas y carbohidratos

Yo _____ A los _____ días del _____ mes de _____ del 200_. he sido informado que en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” en colaboración con el servicio de gastroenterología y el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” se esta realizando el proyecto **“Estandarización del método para el cultivo de *Helicobacter pylori*”**. Entiendo que el objetivo de este estudio es proporcionar información del tipo de bacteria que afecta a la población de Morelia, Michoacán. La información que se adquiera será aplicada para que se proporcione un mejor tratamiento clínico. Me han informado que el proyecto incluye la realización de evaluaciones clínicas y de laboratorio.

Se me ha aclarado que mi participación es totalmente voluntaria y se me han explicado las pruebas y procedimientos que se me harán. Se me ha informado que la información que Yo proporcione será empleada para efectos de la presente investigación y será manejada cuidando mi privacidad y de manera anónima. Por lo que acepto donar una muestra de tejido y de suero para realizar el estudio.

Conociendo lo anterior, acepto participar en el estudio propuesto.

AUTORIZACION

NOMBRE: _____

FIRMA: _____

INVESTIGADOR: _____

FIRMA: _____

TESTIGO 1: _____

FIRMA: _____

TESTIGO 2: _____

FIRMA: _____

Anexo 2. Ficha de identificación

Nombre: _____.

Edad: _____

Genero: Femenino () Masculino ()

Estado civil:_____.

Escolaridad:_____Ocupación:_____.

Domicilio:Calle_____No._____

Col._____Localidad: _____,Teléfono_____.

Número de integrantes de la familia: _____.

Antecedentes familiares de enfermedad gastroduodenal o cáncer gástrico:

Familiares que padezcan alguna enfermedad gastroduodenal (cuál):

Hábitos alimenticios:

Come en casa () Come en la calle ()

Consume agua: Hervida () Embotellada () De la llave ()

Antecedentes personales patológicos:

Tabaquismo: Si () No () Alcoholismo: Si () No ()

Antecedente	de	enfermedad	gastroduodenal
(cuál):			

Se le había realizado endoscopia: si () no ()

Recibió tratamiento:

Cuál:_____

Mejoro: si () no ()

Tomo el medicamento de acuerdo a las indicaciones de su médico:

Si () no ()

Anexo 3. Datos personales del paciente y diagnóstico endoscópico.

No.	Nombre	Edad	Diagnóstico	Domicilio	Fecha
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					

Anexo 4. Recolección de datos de microbiología

No: _____ Fecha: _____

Paciente: _____ Edad: _____

Diagnóstico: _____

Muestra: Antro gástrico () Borde de úlcera ().

Medios de cultivo									
GSC									
GSC/ab									
Pruebas bioquímicas									
Urea									
Oxidasa									
Catalasa									
Tinción Gram									
Hipurato									
Observaciones									

Características de colonias

Macroscópicas: _____

Microscópicas: _____

Desecho de placas : _____ Días de incubación _____.

Diagnóstico histopatológico: _____.

Observaciones generales:

Anexo 5. Preparación de material.

Medios de cultivo	Fecha de elaboración/ No. placas	Fecha de caducidad	Fecha (termina material)/desecha
GSC			
GSC/ab			
Pruebas bioquímicas			
Ureasa			
Otros			
Caldo Brucella			
Observaciones Esterilizar (viales, morteros, tubos, solución salina, etc.)			