

122



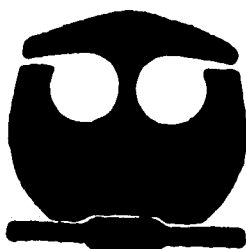
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Zej

FACULTAD DE QUIMICA

**LA IMPORTANCIA CLINICA DE Helicobacter pylori Y
EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS
ENFERMEDADES QUE OCASIONA AL HUMANO**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
CLAUDIA VILLAMAR CRUZ**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

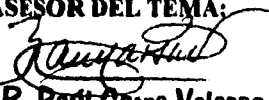
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. ELDA PENICHE QUINTANAR
VOCAL: PROF. RAÚL GARZA VELASCO
SECRETARIO: PROF. MA. DEL CARMEN CORTÉS DECUIR
1er. SUPLENTE: PROF. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
2do. SUPLENTE: PROF. MAITÉ ASTIGARRAGA ZAVALAETA


LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

- BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)
- BIBLIOTECA CENTRAL DE LA UNAM
- BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
- HEMEROBIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)
- CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN INP.

ASESOR DEL TEMA:


Q.F.B. Raúl Garza Velasco

SUSTENTANTE:


Claudia Villamar Cruz

AGRADECIMIENTOS

A dios

Por su presencia en mi vida.

A mis padres

Por todo el amor y confianza que han depositado en mi, porque he tenido la dicha de haber compartido con ustedes todos los momentos importantes de mi vida; gracias por creer en mi, y por impulsarme para llegar a esta meta .

A mis abuelos

Porque con su ejemplo he aprendido que para conseguir algo hay que trabajar mucho. Por su fortaleza ante las adversidades y por el cariño que nos tienen a mis hermanos y a mi.

A mis hermanos Juan I., Virginia, Gabriel, Olga y Edgard

Porque siempre podre contar con su cariño y por compartir conmigo sus sueños, éxitos y derrotas; gracias por respetar y apoyar todas mis desiciones. Los quiero mucho.

A Fernanda

Preciosa: gracias por bajar de tu estrella para darle un nuevo rumbo a nuestras vidas.

A Angye

Por ser la tia consentidora, y por todo el cariño y paciencia que nos has tenido.

A Arturo

Por todos los momentos especiales que hemos compartido, por todo el cariño, confianza y apoyo que he recibido de ti.

A la Dra. Martínez, Rocio B., y Tere H.

Porque juntas recorrimos el camino que alguna vez nos propusimos. Gracias por haber estado "ahí" siempre que las necesite.

A Ana P.(Penicillium), Xochitl M. (Toti), Vero C., y por supuesto a la P. C. Rocio G.

Por haber compartido conmigo algo más que un salón de clase, y sobre todo por el cariño y apoyo que siempre me brindaron.

Con cariño a:

Alfredo A.(cafre), Carlos C., Gina N., Guillermina P., Ivett M., Luisa J.(Chabela), Marco J. (Tio Toti), Nancy F., Raúl L. y al señor Clemente H.

De forma muy especial al
Q.F.B. Raúl Garza Velasco,
por su apoyo, confianza y
dedicación, en la elaboración
de este trabajo.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
I . CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>H. pylori</i>	
i . Clasificación	3
ii . Características microscópicas	4
iii . Propiedades culturales	4
II . IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>H. pylori</i>	
i . Generalidades	17
ii . Factores de virulencia detectados en <i>H. pylori</i>	22
iii . Patogenia	28
III . DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	
i . Métodos invasivos	30
ii . Métodos no invasivos	47
IV . TRATAMIENTO	50
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCIÓN

En el campo de la Infectología, uno de los hallazgos más interesantes de los últimos tiempos radica en haber establecido que tanto la gastritis como las úlceras gástricas y duodenales pueden ser ocasionadas por una "nueva" bacteria, la cual aparentemente cuenta con diversos factores de patogenicidad que, entre otras funciones, le permiten colonizar la mucosa gástrica, a pesar de las condiciones notablemente ácidas que predominan en el estómago.

Helicobacter pylori es actualmente uno de los microorganismos más estudiados ya que, inclusive, también se le ha señalado como probable factor desencadenante del adenocarcinoma gástrico; no obstante, la epidemiología asociada a esta especie, así como sus reservorios naturales, vías de transmisión y mecanismos de patogenicidad, aún no están totalmente comprendidos, si bien se ha logrado determinar su mayor frecuencia en los estratos económicos más bajos y se le ha detectado en saliva, placa dentobacteriana y evacuaciones de niños y adultos afectados.

Sin lugar a dudas, el estudio de esta bacteria está redituando mejores expectativas para las numerosas personas afectadas por gastritis y/o úlceras gástricas o duodenales, ya que el diagnóstico de laboratorio se fundamenta en metodologías cada

vez más confiables (que incluyen la detección del microorganismo en las biopsias y el hallazgo-cuantificación de anticuerpos séricos), e inclusive, los tratamientos correspondientes son cada vez más eficaces. El presente trabajo resume los aspectos más sobresalientes asociados a *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS

- Describir las principales características microbiológicas de *H. pylori*, destacando su morfología microscópica, así como los requerimientos para su aislamiento y cultivo, y las bases para efectuar su diferenciación macroscópica e identificación bioquímica.
- Enumerar los factores de patogenicidad detectados hasta la fecha en *H. pylori*, mencionando su probable papel en la patogenia de las gastritis y de las úlceras gástricas y duodenales.
- Describir los principales aspectos relacionados con el diagnóstico de laboratorio de las afecciones debidas a *H. pylori*.
- Mencionar las medidas terapéuticas que se han establecido para intentar controlar y/o erradicar a *H. pylori* de los tejidos gastrointestinales humanos.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *H. pylori*

i. Clasificación

Este microorganismo se aisló por vez primera en 1982, incluyéndosele de inmediato en el género *Campylobacter*, como *Campylobacter pyloridis*, si bien después se le asignó el nombre de *Campylobacter pylori*, antes de ser reubicado finalmente dentro del género *Helicobacter* (43, 50, 73).

En 1989 sólo se conocía a dos especies de *Helicobacter*: *H. pylori* y *H. mustelae*, aunque desde entonces se han venido agregando algunas otras, destacando en la actualidad nueve de ellas (consultar la tabla 1) (30).

Tabla 1. Clasificación de las especies de *Helicobacter*, en función del tejido que colonizan

DIVISIONES	ESPECIES
<i>Helicobacter</i> gástricos	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Helicobacter mustelae</i> <i>Helicobacter felis</i> <i>Helicobacter nemestrinae</i> <i>Helicobacter acinonyx</i> <i>Helicobacter rappini</i>
<i>Helicobacter</i> no gástricos	<i>Helicobacter fennelliae</i> <i>Helicobacter cinaedi</i> <i>Helicobacter muridarum</i>

ii. Características microscópicas

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, muy móvil (a través de ramilletes polares de flagelos), no capsulada ni esporulada; además, mide aproximadamente 0.5 a 1 μ de ancho por 1.5 a 4 μ de largo y presenta forma espiral; de hecho, en cortes histológicos se observa como U o S mientras que, en los cultivos viejos, puede observarse como bacilo recto o como elementos cocoides (2, 30, 53).

iii. Propiedades culturales

A *Helicobacter pylori* se le considera una bacteria exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, ya que desarrolla con dificultad *in vitro*; por tal motivo, su cultivo en el laboratorio requiere de medios enriquecidos, tales como el infusión de cerebro y corazón (agar y caldo), tripticaseína soya (agar y caldo), agar Columbia complementado, caldo Brucella con suero fetal bovino, etc. (41, 59, 86).

A este respecto, el medio de cultivo más adecuado para intentar su primoaislamiento es el agar infusión de cerebro y corazón, adicionado de 7 % de sangre de caballo, 1 % de IsoVitaleX, 6 mg/L de vancomicina, 20 mg/L de ácido nalidíxico y 2 mg/L de anfotericina. Sin embargo, también se obtiene un crecimiento óptimo en caldo Brucella suplementado con 1 a 10 % de suero fetal bovino (2, 32, 53).

En cuanto a las condiciones de incubación de esta bacteria, es conveniente tomar en cuenta que su primocultivo resulta adecuado a 37°C, aunque se ha demostrado que desarrolla aceptablemente desde los 32 hasta los 42°C; por otra parte, es microaerófila, lo cual implica que se le debe incubar en una atmósfera consistente de 5 % de O₂, 10 % de CO₂ y 85 % de N₂ y a una humedad relativa de 99 a 100 %, si bien estas condiciones pueden sustituirse por ambientes de 10 % de CO₂, sobre todo en el caso de laboratorios que no cuentan con la mezcla de gases antes mencionada. Finalmente, el tiempo requerido para el apropiado desarrollo de *H. pylori* varía entre los 3 y 7 días, obteniéndose colonias circulares, convexas, lisas, no pigmentadas y translúcidas, de 0.5 a 1 mm de diámetro; cabe señalar que en los medios que contienen sangre, dichas colonias pueden llegar a producir una débil zona de hemólisis (30, 32, 41, 59, 86).

iv. Pruebas de identificación

En el laboratorio clínico, la diferenciación de esta especie suele basarse en la realización de pruebas bioquímicas que, en su mayoría, también se emplean para identificar otras bacterias de interés en salud pública; en este sentido, destacan las siguientes: oxidasa, catalasa, ureasa, fosfatasa alcalina, hidrólisis del hipurato, reducción de nitratos, producción de ácido sulfhídrico, crecimiento en presencia de glicina al 1%, bilis al 1% y cloruro de sodio al 3.5 %, susceptibilidad a cefalotina y

al ácido nalidixico, etc. La tabla 2 resume las más relevantes y, a continuación, se describen los aspectos más relevantes asociados a ellas (9, 32, 53, 61).

Tabla 2. Principales pruebas de identificación para *Helicobacter pylori* (9, 53)

PRUEBA	RESULTADO
Oxidasa	+
Catalasa	+
Ureasa	+
Fosfatasa alcalina	+
Hidrólisis del hipurato	-
Reducción de nitratos	-
Producción de H ₂ S	-
Crecimiento microaerófilo:	
a 25°C	-
a 37°C	+
a 42°C	-
Crecimiento aerófilico a 37°C	-
Crecimiento en presencia de:	
NaCl al 3.5 %	-
Glicina al 1 %	-
Bilis al 1 %	-
Susceptibilidad al ácido nalidixico ¹	-
Susceptibilidad a la cefalotina ¹	+

CLAVE: ¹ = 30 µg/mL

Prueba de la citocromo oxidasa

Esta prueba, también conocida como prueba de las oxidasas, consiste en detectar si el microorganismo analizado posee una citocromo oxidasa capaz de oxidar

compuestos aminados tales como el clorhidrato de N,N-dimetil p-fenilendiamina y la forma tetrametilada del mismo compuesto (5, 44, 51).

Dichos sustratos deben ser de preparación reciente y se emplean en solución acuosa al 1 %. Dado que la citocromo oxidasa es una ectoenzima, es necesario que el sustrato seleccionado se ponga en contacto con la colonia, ya sea depositando una gota de la solución sobre esta última, o bien, impregnando un trozo de papel filtro con el compuesto aminado antes de frotarle una asada del microorganismo (38, 44).

En cualquier caso, la prueba se considera como positiva cuando, 1 a 4 minutos más tarde, se observa un color marrón que después se torna negro -ya sea en la propia colonia humedecida con la solución o en la asada depositada sobre el papel filtro- (38, 51).

Las siguientes son algunas otras consideraciones relevantes acerca de esta prueba:

*Las colonias que manifiestan la coloración negra no deben seleccionarse para continuar el estudio, debido a que el indofenol -mismo que representa el producto de la oxidación total del sustrato y cuya coloración es precisamente la que se detecta sobre la colonia- puede haber oxidado los sistemas enzimáticos del microorganismo, provocándole la muerte (35, 38).

*La adición de α -naftol al sustrato incrementa la sensibilidad y rapidez de la prueba, ya que la oxidación de este último se realiza en un paso único. No obstante, en este caso, la colonia o la asada manifestarán una coloración azul muy oscuro (indofenol azul) en vez de la negra a que se hizo referencia anteriormente (38, 51).

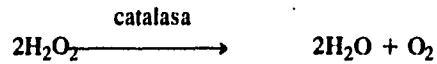
*Las colonias oxidasa negativa no cambiarán su color original (38).

*La prueba de las oxidasas no es específica para estos microorganismos; de hecho, también resulta positiva para *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter sp*, *Vibrio sp* y algunas otras especies (5, 35).

Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína bastante similar a la hemoglobina, con la diferencia de que los cuatro átomos de hierro contenidos en su molécula, se encuentran en su estado más oxidado (Fe^{+++}), mientras que en la hemoglobina lo están en estado reducido (Fe^{++}). Exceptuando a los estreptococos y a *Gardnerella vaginalis*, las bacterias aerobias y facultativas poseen esta enzima, no así la mayoría de las anaerobias que, con el objeto de llevar a cabo la degradación del mismo sustrato, producen la peroxidasa (38, 44).

La reacción catalizada por la catalasa es:



Para llevar a cabo esta prueba es necesario disponer, por un lado, de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % -almacenada en frasco ámbar y en refrigeración- y, por otro, de un cultivo puro de 18-24 h del microorganismo a probar, contenido en una caja de Petri o bien en tubos de ensayo exentos de sangre, toda vez que los eritrocitos poseen esta actividad enzimática (5, 38, 51).

El procedimiento más sencillo y rápido incluye el uso de un portaobjetos, en el cual se colocan, primeramente, una asada del microorganismo -ya sea que éste se encuentre en medios sólidos o en un cultivo líquido- y, posteriormente, se vierten sobre ésta una o dos gotas de la solución de H_2O_2 al 30 %. La reacción es tan rápida que bastan unos segundos para que en la solución que está en contacto con las células, se empiecen a notar burbujas ocasionadas por el O_2 que se desprende (38, 51).

Prueba de la ureasa

La urea es una diamina que se hidroliza rápidamente en presencia de una enzima constitutiva: la ureasa. En solución, la urea se hidroliza reedituando dióxido de carbono, amoníaco y agua, los cuales finalmente se convierten en carbonato de amonio. La reacción se detecta con un indicador que vira a un color característico al aumentar el pH del medio por efecto de este último compuesto y se puede realizar en medios líquidos o sólidos (5, 35, 56).

El medio líquido más utilizado para efectuar esta prueba es el caldo urea de Stuart, el cual contiene 9.1 g de fosfato monopotásico, 0.1 g de extracto de levadura, 9.5 g de fosfato disódico, 20.0 g de urea, 0.001 g de rojo de fenol y 1,000 mL de agua destilada; su pH debe ajustarse a 6.8 (35, 38, 51).

Los reactivos se mezclan y disuelven sin calentar y posteriormente se esterilizan por filtración con membrana Millipore. Después, el medio se reparte en tubos de 12 x 75, a razón de 2.5 mL en cada uno, bajo estrictas condiciones de esterilidad (38, 51).

El medio sólido más utilizado es el agar urea de Christensen, el cual contiene 1 g de peptona, 1 g de glucosa, 5 g de cloruro de sodio, 2 g de fosfato monopotásico, 20 g de urea, 0.012 g de rojo de fenol, 15 g de agar y 1,000 mL de agua destilada; su pH final debe ser, como en el medio de Stuart, de 6.8 (35, 38, 51).

Con excepción de la urea, todos los reactivos se mezclan y disuelven en 900 ml de agua, antes de procederse a su esterilización a 121°C. Por otro lado, se prepara una solución de urea en 100mL de agua, se filtra y, una vez que la otra porción se ha enfriado hasta aproximadamente 50°C, ambas se mezclan en condiciones asépticas, se distribuyen en tubos de 16 x 150 -6 mL en cada uno- y se dejan enfriar en posición inclinada (35, 51).

Para realizar la técnica, se añade una colonia sospechosa al caldo o se estria sobre el agar. Se incuba a 35°C durante 18 a 24 h y se observan los resultados: tanto en el caldo de Stuart como en el agar de Christensen, el indicador del medio virará a rojo si el medio se alcaliniza, vía la producción de carbonato de amonio a partir de la urea; en el caso del agar de Christensen, el vire de todo el medio a rojo, indicará que el microorganismo es un degradador rápido de urea. Cuando el color rojo sólo se presenta en el pico de flauta y poco a poco se difunde en todo el tubo, se trata de un microorganismo que degrada lentamente la urea (35, 38, 51).

Prueba de la fosfatasa alcalina

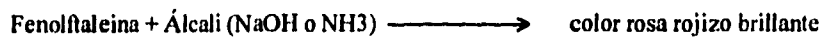
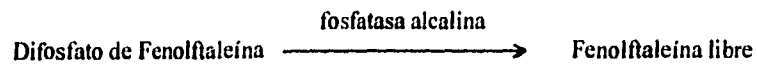
Las fosfatasas constituyen un grupo muy distribuido de enzimas, cuyo grado de especificidad varía dependiendo de su procedencia; desarrollan actividad hidrolítica tanto sobre sustratos alifáticos (entre los que se cuentan a la mayoría de monoésteres

del ácido ortofosfórico, glicerol 1-fosfato y glicerol 2-fosfato), como aromáticos (tales como el 4 nitrofenil fosfato), aunque es sólo un reducido tipo de ellas el que puede hacerlo sobre diésteres, triésteres fosfóricos y polifosfóricos, compuestos entre los que se incluyen al ATP, ADP, AMP, etc. Esta actividad específica se ve estimulada por la presencia de iones Mg^{++} , que sin embargo pueden inhibirla cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas, al formarse grupos que sustituyen a los que se les ha demostrado participación en la reacción (5, 44).

Otro factor que afecta de una manera muy similar la actividad de la fosfatasa alcalina, es la concentración de fosfato inorgánico en el medio de cultivo, ya que su presencia estimula tanto la producción celular como una gran actividad de la enzima, notándose que el exceso del mismo reprime la producción de ésta. Por otro lado, se ha demostrado que la enzima y que la presencia de ésta se relaciona con la del ácido teicoico superficial en la célula bacteriana (44).

Por lo que se refiere a la bioquímica involucrada en la prueba, la producción de fosfatasa se determina con base en la liberación de la fenolftaleína, debido a la acción enzimática presente ejercida sobre el reactivo utilizado como sustrato (difosfato de fenolftaleína). Al haber actividad hidrolítica de la enzima sobre los enlaces fosfato, la fenolftaleína quedará libre, pudiendo con ello ser detectada si se pone en contacto con

algún álcali, ya que presentará la coloración característica de este indicador ácido-base cuando se encuentra en medio básico (5, 44, 51).



Hidrólisis del hipurato

La enzima hipuricasa actúa sobre el hipurato sódico produciendo benzoato y glicina, los cuales pueden identificarse con cloruro férrico y ninhidrina, respectivamente. En el caso del benzoato, su presencia se demuestra mediante la formación de un precipitado de color café con leche, que permanece estable durante más de 10 minutos. Por su parte, la existencia de glicina se pone de manifiesto al aparecer una coloración púrpura o morada en el medio de reacción (38, 51, 61).

La realización de la prueba contempla los siguientes pasos:

El sustrato (hipurato sódico) se adiciona a un caldo BHI, antes de la esterilización correspondiente y de manera que quede a una concentración final del 1 %. Dicho medio se siembra a partir de un cultivo líquido y puro de 24 h, y se procede a llevar

a cabo su incubación a 35°C, durante 24 h. Posteriormente, se centrifuga a 3,000 rpm y el sobrenadante se reparte en 2 tubos de 13 x 100, a razón de 0.8 ml en el marcado como # 1 y 0.2 ml en el # 2 (38, 51, 61).

En el tubo # 1 se busca evidenciar la producción de benzoato, para lo cual se le agregan 0.2 ml de una solución de cloruro férrico hexahidratado al 12 % en ácido clorhídrico al 2 % y se procede a observar si aparece y permanece el precipitado antes descrito (38, 51).

En cuanto al tubo # 2, se le adicionan 0.2 ml de una solución de ninhidrina al 3.5 % en una mezcla 1 + 1 de acetona-butanol; en caso positivo, se visualizará la coloración morada típica, reveladora de la presencia de la glicina (38, 51).

Producción de ácido sulfhídrico

El fundamento de la prueba se asocia a la capacidad de ciertas bacterias para liberar azufre a partir de aminoácidos azufrados tales como la cisteína, metionina y cistina - por medio de la enzima cisteinasa-, o bien, de otra fuente adicional de azufre, el tiosulfato de sodio, por mediación de la enzima tiosulfato reductasa, generándose sulfito más ácido sulfhídrico. Este gas incoloro es detectado mediante sales de hierro, ya que la reacción correspondiente produce un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. Por lo general, un microorganismo que produce ácido sulfhídrico también sintetiza los gases dióxido de carbono e hidrógeno (35, 38).

Los medios Kligler o Triple Azúcar Hierro (TSI) se inoculan con una asada del microorganismo a probar, tanto por estría ondulada sobre el "pico de flauta" como por picadura, hasta no más de 3 a 5 mm del fondo del tubo. En el caso de los medios SIM y MIO, la siembra sólo se efectúa por picadura; de cualquier manera, se procede a incubar durante 18 a 24 h, para llevar a cabo la lectura (35, 51).

Resistencia a cefalotina y ácido nalidíxico

Para realizar este tipo de pruebas de susceptibilidad, suele utilizarse, dada su sencillez, el método de difusión en agar, denominado también prueba de susceptibilidad de Bauer-Kirby el cual, por cierto, es el recomendado por la Food and Drug Administration (FDA); el medio seleccionado es el agar de Mueller- Hinton suplementado con suero de caballo, hasta una concentración final del 5%; es importante que se cumplan ciertos requisitos asociados a la estandarización del método; por ejemplo: el medio debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm en las placas, para que la difusión en el agar sea siempre la misma y no varíen las dimensiones de los halos de inhibición; el inóculo corresponde a una suspensión de microorganismos equivalente al estándar No. 5 de MacFarland, cuya preparación consiste en añadir 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N a 0.5 ml de Bario. Se compara la turbidez de este estándar con la del cultivo del microorganismo, observándolos contra una cartulina blanca con líneas horizontales. Si la suspensión es menos turbia se incuba más tiempo y, en caso contrario se añade solución salina a esta última hasta que se

más tiempo y, en caso contrario se añade solución salina a esta última hasta que se igualen (5, 35, 76).

Una vez logrado lo anterior, se sumerge un hisopo estéril en la suspensión, rotando el mismo contra la pared del tubo para eliminar el exceso de líquido. Se siembra en forma masiva en agar Muller-Hinton y dicha placa se deja entreabierta para que se evapore el exceso de humedad; se procede a colocar con una pinza estéril el disco que contiene 30 microgramos de cefalotina o ácido nalidíxico según sea el caso, se procede a incubar a 37 °C durante 18 h y, al cabo de este tiempo, se hacen las medidas correspondientes (35, 38, 76).

Para el caso de susceptibilidad a cefalotina, cuando se emplean discos impregnados con 30 µg, un halo de inhibición menor o igual a 14 mm se lee como resistencia, el de 15 a 17 mm como intermedio, y los halos mayores a 17 mm se asocia a sensibilidad. Cuando el disco es de ácido nalidíxico a concentración de 30 µg un halo menor o igual a 13 mm se interpreta como resistencia, los halos entre 14 y 18 mm como intermedios y los que son mayores a 18 mm como sensibilidad (5, 38, 76).

II. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *H. pylori*

i. Generalidades

La especie *Helicobacter pylori* está considerada como uno de los principales factores que promueven la ulceración gástrica y duodenal, aunque también se le reconoce como causa de gastritis crónica no autoinmune y se le relaciona con el desarrollo de cáncer gástrico (3, 12, 42).

En cuanto a las úlceras, es oportuno señalar que la generalidad de ellas aparece cuando el ácido clorhídrico y la pepsina estomacales superan las defensas de la mucosa y actúan directamente sobre ella. Como es sabido, en condiciones de salud, la principal protección del estómago radica en una importante barrera de moco, la cual permite que relativamente pocos iones hidronio, producidos a partir del ácido clorhídrico, alcancen la superficie de las células epiteliales. Sin embargo, también los iones bicarbonato atrapados en la mucosa desempeñan una función trascendental en la protección de dichas células, ya que neutralizan precisamente a los iones hidronio que logran difundir lenta, pero constantemente, a través del moco (1, 12, 42).

Evidentemente, la notable irrigación sanguínea con que cuentan los tejidos estomacales, es la que aporta la mayor proporción de iones bicarbonato a la mucosa gástrica; no obstante, se ha demostrado que las prostaglandinas (PG's) también resultan determinantes en la defensa de esta última, ya que no sólo potencian la secreción de moco y la acumulación de bicarbonato en los tejidos estomacales sino que, además, incrementan la irrigación sanguínea hacia la mucosa gástrica y, al parecer, su presencia retarda la degradación del moco (1, 9, 17, 70).

De hecho, se ha observado que cuando se bloquea la acción de las PG's, los fármacos tales como el ácido acetilsalicílico y los antiinflamatorios no esteroides pueden lesionar más eficazmente la mucosa estomacal. Finalmente, otro factor que afecta la función defensiva del moco y de los iones bicarbonato es la ingestión de alcohol; éste ocasiona secuencialmente la degradación del moco y la disminución del bicarbonato estomacal, antes de lesionar directamente la mucosa gástrica; ello ocurre debido a que los iones hidrógeno atraviesan la "barrera" de moco y actúan sobre los compuestos orgánicos que conforman la superficie de las células estomacales (42, 43, 50).

Lógicamente, en el duodeno cambian sensiblemente algunas condiciones, las cuales derivan en una mayor susceptibilidad a los procesos ulcerativos: como se carece de una barrera de moco tan importante como la que recubre al estómago, su principal factor protector es el líquido pancreático, que es descargado en la primera porción

del intestino, a fin de que su extenso contenido en iones bicarbonato neutralice al material ácido proveniente del estómago (1, 12, 19, 70).

Por lo que se refiere a la gastritis, esta entidad clínica se considera menos lesiva que las úlceras, si bien se asocia a una serie de cambios histológicos en la mucosa, incluyendo la infiltración de células inflamatorias (linfocitos y leucocitos polimorfonucleares) hacia el epitelio estomacal (1, 26, 50).

En general, se acepta que existen dos clases principales de gastritis crónica: la "A" corresponde a un trastorno autoinmune, en el que aparecen anticuerpos contra las células parietales, lo cual conduce a hipoclorhidria (a causa de la disfunción de las células parietales), aunque también ocurren alteraciones en la secreción de factor intrínseco, que se traducen en algunos casos de anemia perniciosa. Este tipo de gastritis crónica es usualmente asintomática y sólo afecta a las células parietales, por lo cual el antro gástrico permanece intacto; con frecuencia cursa sin implicar a las células secretoras de moco y no deriva en síntomas dispépticos ni en úlceras gástricas (11, 19, 43, 50).

Contrastando con la antes descrita, la gastritis clase "B" (o gastritis antral) afecta al epitelio secretor de moco y al cuerpo secretor de ácido, de tal manera que provoca la disminución de las defensas elementales de la mucosa involucrada (1, 19, 43).

Por último, se acepta que las gastritis superficiales crónicas pueden progresar o conducir hacia atrofia gástrica crónica con riesgo de generar adenocarcinomas; por ello, se considera que *H. pylori* podría fungir como factor desencadenante del cáncer gástrico (19, 50, 65).

En este sentido, Lauren divide al cáncer gástrico en intestinal y difuso; el de tipo intestinal se presenta en antro gástrico y se caracteriza por la presencia de elementos glandulares y cohesión de células, en tanto que, el difuso, generalmente involucra fondo y cardias, sin observarse cohesión de células y se presenta en personas relativamente jóvenes, principalmente en las del grupo sanguíneo A (7, 65, 84).

Aunque el proceso de desarrollo del cáncer tipo difuso aún no se ha estudiado con amplitud, se ha descrito el orden de los eventos que anteceden al cáncer tipo intestinal: primero, el desarrollo de gastritis superficial (infiltración de la mucosa por linfocitos o células plasmáticas con la aparición de cambios epiteliales moderados), misma que progresa a gastritis atrófica crónica (atrofia de estructuras glandulares con inflamación aguda y crónica); después, inicia una metaplasia intestinal (aparición de parches del epitelio intestinal dentro del estómago), la cual evoluciona a displasia (aumenta la relación núcleo-citoplasma así como la actividad mitótica, se pierde la polaridad y se observa pleomorfismo nuclear) y, por último, tiene lugar el cáncer gástrico tipo intestinal. Dichas transiciones ocurren más frecuentemente a edades tempranas, sobre todo en poblaciones de alto riesgo (3, 7, 17, 65).

Correa y cols han propuesto que agentes del medio ambiente (probablemente sales), causan irritación gástrica e inducen gastritis superficial y posteriormente la atrófica. Se

presenta hipoclorhidria y crecimiento desmedido de la bacteria; este crecimiento promueve la conversión de nitritos a N-nitrosaminas, causando metaplasia, displasia y, finalmente, cáncer. El ácido ascórbico y los beta-carotenos, dados sus efectos antioxidantes y antinitrosantes, pueden proteger contra el progreso de la enfermedad (3, 17, 84).

Es importante hacer notar que se han propuesto varios mecanismos, por medio de los cuales la bacteria podría causar la carcinogénesis gástrica, destacando los siguientes: 1) Los productos del metabolismo de la bacteria transforman directamente a la mucosa. 2) Análogamente a la carcinogénesis causada por patógenos virales, el ADN de *H. pylori* es incorporado al genoma del hospedero, provocando transformaciones. 3) *H. pylori* induce una respuesta inflamatoria que por sí sola es genotóxica (7, 65, 84).

Entre las teorías anteriores, la tercera parece ser la más coincidental con los datos existentes; el proceso de inflamación crónica podría inducir cáncer, en virtud de que provoca una mayor proliferación celular así como el incremento en la formación de radicales libres. Los neutrófilos producen O_2 , H_2O_2 , HOCl y cloramina, lo cual induciría a la ruptura en las hebras de ADN, daño a bases, e intercambio de cromátides hermanas. La producción excesiva de reactivos mutagénicos asociados al oxígeno se ha demostrado por quimioluminiscencia en tejidos humanos infectados por el microorganismo (3, 7, 17).

Adicionalmente, se ha observado en experimentos *in vitro* e *in vivo*, que *H. pylori* provoca un incremento en la proliferación celular, lo que aumenta el riesgo de replications espontáneas erróneas (7, 17).

ii. Factores de virulencia detectados en *H. pylori*

De acuerdo con lo establecido en los años recientes, entre los principales factores de patogenicidad de *H. pylori*, que podrían desempeñar funciones relevantes en el origen de la gastritis y de las úlceras gástricas y duodenales, destacan los siguientes:

Motilidad

Según se ha podido demostrar, esta característica resulta esencial para que ocurra la colonización de la superficie intestinal por diversos patógenos gastrointestinales, incluyendo a *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp* y *Campylobacter fetus subsp jejuni*. De hecho, la forma espiral de este último aparenta conferirle ventajas en ambientes viscosos tales como el de la mucosa gástrica (6, 18, 43).

La medición de la motilidad en soluciones de metil celulosa, ha sugerido que *H. pylori* cruza eficazmente los medios viscosos, lo cual sugiere que este microorganismo puede desplazarse desde el medio ácido predominante en el lumen gástrico, penetrando la capa protectora de moco, hasta llegar a un medio ambiente neutro (7, 21, 50).

A este respecto, cabe mencionar que el análisis de numerosas biopsias humanas ha revelado que la morfología espiral de *H. pylori*, resulta más pronunciada en las

bacterias libres, en relación con las que se encuentran adheridas a las células de la mucosa (7, 18).

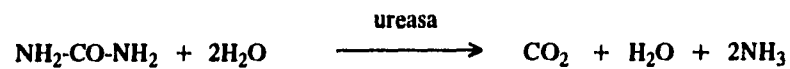
Adhesinas

Estudios realizados por microscopía electrónica han mostrado ampliamente que *H. pylori* puede adherirse a las membranas del epitelio celular y que, al parecer, ello sucede a través de pequeñas proyecciones celulares, a las cuales se ha denominado "pedestales de adherencia". La observación de estas estructuras propone que se trata de adhesinas clásicas, aunque aún persisten varias dudas sobre el particular. En todo caso, se han detectado algunas moléculas que podrían participar en la adhesión de esta especie bacteriana: una de las identificadas con anterioridad es una hemaglutinina fibrilar unida a N-acetil-neuraminil-lactosa, de la cual Lingwood y cols han reportado que un glicerolípido, fosfatidiletanolamina, podría fungir como su receptor en la mucosa gástrica humana (6, 8, 43).

La segunda corresponde a un *pilus* del que se sugiere que se trata de una proteína muy semejante a la pilina que sintetizan algunas otras bacterias. Sin embargo, aún no se ha logrado determinar si ambas, la hemaglutinina y los *pili*, desempeñan *in vivo* el papel de "ligando" (7, 39, 75).

Ureasa

Sin lugar a dudas, uno de los principales factores de patogenicidad de *H. pylori* consiste en su notable capacidad para producir ureasa; como es sabido, ésta cataliza la degradación de la urea, tanto salival como de la mucosa, transformándola en amoníaco y dióxido de carbono.



La ureasa de *H. pylori* es una proteína de 600 Kd, integrada por dos subunidades, tiene un punto isoeléctrico de 5.93 y es activa en un rango de pH de 9 a 10 (15, 18, 43).

En el tejido estomacal, la nube de amoníaco resultante, protege al microorganismo de la gran cantidad de ácido intragástrico y disminuye la eficacia de la cubierta de moco que actúa como barrera protectora (18, 55).

Por otra parte, el amoníaco ejerce directamente algunos efectos tóxicos tales como la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos y el incremento en la masa celular de la mucosa intestinal, además de aumentar el riesgo de infección viral. Todo ello,

independientemente de que el amoníaco parece estar implicado en la carcinogénesis de los tejidos que realizan un notable consumo de proteínas (15, 20, 43).

De cualquier manera, la bacteria y/o el amoníaco que ésta produce, provocan inflamación de los tejidos estomacales, con infiltración de leucocitos polimorfonucleares, los cuales contribuyen a la lesión tisular vía la liberación de radicales superóxido, enzimas hidrolíticas y otros agentes mediadores del proceso inflamatorio (20, 28, 55).

Aún cuando el microorganismo es muy susceptible al pH ácido, varios experimentos han demostrado que puede sobrevivir hasta 120 minutos a $\text{pH} = 2$, siempre que se encuentre presente una cantidad fisiológica de urea (18).

Catalasa

Tal como ocurre en numerosas bacterias aerobias y facultativas, *H. pylori* presenta una gran actividad de catalasa, enzima que protege al microorganismo contra los efectos oxidantes del ion superóxido y del peróxido de hidrógeno endógeno, localizados en los lisosomas de los fagocitos (18, 43).

La enzima es un tetrámero de 200 Kd, su punto isoeléctrico es de 9.0 a 9.3 y es activa en un amplio rango de pH (18).

Deshidrogenasa alcohólica

Helicobacter pylori produce notables cantidades de deshidrogenasa alcohólica (DHA), lo cual se traduce en la síntesis de concentraciones importantes de acetaldehído que, inclusive, suelen resultar mayores que en otras bacterias; evidentemente, cuando este fenómeno se presenta *in vivo* representa una agresión sumamente lesiva para la mucosa (17, 72).

El acetaldehído es el primer metabolito que se produce durante la oxidación del etanol y su presencia es tóxica, ya que rápidamente forma aductos con diferentes proteínas celulares e induce la peroxidación de los lípidos; al parecer, ambas acciones representan serios factores de riesgo en la generación de daños y cáncer gástricos (18, 70, 72).

Cabe señalar que el acetaldehído también se puede producir como intermediario durante la fermentación alcohólica de diversos azúcares (72).

Citotoxina

Un factor potencial de virulencia en *H. pylori* es la citotoxina vacuolizadora, la cual se detecta en aproximadamente el 50 % de las cepas de esta especie. Por lo que

respecta a su acción *in vitro*, dicha toxina provoca vacuolización de muchos tipos de células eucarióticas (13, 15, 25).

Si bien se ha demostrado que la ureasa y la citotoxina vacuolizadora de *Helicobacter pylori* son moléculas diferentes, también es cierto que la primera potencia la acción de la segunda, vía la producción de amoníaco; al parecer, algo muy parecido ocurre con la nicotina, lo cual podría explicar la mayor agresividad del cuadro clínico en los fumadores (14, 18, 81).

La reciente purificación de la citotoxina ha permitido establecer que corresponde a una banda de 87 Kd, visualizada en un gel de SPS-PAGE (15, 25).

Diversos estudios han demostrado que las cepas de *H. pylori* productoras de citotoxina, se asocian más frecuentemente a pacientes con úlcera duodenal que a los que sólo padecen de gastritis. Por otra parte, la presencia de anticuerpos séricos anti-citotoxina (detectados en personas afectadas por *Helicobacter pylori*), comprueba que esta toxina también es producida *in vivo* (13, 18, 25, 81).

Mucínasa

La infección crónica ocasionada por *H. pylori* se relaciona muy frecuentemente con la eliminación de la capa de moco que recubre a las células gástricas. Esto último

puede deberse a dos razones: a la inhibición de la secreción del moco y/o a la degradación de éste, después de haber sido secretado (43).

A este respecto, se ha observado que el microorganismo en cuestión libera *in vitro* una enzima capaz de degradar moco gástrico porcino, haciéndole perder su propiedad de viscoelasticidad. Ello sugiere la posibilidad de que el fenómeno también ocurra *in vivo* facilitándole a la bacteria el contacto con el epitelio estomacal y, por ende, su adhesión al mismo (18, 43).

iii. Patogenia

Aún cuando no están bien establecidos los mecanismos y patrones implicados en la transmisión del microorganismo, existen algunas evidencias de que el contagio tiene lugar de persona a persona (oral-oral o fecal-oral), por ingestión de agua, bebidas o alimentos contaminados con materia fecal, e inclusive, por la convivencia con gatos (27, 32, 34, 37, 64, 80).

Independientemente de la vía de transmisión, *Helicobacter pylori* suele alojarse en la luz del estómago, adhiriéndose posteriormente a las células mucoproducidas superficiales, o bien, a las foveolas gástricas, sin invadir el tejido. Cabe señalar que las células estomacales que permanecen en contacto con el microorganismo, tienden

a aplanarse y a perder progresivamente su recubrimiento de moco; con frecuencia, la distribución del microorganismo es focal o en "parches" (9, 17, 24).

De acuerdo con lo anterior, puede establecerse que *H. pylori* se localiza preferentemente en la superficie de las células foveolares, provocándoles cambios degenerativos y alteraciones que afectan las uniones intercelulares. Sin embargo, es preciso mencionar que el microorganismo también interacciona con las células parietales, pudiendo originar hipoclorhidria (9, 17, 19, 71, 77).

Evidentemente, los pacientes infectados con *Helicobacter pylori*, quienes comúnmente manifiestan síntomas dispépticos, úlcera péptica o gastritis, presentan títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra dicha especie bacteriana. En este sentido, es importante considerar que los niveles séricos de IgG e IgA -pero no de IgM- correlacionan con el éxito en los aislamientos y que, por otra parte, también se ha demostrado la presencia de IgA anti-*H. pylori* en el jugo gástrico y en la saliva de los enfermos (54, 66, 68, 69).

III. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Actualmente, la detección de *Helicobacter pylori* se basa en la utilización de diferentes métodos diagnósticos, los cuales se dividen en “invasivos” y “no invasivos”.

i. Métodos invasivos

En este rubro, destaca la detección del microorganismo en biopsias, raspados o aspirados gástricos, obtenidos a través de endoscopia; en este sentido, deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones: a) los resultados más satisfactorios se asocian principalmente a las biopsias provenientes de la porción antral, las cuales pueden trasladarse en el medio de transporte de Stuart, o mantenerse en solución glucosada al 20 % a 4°C, condiciones bajo las cuales el microorganismo permanece viable durante 5 h; b) como la infección por *Helicobacter pylori* suele mostrar una distribución “en parches”, es recomendable tomar por lo menos dos biopsias del antro gástrico, a fin de aumentar la sensibilidad del método (9, 56, 62, 78, 86).

Una vez obtenidos los especímenes, éstos se someten generalmente a estudios histológicos, a la prueba de ureasa rápida y, desde luego, se cultivan en medios tales

como el agar infusión de cerebro y corazón, el caldo Brucella o el agar Columbia (suplementados con 7 % de sangre de caballo, 1 % de IsoVitaleX, 6 mg/mL de vancomicina, 20 mg/mL de ácido nalidíxico y 2 mg/mL de anfotericina) (2, 32, 53).

Por lo que se refiere a las observaciones microscópicas, las biopsias se tiñen previamente por la técnica clásica y convencional de hematoxilina-eosina o, de ser posible, con plata, Giemsa o naranja de acridina, ya que con estas últimas se evidencia más fácilmente la presencia del microorganismo (16, 32, 56).

Cabe señalar que la tinción de plata de Warthin-Starry es considerada por algunos autores como la más confiable, ya que magnifica la imagen de *H. pylori*; sin embargo, su elevado costo gravita en su contra, por lo cual la tinción de Giemsa representa una alternativa más viable, ya que es menos costosa y su sensibilidad y especificidad no resultan mucho menores que las de la antes señalada (cuyas cifras fluctúan entre 93 y 99 %) (17, 56, 69).

Por otra parte, la prueba rápida de la urea consiste en colocar pequeños trozos del tejido afectado dentro de un tubo de ensayo que contiene una pastilla de agar urea de Christensen modificado; una reacción positiva será detectada por el cambio de coloración del indicador (al incrementarse el pH del medio) (23, 56).

Por lo que se refiere al cultivo, cabe señalar que, aunque se considera como el método ideal (frente al cual se compara la efectividad de las pruebas nuevas), éste sólo resulta exitoso cuando el laboratorio cuenta con técnicos especializados, dado que el microorganismo crece con dificultad *in vitro*; de hecho, sólo se recomienda intentar el cultivo cuando se sospecha que la cepa implicada es resistente a los fármacos más empleados en el tratamiento (2, 53).

Finalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una herramienta muy valiosa, tanto por su rapidez como por su confiabilidad, si bien requiere de equipo especializado. Su utilidad es particularmente útil, sobre todo cuando se trata de detectar la presencia de microorganismos cuyo desarrollo requiere de incubaciones prolongadas, tal como ocurre con *H. pylori*. En este caso particular, los reportes destacan que los principales genes a amplificar son los que codifican para síntesis de ureasas (*ureA* y *ureB*), como para el ARN 16S y que, adicionalmente, la PCR no sólo pone en evidencia la presencia del microorganismo a partir de biopsias gástricas, sino que también lo puede hacer en muestras de saliva, placa dentobacteriana y materia fecal (9, 10). Por considerarse que esta técnica es una de las de mayor futuro, no sólo en el diagnóstico de laboratorio de las afecciones relacionadas con *H. pylori*, sino con las debidas a numerosos agentes infecciosos, a continuación se describen con cierto detalle las características de dicha metodología (23, 28).

Reacción en cadena de la polimerasa

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction") ha venido a revolucionar la biología molecular, ya que permite la amplificación selectiva de una sola molécula de ADN o ARN en millones de veces en unas cuantas hora (22).

Esta metodología permite analizar *in vitro* secuencias específicas de un gen a partir de una gran variedad de fuentes biológicas como sangre seca, tejidos frescos, raíces de cabello, muestras de tejido incluidos en soportes sólidos e incluso muestras tan antiguas como momias y más aún, de animales hoy extintos (28, 36).

Este procedimiento está basado en la realización de ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarias al ADN de interés, y la extensión de las cadenas de ADN a partir del extremo 3'-OH de cada oligonucleótido mediante la actividad de una ADN polimerasa. De esta manera, la amplificación de una secuencia determinada está definida por la función exponencial 2^n , donde "n" es el número de ciclos (22, 36).

Si la secuencia a amplificar se localiza en el ADN genómico, las dos cadenas se encuentran apareadas formando una doble hélice. La manera de separar las cadenas es por calentamiento a 95°C aproximadamente durante 1 minuto. Al enfriar y mantener la mezcla de reacción entre 40 y 60°C durante 1 minuto, los 2 oligonucleótidos se alinean

con la secuencias complementarias del ADN molde, lo que permite el inicio de la síntesis de la cadena complementaria por la ADN polimerasa cuando la solución se calienta a 72°C y se mantiene así durante otro minuto. Al conjunto de estas etapas se le conoce como un ciclo de amplificación (22, 60).

El tiempo de incubación a 72°C varía de acuerdo con la longitud del producto deseado, aunque una regla empírica señala que por cada kilobase de secuencia esperada se debe incubar la mezcla de reacción un minuto en cada ciclo. Es posible eliminar el paso de extensión si la secuencia por amplificar es menor o igual a 150 pares de bases (pb). La enzima retiene actividad significativa a bajas temperaturas y la síntesis completa puede ocurrir durante la transición entre el alineamiento y la desnaturalización (23, 52).

Generalmente, el primer ciclo de amplificación es precedido por un paso de desnaturalización prolongado a 95°C por lo menos durante 15 minutos, con la finalidad de separar por completo las cadenas de ADN. Después de transcurrir el número deseado de ciclos de amplificación, la mezcla de reacción se incuba a 72°C entre 5 y 10 minutos para permitir que los fragmentos amplificados se encuentren como dobles cadenas (28, 74).

En la mayoría de los casos, las secuencias amplificadas se obtienen en cantidades suficientes para su análisis electroforético en geles de agarosa o poliacrilamida,

dependiendo de la resolución deseada. Los geles de agarosa frecuentemente incorporan bromuro de etidio en su matriz y debido a esta característica, permiten la visualización de las bandas obtenidas bajo luz ultravioleta a 300nm. Sin embargo, en ocasiones los productos de PCR no pueden analizarse de esta manera debido a la baja cantidad de la muestra. En estos casos debe realizarse hibridación con oligonucleótidos internos a la secuencia amplificada (23, 82).

La desnaturalización es el paso crítico del ciclo típico de PCR, ya que de ella depende la disponibilidad de cadenas sencillas y por lo tanto, el apareamiento de los oligonucleótidos a las secuencias complementarias. Además, la temperatura de alineamiento determina la especificidad de la reacción, debido a que las temperaturas bajas originan apareamientos inespecíficos, que traen como consecuencia la amplificación de secuencias no deseadas; por otra parte, la temperatura de alineamiento demasiado alta evita la unión de los oligonucleótidos al ADN resultando en una falta de amplificación (31, 36).

Ciertamente el número de copias generadas durante la reacción de PCR es muy grande, pero no es infinito. Después de un cierto número de ciclos, el producto deseado se acumula exponencialmente hasta que entra en una fase lineal o fase estacionaria. Lo anterior se conoce como efecto meseta. Apartir de este punto, conforme aumenta el tiempo desaparece el producto amplificado debido fundamentalmente a la actividad exonucleasa 5' a 3' de la *Taq* polimerasa (52, 60).

El desarrollo tecnológico y el uso de las ADN polimerasas termoestables han permitido la automatización de todo el proceso y en la actualidad se cuenta con una gran diversidad de equipos llamados termocicladores que efectúan los ciclos de temperatura de manera automática y con gran precisión (23, 31).

La composición básica de una mezcla de PCR incluye al ADN molde, el amortiguador de amplificación, los oligonucleótidos, ADN polimerasa y los trifosfatos de desoxirribonucleótidos (22).

a) ADN molde. Puede estar en forma pura o más comúnmente estar mezclado con otras biomoléculas y además puede presentar degradación parcial. Estas dos características han permitido el uso de ADN de diversas muestras como las ya señaladas (28, 52).

Las secuencias ideales para someterse a PCR tienen entre 150 y 500 pb de longitud, aunque otras más grandes como 2 kb, pueden ser amplificadas eficientemente. Es conveniente que la secuencia elegida sea única, de esta manera se evitan competencias indeseables. Asimismo, se recomienda que esta secuencia única se encuentre en cantidades entre 0.1 y 1.0 microgramos para minimizar el número de ciclos de amplificación requeridos. Aunque la sensibilidad de la reacción en cadena de la

polimerasa es muy grande, el riesgo de contaminación con trazas de ADN se incrementa cuando el número de copias originales es bajo (31, 82).

b) El amortiguador de amplificación. La solución amortiguadora estándar para PCR tiene la composición siguiente: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8.4; MgCl₂ 1.5 mM y 100 µg de gelatina por mililitro de solución. Destaca de entre estos componentes la concentración de Mg²⁺ ya que la eficiencia y la especificidad de la reacción dependen de este parámetro, especialmente sobre la actividad de la ADN polimerasa. Los mejores resultados se obtienen cuando la concentración de este ión varía en el intervalo de 1.5 a 4 mM, considerando que la concentración de EDTA deberá ser baja porque puede complejar al Mg²⁺. Aunque en la composición del amortiguador de PCR no aparece el EDTA, se menciona porque se encuentra comúnmente en los amortiguadores de disolución de ADN. Altas concentraciones de Mg²⁺ y de otros iones monovalentes inhiben a la *Taq* polimerasa: 40-50% de la enzima pierde su actividad cuando el MgCl₂ tiene una concentración de 10 mM. En cambio, se observa un incremento en la velocidad de síntesis de esta polimerasa cuando la concentración de KCl es de 50 mM, mientras que si este límite se rebasa, se presenta inhibición enzimática (36).

c) Los oligonucleótidos. Para llevar a cabo cualquier amplificación por PCR deben diseñarse un par de oligonucleótidos sintéticos que hibriden con regiones del ADN

molde y que se localicen en los extremos de la región de interés. Cada oligonucleótido se debe orientar con su extremo 3'OH hacia el otro, es decir, deben estar encontrados y ser complementarios para ambas cadenas del ADN molde. La longitud promedio de los oligonucleótidos oscila entre 15 a 30 nucleótidos y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la región que se pretende amplificar. Debe evitarse que ambos oligonucleótidos tengan secuencias complementarias entre sí principalmente en los extremos 3'-OH porque fomentan la concatenación entre ellos. Generalmente la distancia promedio de un oligonucleótido al otro oscila entre 100 y 1000 pb, delimitando así la secuencia por amplificar (60, 82).

El contenido de G+C en los oligonucleótidos es el principal determinante de la temperatura de fusión: un aumento en la proporción de estas dos bases es directamente proporcional al incremento de T_m o temperatura de fusión (T_m corresponde a la temperatura a la cual la mitad de ADN se encuentra como cadenas sencillas) (23, 74).

Es recomendable determinar el valor de T_m para cada par de oligonucleótidos, ya que este valor es necesario para calcular la temperatura teórica de alineamiento según la ecuación:

$$T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C} = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^{\circ}\text{C}$$

Donde T_a es la temperatura teórica de alineamiento. Normalmente el valor de T_a oscila entre 55-65°C, sin embargo, según las características del sistema de amplificación, T_a puede variar significativamente hasta alcanzar valores fuera del intervalo mencionado. La práctica general consiste en mantener a los oligonucleótidos en la solución de amplificación a una concentración entre 0.1 y 1.0 mM de cada uno de ellos. En el diseño de los oligonucleótidos, pueden incluirse sitios de restricción, útiles para la clonación del producto amplificado en caso necesario (22, 31).

d) ADN polimerasa. Durante la reacción de síntesis de una cadena de ADN, la ADN polimerasa incorpora desoxirribonucleótidos (dNTPs) al formar un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo libre en el extremo 3' de la cadena naciente y el grupo fosfato en 5' del nucleótido entrante. La energía para esta reacción proviene de la hidrólisis del fosfato gamma de cada dNTP que se incorpora (28, 52).

Todas las cadenas ADN polimerasas necesitan un oligonucleótido cebador que se encuentre en el lugar de inicio de la síntesis de la cadena complementaria al ADN molde. El oligonucleótido cebador es un pequeño fragmento iniciador de ARN que proporciona el extremo 3'-OH libre para que actúe la enzima. Asimismo, todas las ADN polimerasas trabajan en dirección 5' a 3' (22, 74).

El grupo que desarrolló la metodología de PCR a mediados de la década pasada, empleó al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* para catalizar la

extensión del fragmento desecado a 37°C. Obviamente, en el siguiente paso desnaturizante, la enzima perdía su actividad y en el próximo ciclo había la necesidad de agregar una nueva cantidad de enzima, lo cual resultaba en un procedimiento laborioso y costoso (36).

Poco después se utilizó la *Taq* ADN polimerasa, la enzima termoestable proveniente de *Thermus aquaticus*, una bacteria que crece en aguas termales a 70-75°C. A partir de este descubrimiento, *Taq* es la ADN polimerasa más utilizada en PCR, tanto en su forma nativa extraída de *T. aquaticus*, o la recombinante obtenida de *E. coli*, conocida como AmpliTaq ADN polimerasa (23, 74).

El nombre genérico de esta enzima es EC 2.7.7.7 desoxinucleósido trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa. La *Taq* polimerasa tiene 832 aminoácidos con un peso molecular de 93.91 kDa, y una actividad específica de 200, 000 U por mg (U es la cantidad de enzima requerida para incorporar 10 nanomoles de desoxirribonucleótidos en material ácido insoluble durante 30 minutos a 74°C, usando un ADN molde activado de esperma de salmón. Su temperatura óptima se encuentra entre los 75 y 80°C, y es una polimerasa con alta procesividad debido a que la velocidad de incorporación de nucleótidos K_{cat} , es de unos 150 nucleótidos por segundo (La procesividad es la capacidad de una polimerasa para incorporar nucleótidos continuamente desde el cebador, sin disociarse del ADN molde). Como característica

importante, la *Taq* polimerasa conserva el 50% de su actividad después de 130, 40 y 6 minutos a 92.5, 95 y 97.5 °C, respectivamente. Además de los nucleótidos ordinarios, la *Taq* polimerasa puede incorporar análogos como 5'-trifosfato de 7-deaza-2'-desoxiguanosina (52, 82).

En los últimos años se han introducido nuevas ADN polimerasas termoestables para ser usadas en PCR. Tal es el caso de la enzima aislada de la bacteria termofílica *Thermus thermophilus* (*Tth*) o la *Tma* polimerasa proveniente de *Thermotoga maritima*, una bacteria que crece a temperaturas superiores a 90°C. Más recientemente se inició la comercialización de otra enzima termoestable: *Vent* polimerasa, purificada a partir de cepas de *Thermococcus litoralis* (82).

Estas ADN polimerasas difieren en términos de su perfil de actividad, procesividad y resistencia a la temperatura. Algunas de estas enzimas como por ejemplo la *Taq* polimerasa, tiene actividad de exonucleasa 5' a 3' pero carece de esta función en sentido 3' a 5'; otras ADN polimerasas termoestables tienen actividad de exonucleasa en ambos sentidos. Recientemente se han lanzado al mercado variantes obtenidas por ingeniería genética, como ha sido el fragmento Stoffel de la *Taq* polimerasa, que no tiene la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la enzima nativa y es prácticamente insensible a concentraciones altas de Mg^{2+} (28, 74).

La elección de la ADN polimerasa depende de las aplicaciones particulares y de las propiedades de cada enzima. Por ejemplo, la *Tli* polimerasa tiene actividad de transcriptasa reversa en presencia de manganeso divalente, permitiendo en un solo tubo de reacción la síntesis de ADNc a partir de un molde de ARN, seguido por PCR para amplificar el ADNc una vez que el manganeso ha sido reemplazado por iones magnesio (31, 60).

Un parámetro importante de las ADN polimerasas es la fidelidad. Este parámetro mide la exactitud de la reacción de síntesis y por lo tanto, refleja los errores cometidos por la polimerasa. Cuando se hace secuenciación usando PCR, la fidelidad es muy importante, ya que un error de la polimerasa puede observarse como una mutación en el ADN problema. En casos como éste, debe repetirse el ensayo con otra enzima antes de tener un resultado contundente. La alta fidelidad de algunas enzimas es consecuencia de la actividad de exonucleasa 3' a 5' correctora de pruebas, por lo que estas enzimas pueden ser de elección para fines de secuenciación.

e) Los trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTPs). Los trifosfatos de desoxirribonucleótidos son los monómeros que la ADN polimerasa incorpora en la cadena complementaria al molde de ADN.

Es importante la concentración de dNTPs en la reacción de amplificación, ya que a bajas concentraciones podría reducirse la eficiencia del proceso por reactivos

limitantes. En cambio, las concentraciones altas de dNTPs alteran significativamente los niveles de Mg^{2+} libres en la reacción, por la formación de complejos dNTP-Mg. Si la concentración de cada dNTP excede los 50 mM, hay inhibición total de la actividad de la *Taq* polimerasa (28, 52).

La concentración recomendada para cada dNTP es de 200 μ M; sin embargo, es importante mantener la concentración equimolar entre los cuatro dNTPs, para evitar que la *Taq* polimerasa incorpore algún dNTP equivocado en determinadas posiciones, y de esta manera incrementar la tasa de error de la enzima por nucleótido polimerizado. La tasa de error de incorporación se calcula dividiendo la unidad entre el número de bases a la cual ocurre una mutación (23, 82).

Se ha calculado la tasa de error experimental de la *Taq* polimerasa en 1.5×10^{-6} y 0.7×10^{-6} para sustituciones o cambios del marco de lectura, respectivamente (36).

En términos metodológicos, es importante definir lo que se conoce como condiciones estándares en PCR: Tri-HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 200 μ M/cada uno y 2.5 unidades de *Taq* polimerasa, usando un termociclador con el siguiente perfil térmico: un minuto a $94^{\circ}C$ para la desnaturalización, un minuto a $72^{\circ}C$ para la extensión (31).

Las condiciones antes expuestas no siempre dan los mejores resultados por lo que se debe optimizar cada una de las variables mencionadas anteriormente.

Inicialmente, para el cloruro de magnesio deberá hacerse una curva de concentración creciente, empezando generalmente en 1.5 mM hasta 4 mM con un incremento de 0.5 mM cada vez y observando si en cada concentración existe o no amplificación. La concentración en la cual se observa mejor el producto deseado, es la que deberá usarse para posteriores reacciones. Cabe señalar que la optimización de la concentración de $MgCl_2$ deberá hacerse siempre que se usen nuevos oligonucleótidos o reactivos de otro fabricante (52, 74).

En cuanto a los dNTPs, frecuentemente basta con ajustar la concentración de cada nucleótido a 200 μM para tener los mejores resultados. En caso de no ser así, deberá buscarse la concentración óptima, que será la misma para los cuatro nucleótidos (60).

El rendimiento de la reacción puede abatirse si se usan cantidades menores a 1.5 Unidades de enzima. Es conveniente usar entre 1.5 y 3.0 Unidades de *Taq* polimerasa para obtener los mejores resultados. Con altas concentraciones de enzima se fomenta la síntesis de productos inespecíficos e incluso la desaparición de la banda esperada si el número de ciclos es mayor a 40 (82).

Aunque no toma parte en la reacción de amplificación, el aceite mineral tiene una importante función en PCR. Evita que durante los pasos de desnaturalización se evapore el agua en la cual están disueltos todos los componentes de la reacción y se alteren las concentraciones de todos ellos. El aceite mineral puede adicionarse cuando todos los reactivos se encuentran en la solución de amplificación o antes de agregar la enzima, modalidad que se conoce como "Hot Start" PCR. Este procedimiento permite una desnaturalización extensiva sin pérdida de actividad de la *Taq* polimerasa, misma que se incorpora a la mezcla de reacción cuando la temperatura desciende entre 70-80°C (22, 31).

Una comunicación reciente menciona que el uso de aceite mineral como recubrimiento de las mezclas de PCR puede acarrear la formación de amplificadores inespecíficos y que tales contaminaciones pueden minimizarse si se emplea parafina de alta pureza. Las nuevas generaciones de termocicladores prescinden del aceite mineral como recubrimiento y en su lugar se emplean ceras inertes (28, 60).

Además del análisis electroforético convencional, es posible realizar detecciones colorimétricas de los productos amplificados si los oligonucleótidos acarrean ligandos tales como la biotina. En tal procedimiento, el ADN amplificado se transfiere a un soporte sólido que tiene en su superficie proteínas de anclaje para el oligonucleótido y se adiciona avidina conjugada con peroxidasa. La alta afinidad de la avidina por la

biotina permite una unión específica. Finalmente, se adiciona un cromógeno junto con H₂O para el desarrollo de color (23, 74).

Una manera más fina de detección es realizar secuenciación para saber si el producto amplificado es la secuencia esperada y para analizar la presencia de posibles mutaciones.

La gran sensibilidad de PCR representa su principal ventaja, aunque también acarrea algunos problemas. Permite, debido a esta característica, tanto la amplificación de secuencias que se encuentran repetidas varias veces dentro de un genoma, como la detección de secuencias de copia única. También por esta razón, puede amplificar moldes no deseados que se encuentran como contaminantes en el medio ambiente o en el material de laboratorio usado durante la preparación de las muestras. Se ha aconsejado que el lugar donde se mezclan los componentes de PCR esté separado físicamente del sitio donde se encuentra el termociclador, y que a su vez el análisis de los productos de la reacción se lleve a cabo en otro laboratorio, para así disminuir en lo posible la contaminación. Se han usado varios métodos para eliminar el ADN extraño de la mezcla de reacción, como la irradiación gamma o con luz ultravioleta, esterilización en autoclave y mediante tratamiento enzimático de la solución reactiva sin el ADN molde con varias nucleasas, todos ellos sin resultados absolutamente convincentes (22, 36, 52).

La tabla 3 muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos asociados más frecuentemente a la detección del microorganismo en biopsias gástricas.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de diversos métodos aplicados a las biopsias para detectar la presencia de *Helicobacter pylori* (23).

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Examen histológico	90 %	88 %
Prueba de ureasa	79 %	92 %
Cultivo	86 %	100 %
PCR	96 %	100 %

ii. Métodos no invasivos

En esta categoría se agrupa a la prueba respiratoria de la ureasa y a las técnicas inmunoquímicas que ponen en evidencia y cuantifican anticuerpos séricos anti-*H. pylori*. Con respecto a la prueba respiratoria de ureasa, el enfermo ingiere -en ayunas- urea marcada con ^{14}C la cual, en caso de encontrarse el microorganismo en el estómago, será hidrolizada por la ureasa bacteriana, produciéndose CO_2 marcado, que difundirá hacia la sangre y será excretado por los pulmones, pudiéndose detectar en muestras respiratorias obtenidas a intervalos pre-establecidos; cabe mencionar

que, en ausencia de ureasa, la urea marcada se desechará por la orina. Evidentemente, esta prueba puede generar falsos negativos cuando se realiza al finalizar algún tratamiento con fármacos tales como bismuto, omeprazol o diversos antibióticos; en este sentido, el ensayo debe llevarse a cabo aproximadamente 30 días después de concluir la terapia correspondiente. Por su parte, los falsos positivos pueden ocurrir en presencia de alguna otra bacteria ureasa positiva, cuyo establecimiento en el estómago haya sido permitido por episodios importantes de aclorhidria. Tanto la sensibilidad como la especificidad de esta prueba fluctúan entre 90 y 98 % (4, 28, 56).

Por lo que respecta a la detección de anticuerpos séricos, las técnicas empleadas con mayor frecuencia son ELISA, aglutinación en látex y fijación de complemento, las cuales alcanzan sensibilidades y confiabilidades que dependen -en parte- de factores asociados al paciente y del número de bacterias involucradas (10, 33, 58, 63, 79).

De cualquier manera, la prueba de ELISA es recomendada por diversos autores que emplean antígenos diferentes, tales como células completas del microorganismo, sustancias de membrana extraídas con glicina ácida, extractos de lisis causada por sonicación, e inclusive, ureasas producidas por *H. pylori*. El antígeno se adsorbe al fondo de varios pozos de placas de microtitulación -dejando algunos pozos sin sensibilizar, a fin de comprobar eventuales reacciones inespecíficas entre inmunoglobulinas y el plástico-, a los que se adicionan diluciones seriadas del suero

del paciente y, previa incubación de 1 h a temperatura ambiente, el sistema se lava y se agrega el suero conjugado: anticuerpos anti- γ globulina humana marcados con peroxidasa; finalmente, después de volver a incubar y lavar, se adiciona el sistema revelador (o-fenilendiamina/ H_2O_2) y la posible reacción se detiene con ácido sulfúrico después de 30 minutos; la intensidad del color amarillo resultante se lee a 492 nm en un fotocolorímetro, siendo directamente proporcional a la concentración de anticuerpos séricos. Cabe mencionar que los anticuerpos séricos anti-*H. pylori* permanecen en concentraciones considerables durante años, aún después de que el paciente ha curado, por lo cual esta técnica no resulta de utilidad para valorar el tratamiento de la enfermedad (40, 45, 49, 57, 67, 68, 83, 85).

IV. TRATAMIENTO

Afortunadamente, los avances logrados en cuanto a la terapia de las infecciones debidas a *H. pylori*, han permitido devolver la salud a numerosos enfermos de gastritis o de úlceras duodenales. En este sentido, se ha observado que gran parte del éxito del tratamiento depende de que el paciente se apegue disciplinadamente a los regímenes terapéuticos, los cuales suelen contemplar el empleo de varios fármacos a la vez, que deben administrarse con puntualidad y durante períodos relativamente prolongados; entre dichos fármacos destacan el subsalicilato de bismuto (en cuya presencia se ha demostrado que disminuye la velocidad de crecimiento del agente etiológico), un antibacteriano clásico seleccionado entre amoxicilina y tetraciclina, y el metronidazol. Los siguientes esquemas resultan recomendados con mayor frecuencia (47, 48, 70):

Tabla 4. Esquema terapéutico # 1

FÁRMACOS	DOSIS	DURACIÓN
Amoxicilina	500 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Metronidazol	500 mg, 3 veces diarias	De 10 días a 2 semanas
Subsalicilato de bismuto	2 comprimidos, 3 veces diarias	2 semanas

Tabla 5. Esquema terapéutico # 2

FARMACOS	DOSIS	DURACIÓN
Tetraciclina	500 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Metronidazol	250 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Ranitidina	300 mg diarios, al acostarse	Hasta la cicatrización de la úlcera
Subsalicilato de bismuto	2 comprimidos, 4 veces diarias	2 semanas

Los fármacos mencionados en las tablas anteriores, dependiendo de su origen, de su naturaleza química, o de sus respectivos mecanismos de acción, se encuentran clasificados dentro de alguno de los grupos siguientes:

Antagonistas de los receptores H₂

Este tipo de compuestos inhibe las secreciones gástricas ácidas estimuladas por la histamina y otros agonistas de H₂, así como por la gastrina y, en menor grado, por los antagonistas muscarínicos. Además, reducen el volumen de jugo gástrico y su concentración de H⁺ (29, 46).

Los antagonistas de H_2 protegen a los animales de experimentación contra la úlcera gástrica inducida por estrés, por ligadura pilórica, por aspirina y por agonistas de H_2 ; adicionalmente, contrarrestan la ulceración péptica en el hombre. La cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina, pertenecen al grupo de fármacos antagonistas de los receptores H_2 (29, 46, 48).

Inhibidores de la H^+ , K^+ -ATPasa

En una célula parietal, el mediador final de la secreción ácida es precisamente la H^+ , K^+ -ATPasa, la cual actúa como bomba de protones y se localiza en la membrana apical. Por tal razón, se han desarrollado varios inhibidores específicos de esta enzima única, mismos que resultan especialmente útiles en pacientes con hipergastrinemia y pueden ser valiosos para quienes padecen enfermedad ulcerosa péptica incontrolada por los antagonistas de H_2 (46, 47).

Uno de los principales inhibidores de la bomba de protones es el omeprazol; este fármaco posee estabilidad química pero carece de actividad inhibitoria a pH neutro; no obstante, a $pH \leq 5$, se protoniza y se reorganiza con rapidez originando dos especies: un ácido sulfénico y una sulfenamida, que reaccionan con los grupos sulfhidrilo presentes en la enzima. La inhibición completa se concreta cuando las dos moléculas reactivas

derivadas del omeprazol se unen a cada molécula de enzima a través de uniones disulfuro (29, 47).

El efecto farmacológico del omeprazol se resume de la siguiente manera: inhibición de la secreción ácida, lo que promueve la curación de las úlceras en el estómago, el duodeno y el esófago (29).

Compuestos con bismuto

Los coloides de bismuto se han utilizado desde hace mucho tiempo para aliviar y/o curar los malestares gastrointestinales. Sin embargo, recientemente se está estudiando con intensidad su utilidad potencial para tratar las úlceras pépticas. Aunque estos compuestos no tienen una capacidad neutralizante de las sustancias ácidas, inhiben la actividad de la pepsina, permitiendo que aumente la secreción de moco, e inclusive, interactúan con proteínas en el cráter necrótico de la úlcera, formando una barrera que impide la libre difusión de ácido (29, 46).

No obstante, el papel más relevante de los coloides de bismuto reside en su capacidad para provocar el desprendimiento de *H. pylori* a partir del epitelio gástrico y la secuencial lisis del microorganismo. Cabe mencionar que el mecanismo a través del cual ocurre lo antes mencionado aún continúa siendo desconocido (46).

Antibióticos

Sin lugar a dudas, los principales antibióticos con acción bactericida en contra de *H. pylori* son las penicilinas. Como se sabe, los compuestos penicilínicos son antibióticos extraordinariamente eficaces y con una toxicidad muy reducida; además, algunas son particularmente estables frente a los ácidos, destacando en este rubro la ampicilina y la amoxicilina (29, 46).

CONCLUSIONES

- Las gastritis, algunos adenocarcinomas gástricos, y las úlceras gástricas y duodenales, podrían estar relacionados con la infección por *H. pylori*, la cual aparentemente se adquiere por vía oro-fecal, oral-oral o por contacto con animales domésticos (gatos) que fungen como reservorio del microorganismo, afectando a cualquier edad pero, principalmente, a los niveles socioeconómicos más bajos.
- Los principales factores de patogenicidad de *H. pylori* son: adhesinas, ureasa, catalasa, deshidrogenasa alcohólica, citotoxina, motilidad y mucinasa.
- En cuanto al diagnóstico de laboratorio de las afecciones debidas a *H. pylori*, la detección de esta bacteria se lleva a cabo mediante métodos invasivos, los cuales se basan en la recolección de por lo menos dos biopsias, obtenidas mediante endoscopia, que se someten posteriormente a estudios histológicos, a cultivo (para aislamiento e identificación del microorganismo), a pruebas de la ureasa, e inclusive a PCR. Por su parte, los métodos no invasivos se basan en poner de manifiesto la presencia de anticuerpos séricos anti-*H. pylori* y en la realización de la prueba respiratoria de la ureasa.

- El tratamiento básico de las afecciones debidas a *H. pylori*, incluye principalmente el empleo de amoxicilina o tetraciclina, metronidazol y sales de bismuto, durante 10 a 14 días.

BIBLIOGRAFIA

1. Abreu L.M.:
GASTROENTEROLOGÍA
Cervantes Editores, 5a. edición
México, 1991.
2. Ansorg R., Von Recklinghausen G., Pomarius R., Schmid E.: Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of *Helicobacter pylori*,
J. Clin Microbiol, 1991; 29(1):51-53
3. Asaka M., Kimura T., Kato M., Kudo M., Miki K., Ogoshi K., Kato T., Tatsuta M. Graham D.: Possible role of *Helicobacter pylori* infection in early gastric cancer development, *Cancer*, 1994; 73(11):2691-2694.
4. Atherton J., Spiller R.:The urea breath test for *Helicobacter pylori*, *Gut*, 1994;
35:723-725.
5. Balows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J.
Manual of Clinical Microbiology
American Society for Microbiology, 5th Edition
Washington D.C., 1991.

6. Blaser M.: *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection, Trends in Microbiology, 1993; 1(7): 255-259.
7. Blaser M., Parsonnet J.: Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis, J Clin Invest, 1994; 94:4-8.
8. Borén T., Normark S., Falk P.: *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence, Trends in Microbiology, 1994; 2(7):221-228.
9. Borbolla J.: *Helicobacter pylori* y enfermedad acidopéptica, Infectología, 1994; 14(3):121-125.
10. Buchvald D., Maeland J.: Characterization of a 25,000-dalton *Helicobacter pylori* protein, cross-reacting with a *Campylobacter jejuni* protein, APMIS, 1992; 100: 470-478.
11. Buck G., Gourley W., Lee W., Subramanyam K., Latimer J., DiNuzzo A.: Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer, J Infect Dis, 1986; 153(4): 664-669.

12. Chandrakumaran K., Vaira D., Hobsley M.: Duodenal ulcer, *Helicobacter pylori*, and gastric secretion, *Gut*, 1994; 35:1033-1036.
13. Cover T., Cao P., Murthy U., Sipple M., Blaser M.: Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, *J Clin Invest*, 1992; 90: 913-918.
14. Cover T., Dooley C., Blaser M.: Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity, *Infect Immun*, 1990; 58(3):603-610.
15. Cover T., Puryear W., Perez-Perez G., Blaser M.: Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin, *Infect Immun*, 1991; 59(4): 1264-1270.
16. Dehesa M., Dooley C., Cohen H., Fitzgibbons P., Perez-Perez G., Blaser M.: High prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic hispanics, *J Clin Microbiol*, 1991; 29(6): 1128-1131.
17. Dooley C., Cohen H.: The clinical significance of *Campylobacter pylori*, *Ann Intern Med*, 1988; 108:(70-79).

18. Dunn B.: Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology Clinics of North America*, 1993; 22(1):43-57.
19. Dye K., Marshall B., McCallum R.: Gastritis, úlceras y *Helicobacter pylori*, *Infectología*, 1993 Año 13(2):83-88.
20. Eaton K., Krakowka S.: Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*, *Infect Immun*, 1994; 62(9): 3604-3607.
21. Eaton K., Morgan D., Krakowka S.: *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets, *Infect Immun*, 1989; 57(4):1119-1125.
22. Erlich H.E.:
PCR TECHNOLOGY. PRINCIPLES AND APPLICATIONS FOR DNA AMPLIFICATION
Stockton Press
New York, 1989.
23. Fabre R., Sobhani I., Laurent-Puig P., Hedef N., Iazigi N., Vissuzaine C., Rodde I., Potet F., Mignon M., Etienne J., Braquet M.: Polymerase Chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy

specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests, *Gut*, 1994; 35:905-908.

24. Falk P., Roth K., Borén T., Westblom T., Gordon J.: An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:2035-2039.
25. Figura N., Guglielmetti P., Rossolini A., Barberi A., Cusi G., Musmanno R., Russi M., Quaranta S.: Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only, *J Clin Microbiol*, 1989; 27(1): 225-226.
26. Fox J., Lee A., Otto G., Taylor N., Murphy J.: *Helicobacter felis* gastritis in gnotobiotic rats: an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis, *Infect Immun*, 1991; 59(3): 785-791.
27. Fox J., Paster B., Dewhirst F., Taylor N., Yan L., Macuch P., Chmura L.: *Helicobacter mustelae* isolation from feces of ferrets: evidence to support fecal-oral transmission of a gastric *Helicobacter*, *Infect Immun*, 1992; 60(2):606-611.

28. Foxal P., Hu L., Mobley H.: Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(3):739-741.
29. Goodman y Gilman:
Las bases farmacológicas de la Terapéutica
Ed. Medica Panamericana, 8^{va} Edición
México 1991.
30. Goodwin S., Worsley B.: Microbiology of *Helicobacter pylori*,
Gastroenterology Clinics of North America, 1993; 22(1):5-19.
31. Hammar M., Tyszkiewicz T., Wadström T., O'toole P.: Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polimerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(1):54-58.
32. Handt L., Fox J., Dewhirst F., Fraser G., Paster B., Yan L., Rozmiarek H., Rufo R., Stalis I.: *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications, *Infect Immun*, 1994; 62(6):2367-2374.

33. Hoek F., Noach L., Rauws E., Tytgat G.: Evaluation of the performance of commercial test kits for detection of *Helicobacter pylori* antibodies in serum, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(6):1525-1528.
34. Hopkins R., Vial P., Ferreccio C., Ovalle J., Prado P., Sotomayor V., Russell R., Wasserman S., Morris G.: Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission, *J Infect Dis*, 1993; 168:222-226.
35. Howard B. J., Klaas J., Weissfeld A. S., Rubin S. J. and Tilton R.C.
Clinical and Pathogenic Microbiology
The C.V. Mosby Company, 1st. Edition
Missouri, 1987.
36. Innis M. A., Gelfand D. H.
Optimization of PCRs in PCR protocols. A guide to methods and Application
Ed. Academic Press, Inc.
E.U.A., 1990.
37. Klein P., Graham D., Gaillour A., Opekum A., Smith E.: Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children, *Lancet*, 1991; 337:1503-1506.

38. Koneman E. W.
Diagnóstico Microbiológico
Ed. Médica Panamericana, 1a Edición
México, 1985.
39. Kostrzynska M., Betts J., Austin J., Trust T.: Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella, *J Bacteriol*, 1991; 173(3): 937-946.
40. Kosunen T., Seppala K., Sarna S., Sipponen P.: Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*, *Lancet*, 1992; 339:893-895.
41. Krajden S., Bohnen J., Anderson J., Kempston J., Fuksa M., Matlow A., Marcon N., Haber G., Kortan P., Karmali M., Corey P., Petrea C., Babida C., Hayman S.: Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies, *J Clin Microbiol*, 1987; 25(6): 1117-1118.
42. Labenz J., Börsch G.: Evidence for the essential role of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease, *Gut*, 1994; 35:19-22.

43. Lee A., Fox J., Hazell S.: Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective,
Infect Immun, 1993; 61(5):1601-1610.

44. Lehniger A. L.

BIOQUÍMICA

De. Omega S. A., 2ª Edición

Barcelona, 1990.

45. Leunk R., Ferguson M., Morgan D., Low D., Simor A.: Antibody to cytotoxin
in infection by *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol*, 1990; 28(6):1181-1184.

46. Litter Manuel

Compendio de Farmacología

De. El Ateneo 3ª Edición

Argentina, 1986.

47. Logan R., Gummert P., Hegarty B., Walker M., Baron J., Misiewiczj.:
Clarithromycin and omeprazole for *Helicobacter pylori*, *Lancet*, 1992;
340:239.

48. Logan R., Gummert P., Misiewicz J., Karim Q., Walker M., Baron J.: One week's anti-*Helicobacter pylori* treatment for duodenal ulcer, *Gut*, 1994; 35:15-18.
49. Malaty H., Graham D.: Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection, *Gut*, 1994; 35:742-745.
50. Marshall B.: *Campylobacter pyloridis* and Gastritis, *J Infect Dis*, 1986; 153(4):650-657.
51. Mc Faddin J. F.
Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica
Ed. Médica Panamericana, 1ª Edición
México, 1990.
52. Medej R.: Polymerase chain reaction: applications to the clinical laboratory, *Lab Medica International*, 1991; VIII(4):11-15.
53. Megraud F., Bonnet F., Garnier M., Lamouliatte H.: Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content, *J Clin Microbiol*, 1985; 22(6): 1007-1010.

54. Megraud F., Brassens-Rabbé M., Denis F., Belbouri A., Quinh D.: Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations, *J Clin Microbiol*, 1989; 27(8):1870-1873.
55. Megraud F., Neman-Simha V., Brüggmann D.: Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells, *Infect Immun*, 1992; 60(5): 1858-1863.
56. Mendez C., Ramírez J., Cervantes R., Rivera N., Schatz F., Martínez C., Gómez R., Navarrete N.: Diagnostico de *Helicobacter pylori* en niños con dolor abdominal recurrente, *Acta Gastroent Latinoamer*, 1994;24(3):169-174.
57. Mills S., Kurjanczyk L., Penner J.: Antigenicity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(12):3175-3180.
58. Mitchell H., Li Y., Chen M., Du G., Wang Z., Lee A., Hazell S.: Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: Identification of early childhood as the critical period for acquisition, *J Infect Dis*, 1992; 166:149-153.
59. Morgan D., Freedman R., Depew C., Kraft W.: Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media, *J Clin Microbiol*, 1987; 25(11): 2123-2125.

60. Morotomi M., Hoshina S., Green P., Neu H., Logerfo P., Watanabe I., Mutai M., Weinstein B.: Oligonucleotide probe for detection and identification of *Campylobacter pylori*, *J Clin Microbiol*, 1989; 27(12):2652-2655.
61. Morris G., El Sherbeeney Patton C., Kodaka H., Lombard G., Edmonds P., Hollis D., Brenner J.: Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* sp., *J Clin Microbiol*, 1985; 22(5): 714-718.
62. Nedenskov-Sorensen P., Aase S., Bjornekleit A., Fausa O., Bukholm G.: Sampling efficiency in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and chronic active gastritis, *J Clin Microbiol*, 1991; 29(4):672-675.
63. Newell D.: The principles and practices of the serodiagnosis of *Helicobacter pylori* Infection, *Lab Medica International*, 1991; VIII(6):7-11.
64. Otto G., Hazell S., Fox J., Howlett C., Murphy J., O'rourke J., Lee A.: Animal and public health implication of gastric colonization of cats by *Helicobacter*-like organisms, *J Clin Microbiol*, 1994; 32(4):1043-1049.

65. Parsonnet J.: *Helicobacter pylori* and gastric cancer, *Gastroenterology Clinics of North America*, 1993; 22(1):89-103.
66. Patel P., Mendall M., Khuluisi S., Molineaux N., Levy J., Maxwell J., Northfield T.: Salivary antibodies to *Helicobacter pylori* screening dyspeptic patients before endoscopy, *Lancet*, 1994; 344:511-512.
67. Percial L., Gaarslev K.: IgG subclass antibodies against *Helicobacter pylori* heat-stabile antigens in normal persons and dyspeptic patients, *APMIS*, 1992; 100:747-751.
68. Percial L., Raskov H., Elsborg L., Holck S., Justesen T., Fischer B., Moller C., Gaarslev K.: Prevalence of antibodies against heat-stable antigens from *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms and normal persons, *APMIS*, 1992; 100:779-789.
69. Pérez-Pérez G., Dworkin B., Chodos J., Blaser M.: *Campylobacter pylori* antibodies in humans, *Ann Intern Med*, 1988; 109:11-17.
70. Peterson W.: *Helicobacter pylori* y enfermedad ulceropéptica, *Infectología*, 1994; año 14(6):279-289.

71. Queiroz D., Moura S., Mendes E., Rocha G., Barbosa A.: Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children, *Lancet*, 1994; 343:1191-1193.
72. Roine R., Salmela K., Höök-Nikanne J., Kosunen T., Salaspuro M.: Alcohol dehydrogenase mediated acetaldehyde production by *Helicobacter pylori*- a possible mechanism behind gastric injury, *Life Sciences*, 51(17):1333-1337.
73. Romaniuk P., Zoltowska B., Trust T., Lane D., Olsen G., Pace N., Stahl D.: *Campylobacter pylori* the espiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp., *J Bacteriol*, 1987; 169(5):2137-2141.
74. Roosendaal R., Kuipers E., Peña S., Uytterlinde A., Walboomers J., Meuwissen S.: Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR, *J Clin Microbiol*, 1994; 32(4):1123-1126.
75. Rudmann D., Eaton K., Krakowka S.: Ultrastructural study of *Helicobacter pylori* adherence properties in gnotobiotic piglets, *Infect Immun*, 1992; 60(5): 2121-2124.
76. Sanford T.

Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio

Ed. Salvat, 8^{va} Edición

Barcelona, 1991.

77. Shames B., Kraiden S., Fuksa M., Babida C., Penner J.L.: Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque, *J Clin Microbiol*, 1989; 27(12): 2849-2850.
78. Soltesz V., Zeeberg B., Wadström T.: Optimal survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(6): 1453-1456.
79. Talley N., Kost L., Haddad A., Zinsmeister A.: Comparison of commercial serological tests for detection of *Helicobacter pylori* antibodies, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(12):3146-3150.
80. Thomas J.E., Gibson M.K., Dale A., Weaver L.T.: Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces, *Lancet*, 1992; 340:1194-1195.
81. Tummuru M., Cover T., Blaser M.: Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production, *Infect Immun*, 1993; 61(5):1799-1809.

82. Valentine J., Arthur R., Mobley H., Dick J.: Detection of *Helicobacter pylori* by using the polimerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 1991; 29(4):689-695.
83. Veldhuyzen van Zamer S., Pollak T., Best L., Bezanson G., Marrie T.: Increasing prevalence of *Helicobacter pylori* infection with age: continuous risk of infection in adults rather than cohort effect, *J Infect Dis*, 1994; 169:434-437.
84. Vollmers P., Dämmrich J., Ribbert H., Grassel S., Debus S., Heesemann J.: Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with *Helicobacter pylori* and stimulate stomach cancer cells *in vitro*, *Cancer*, 1994; 74(5):1525-1532.
85. Westblom T., Madan E., Gudipati S., Midkiff B., Czinn S.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult and pediatric patients by using pyloriset, a rapid latex agglutination test, *J Clin Microbiol*, 1992; 30(1):96-98.
86. Wulffer H., Heesemann J., Bützowo G., Löning T. Laufs R.: Detection of *Campylobacter pyloridis* in patients with antrum gastritis and peptic ulcers by culture, complement fixation test, and immunoblot, *J Clin Microbiol*, 1986; 24(5):716-720.