

AGRADECIMIENTOS:

11262
2
2y.

A mis padres:

Quienes desde mi infancia me enseñaron a ser responsable y me dieron a conocer la satisfacción de hacer las cosas bien.

HEIS CON
FALLA DE ORIGEN

[99]



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE.

Introducción y antecedentes.....	2
Experiencia en el instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán": 7-10	
Condiciones óptimas de crecimiento.....	7
Preparación del antígeno.....	7
Inmunización al conejo.....	7
Estandarización del método de ELISA para la detección de anticuerpos séricos contra <i>H. pylori</i>	8
Exposición a animales y sus productos como un factor de riesgo para infección por <i>H. pylori</i> ...	9
Justificación y planteamiento del problema.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12
Material y métodos : 13-26	
Diseño del estudio.....	13
Selección de poblaciones.....	14
Criterios de elegibilidad.....	16
Estimación de factores de confusión.....	17

Análisis de datos.....	17
Definiciones.....	18
Colección y procesamiento de muestras.....	21
Detección de anticuerpos contra <i>H. pylori</i>	22
Ensayos de inhibición.....	24
Electroinmunotransferencia.....	25

Resultados: 26-51

Prevalencia de infección por <i>H. pylori</i> en cerdos.....	28
Validación de la detección de anticuerpos Hp-específicos por el método de ELISA indirecto: 30-35	
Reactividad cruzada.....	30
Validación de la detección de anticuerpos contra <i>H. pylori</i>	31
Sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos contra <i>H. pylori</i>	33
Control de calidad.....	35

Determinación de anticuerpos contra *H. pylori*
en personas con diferentes tipos y grados de
exposición al cerdo: 36-51

Factores de riesgo para infección por *H. pylori*. 42

Determinación de anticuerpos contra *C. jejuni*.... 49

Discusión..... 52

Conclusiones..... 61

Bibliografía..... 63

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

Helicobacter pylori (Hp) es un microorganismo gram negativo de estructura curva o espirilar que fue aislado por primera vez por Warren y cols. en 1982 de la biopsia de mucosa gástrica de un paciente con gastritis (1). Aunque los antecedentes de este afortunado hallazgo datan desde 1893, cuando Bizzozero y posteriormente Salomon informaron la presencia de estructuras bacterianas espirales en la superficie de la mucosa gástrica de humanos (2-4), fue hasta 1975 que Steer encontró una asociación entre la presencia de estas estructuras en mucosa gástrica y datos histopatológicos de gastritis, no siendo posible entonces su aislamiento (5).

En 1983, Marshall y cols. (6) realizaron un estudio prospectivo para determinar el grado de asociación de este microorganismo con enfermedad ácido péptica, encontrando que el cultivo era positivo en 87% de los casos de úlcera péptica y en 55% de los casos de gastritis, e informaron que *H. pylori* se aisló en 50% de las mucosas gástricas endoscópicamente normales, pero sólo en 5% de las mucosas con imagen histológica normal. A partir de entonces, se han publicado gran número de estudios provenientes de casi todo el mundo que resaltan esta asociación, la cual llega 100% en los casos de úlcera péptica (7), y a 97% en los casos de gastritis (8). Por otra parte, sólo se ha encontrado de 0% al 14% de cultivos positivos en pacientes con mucosa gástrica histológicamente normal (7,9).

El diagnóstico de enfermedad ácido péptica (gastritis, úlcera) asociada a *H. pylori*, requiere de un procedimiento invasivo no inocuo: la panendoscopia y biopsia de mucosa gástrica con cultivo en medios selectivos y tinciones especiales. Se ha intentado la detección de anticuerpos contra diferentes preparaciones de la estructura de este microorganismo con ensayos inmunológicos, que van desde la aglutinación bacteriana hasta la

electroinmunotransferencia (10,11). De todos ellos, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) mostró ser el más específico, con una sensibilidad superior a 90%, si se utilizan las proteínas de superficie extraídas con glicina ácida en la detección de anticuerpos específicos (7), sin embargo, se ha informado que con esta preparación existe cierta reactividad cruzada con antígenos de *C. jejuni*, aparentemente debido a la presencia de una proteína flagelar de 62 kilodaltones (kd). común al género *Campylobacter* (12,13,14). Recientemente, Newell y cols.(15) informaron que la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra la ureasa, que es una enzima producida en grandes cantidades por *H. pylori*, es altamente específica aun cuando no es muy sensible. Esta información fue corroborada posteriormente por Evans y cols.(16), quienes empleando un antígeno que contiene otras proteínas de menor peso molecular que la ureasa logran mayor sensibilidad de la prueba.

En estudios realizados en diferentes animales de experimentación se han encontrado estructuras espirales en la mucosa gástrica; sin embargo, existen diferencias entre estos microorganismos y *H. pylori* que deben mencionarse.

Los microorganismos encontrados en mucosa gástrica de perros y gatos corresponden a verdaderas espiroquetas cuyo cultivo no había sido posible (17). En noviembre de 1988 Adrian Lee y cols.(18) informaron del aislamiento de estos microorganismos de la mucosa gástrica de 5 gatos adultos, que aun cuando comparten características bioquímicas con *H. pylori* muy relevantes como la producción de ureasa, son estructuralmente diferentes tanto por el tamaño como por el número y localización de los flagelos, además, se desconoce si son capaces de infectar al humano.

Los microorganismos aislados en mucosa gástrica de otros animales (cerdos, primates y hurones) forman, junto con los aislados en mucosa gástrica de humanos, lo que se denomina el

grupo de organismos gástricos similares a *Campylobacter* (GCLO por sus siglas en inglés), que incluye, además de los ya mencionados, a dos tipos diferentes aislados de mucosa gástrica de humanos: el GCLO-1 que antiguamente se conocía con el nombre de *Campylobacter pylori* y que, para evitar confusiones así como para clasificarlo en un género más apropiado a sus características, en la nueva taxonomía se le llama *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, Hp) (19); y el GCLO-2 que tiene diferencias bioquímicas importantes y que no se asocia a enfermedad ácido péptica (24).

La tabla I muestra los diferentes patrones bioquímicos de estos microorganismos; en ella se aprecia que los microorganismos aislados en primates y cerdos son similares a *H. pylori*. Además, se ha demostrado que el patrón electroforético de las proteínas en geles de poliacrilamida es similar y al reaccionar estas proteínas con el suero de pacientes infectados con *H. pylori* mediante técnicas de electroinmunotransferencia, cerca del 80% de las bandas proteicas de microorganismos obtenidos de cerdo, y de primates se comparten, no así con las proteínas de los microorganismos obtenidos de hurones (22).

Estudios en modelos animales experimentales (ratones, ratas, conejos, cuyos y ratas libres de gérmenes), han demostrado que además del humano, sólo los lechones (25), los primates (26), y los perros (27) son susceptibles de infectarse por *H. pylori*, reproduciéndose en ellos, un cuadro histológico similar al del humano con gastritis.

Recientemente, Berkowicz y cols.(28), en un estudio de transmisión realizado con sueros de pacientes internados en una institución para retrasados mentales, encontraron una alta seroprevalencia de anticuerpos contra *H. pylori* y sugieren la posible transmisión de *Helicobacter pylori* de persona a persona; sin embargo, no analizan otros factores a los que definitivamente estas personas estaban expuestas. En otro estudio con las mismas

Tabla 1. Características bioquímicas de los Organismos Gástricos Similares a *Campylobacter* (GCLO).

Crecimiento óptimo	Oxidasa y Catalasa	Hidrólisis del hipurato	Reducción de Nitratos	Fosfatasa Alcalina	Ureasa	A.G.T.	Ac. Nalidixico	Galactosa
<i>H. pylori</i> 37°	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO de Cerdo 37°	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO de Primates 37°	+	-	-	+	+	+	R	S
GCLO-2 37°	+	+	-	-	-	ND	R	S
GCLO de Hurones ND	+	-	+	+	+	+	S	R
<i>C. jejuni</i> 42°	+	+	+	-	-	-	S	R

* Macacus Rhesus y Macaca Nemestrina

(Tomada de 17,21,22,23)

ND = No determinado

A.G.T. = Alfa glutamyl-aminopeptidasa.

R = Resistente

S = Sensible.

limitantes, en el que se encuentran títulos elevados de anticuerpos en los familiares de pacientes con *H. pylori* en mucosa gástrica se sugiere también la transmisión de persona a persona(29). Recientemente Vaira y cols.(30) informaron que los niveles de anticuerpos contra *H. pylori* son significativamente más elevados en trabajadores de rastros al compararlos con sus controles (empleados oficinistas), no encontrando diferencia en los títulos de anticuerpos contra *C. jejuni* entre los diferentes grupos de personas. Sin embargo, este estudio de Vaira fue ampliamente criticado, por no mostrar la validación de la detección de anticuerpos como prueba diagnóstica, así como por emplear en ella a la bacteria completa como antígeno de captura, lo cual permite una mayor reactividad cruzada con los anticuerpos contra antígenos de *C. jejuni* (31).

Dado que existe gran similitud en las características bioquímicas de las cepas de *H. pylori* aisladas en cerdos; primates y humanos, se sugiere que el reservorio y los mecanismos de transmisión en el cerdo y los primates, también sean similares; en cambio, en el humano, dado que el cerdo es una fuente importante de alimento, es posible que este juegue un papel relevante como eslabón en la cadena de transmisión; por lo tanto pensamos que debe investigarse esta posibilidad, así como la de otras fuentes de infección por *H. pylori*.

La inquietud por investigar esta posibilidad, nos llevó a realizar algunos experimentos con objeto de estandarizar algunas de los métodos necesarios para iniciar la línea de investigación en *H. pylori* en el departamento de Infectología del INNSZ.

Experiencia en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Aislamientos Clínicos

Con objeto de estandarizar el aislamiento y conservación de *H. pylori*, se tomaron biopsias de mucosa antral a 10 pacientes con enfermedad ácido péptica (gastritis y/o úlcera) diagnosticada por endoscopia y se tomo además, sangre periférica de cada paciente para detección de anticuerpos contra este microorganismo.

La tabla II muestra los resultados de estos pacientes, utilizándose diferentes técnicas y medios de cultivo para aislar *H. pylori* de las biopsias de mucosa antral; las técnicas y los medios de cultivo se modificaron para obtener el óptimo aislamiento y detección del microorganismo por cultivo y microscopía; un ejemplo de estas modificaciones es demostrable en las figuras 1, 2 y 3 en donde se aprecia que la tinción Warthin-Starry ya sea del corte histológico (fig. 1) o de la impronta (fig. 2) es más útil que el gram (fig. 3) del homogeneizado de la biopsia. El cultivo de material aspirado del duodeno, fue descartado por ser más susceptible de contaminarse y de pobre utilidad para el aislamiento de *H. pylori*.

De las 10 cepas de *H. pylori* aisladas en este estudio piloto, los problemas de contaminación y dificultades para proporcionar el ambiente necesario para su cultivo ocasionó la pérdida de 5 cepas (cepas 4,7,8,9 y 10) y las cepas restantes (cepas 1,2,3,5, y 6) se encuentran almacenadas en congelación a -70 C.

Con base en la experiencia obtenida en el estudio piloto, se diseñó el flujograma que se muestra en la figura 4.

Tabla 2. Resultado del la biopsia de mucosa gástrica de 10 pacientes (estudio piloto).

Sexo	Dx. Endoscópico	Dx Histológico	Ureasa	Gram	W-S	Cultivo	
1	Masc.	Gastritis difusa	-----	+ 24 h.	+	+	GC-3 d.
2	Masc.	Ulceras en fundus Gastritis aguda	Gastritis Ag. y Cr.	+ 1 h.	-	+	BHI-6d. GC-3 d.
3	Masc.	Gastritis erosiva	Gastritis Ag. y Cr.	+ 1 h	+	+	BHI-3d
4	Masc.	Gastritis difusa	Gastritis Ag. y Cr.	+ 1 h	+	+	GC-3 d
5	Fem.	Gastroduodenitis	Gastritis Crónica	- 24 h	+	+	Fea GC 3d.
6	Fem.	Gastritis reflujo gastroesofágico	Gastritis crónica	+ 24 h	-	+	Fea 3d
7	Masc.	Ulcera prepilórica	Gastritis	+ 4 h	+	+	Fea 3d
8	Fem.	Gastritis leve	Gastritis leve	- 24 h	+	-	Muy escaso
9	Masc.	Gastroduodenitis	Gastritis	+ 24 h	+	-	GC 3d
10	Fem	Gastroduodenitis	Gastritis	+ 24 h	+	+	GC 3d.

Dx : Diagnóstico
 Ag : Aguda
 Cr : Crónica
 W-S: Tinción de Warthin-Starry
 d : Días de incubación.

GC : Agar G.C. (Bioxon)
 Fea: Feniletilalcohol(Merk)
 BHI: Agar BHI (Bioxon)



Figura 1. Corte
histológico,
biopsia de
mucosa antral.
Tinción:
Warthin-Starry
(100X).

Figura 2.
Impronta de la
biopsia de
mucosa antral.
Tinción:
Warthin-Starry
(100X).

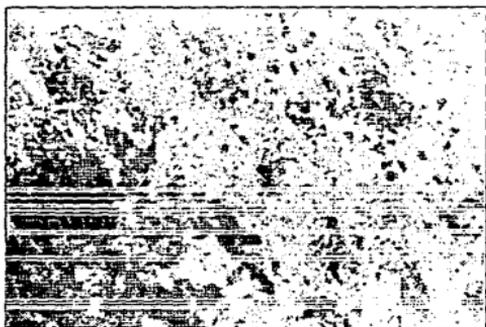
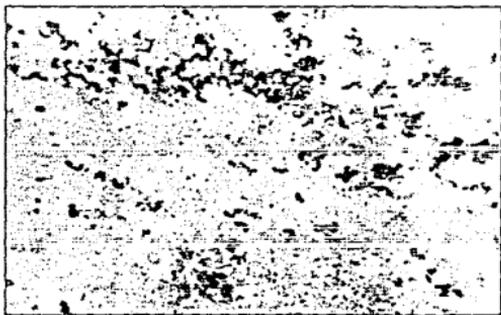


Figura 3.
Homogenizado de
la biopsia de
mucosa antral.
Tinción: Gram
(100X).

Validación del ELISA

Paciente para Endoscopia

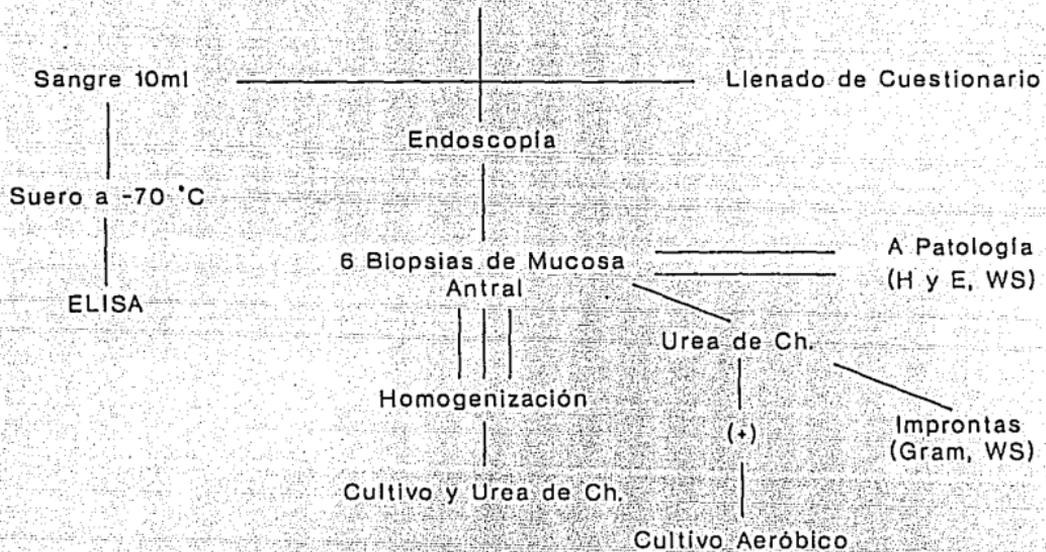


Figura 4 Diagrama de flujo para el aislamiento de *H. pylori* de mucosas gástricas.

Condiciones Optimas de Crecimiento

La cepa control de *H. pylori* CCUG 15818 gentilmente donada por E. Falsen de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, fue utilizada para la valoración de diferentes medios de cultivo para crecimiento masivo de *H. pylori*. La figura 5 muestra las curvas de crecimiento de este microorganismo en 3 medios de cultivo diferentes, expresadas en logaritmo de unidades de absorbancia contra tiempo, y se muestra que bajo las mismas condiciones (inóculo, suplemento, incubación y ambiente) el caldo de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) permite un mayor crecimiento en menor tiempo que el caldo soya tripticaseína o que el caldo Brucella.

Preparación del Antígeno

Una vez obtenido el cultivo masivo de *H. pylori* (cepa CCUG 15818) se extrajeron proteínas de membrana externa con glicina ácida mediante la técnica descrita por McCoy y cols. (32), para emplearlas como antígeno en la detección de anticuerpos por el método de ELISA indirecto.

Inmunización del conejo

La obtención de suero hiperinmune contra *H. pylori* se realizó mediante la inoculación por multipunción de dos conejos Nueva Zelanda, con 25 mcgr. de *H. pylori* (bacteria completa) cada semana durante 4 semanas, al termino de las cuales se le sacrificó, se exanguinó y extrajo el suero, el cual se almacenó a -70.0 C.

Curvas de Crecimiento

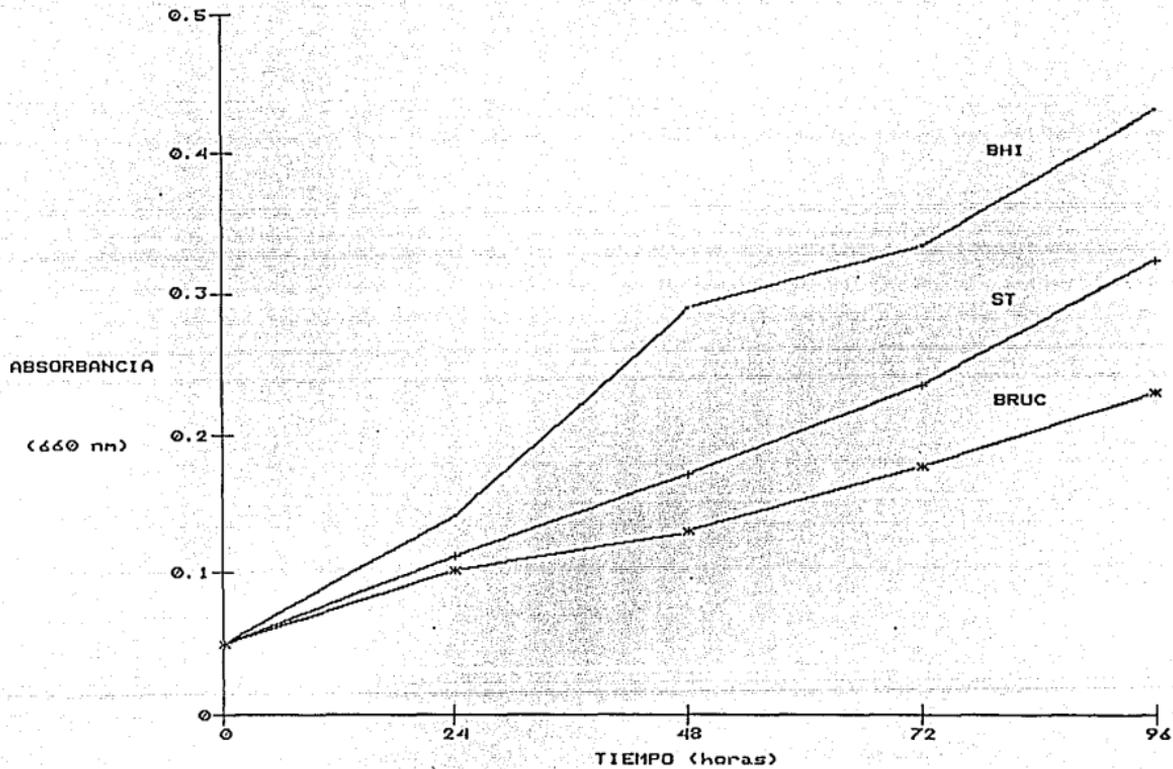


Figura 5

Estandarización de ELISA

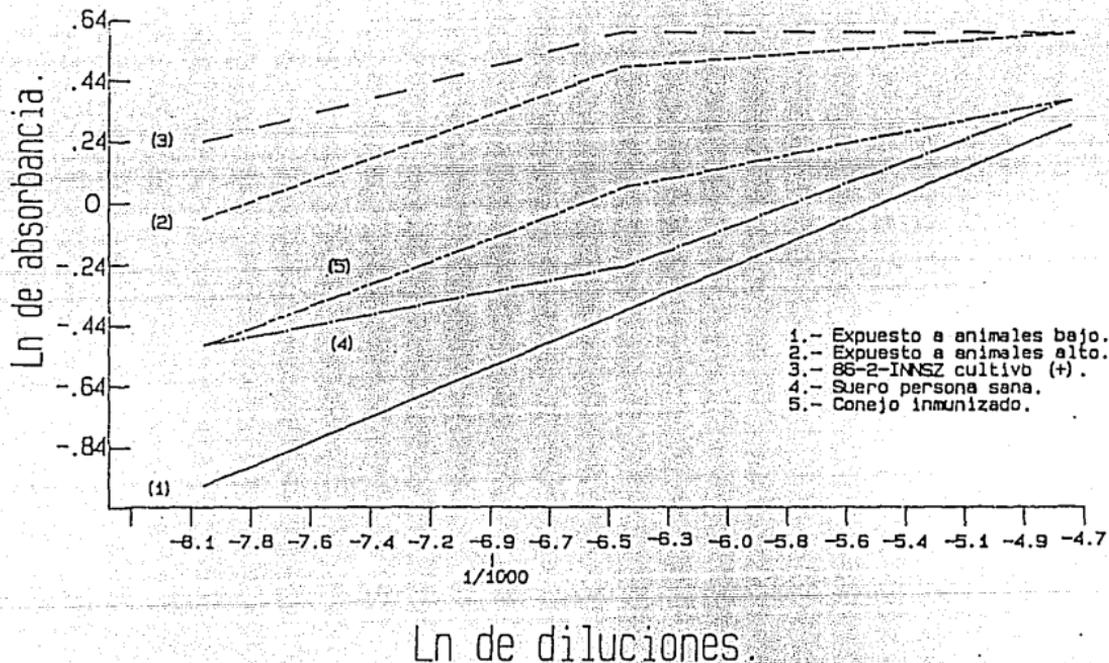


Figura 6. Curvas de estandarización para la detección de anticuerpos contra *H. pylori* en las que se aprecia que la dilución óptima del suero es de 1:1000.

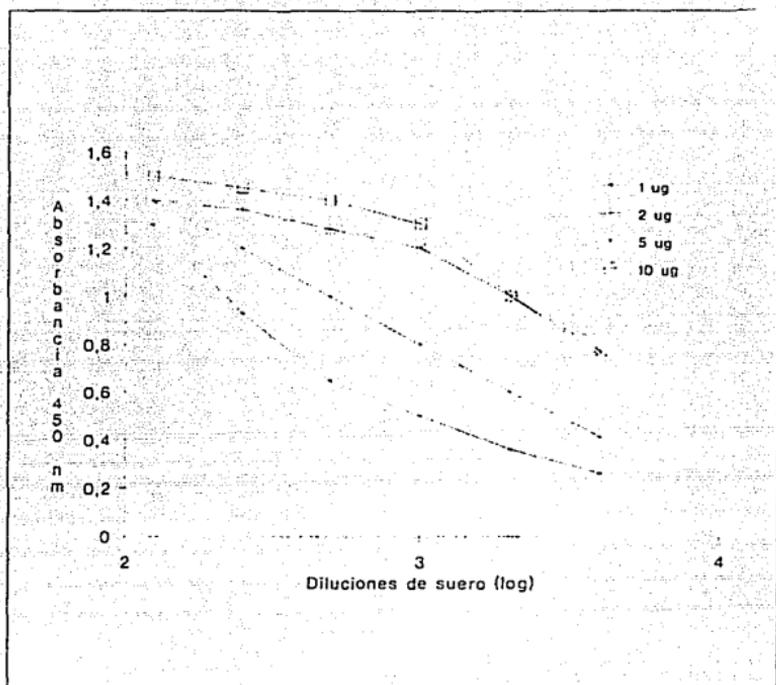


Figura 7. Curvas de estandarización para la detección de anticuerpos contra *H. pylori* en las que se aprecia que la concentración óptima de antígeno es de 5 ug/ml.

Estandarización del método de ELISA para determinación de anticuerpos séricos contra *H. pylori*.

Para estandarizar la técnica de detección de anticuerpos específicos en suero contra *H. pylori*, se probaron los siguientes sueros:

- a) Suero de un paciente con gastritis crónica y cultivo positivo para *H. pylori* en mucosa gástrica (control positivo).
- b) Suero hiperinmune de conejo contra *H. pylori* (control positivo).
- c) Suero de una persona sana (control negativo).
- d) Dos sueros de trabajadores de un rastro (sueros problema).

El ensayo de ELISA indirecto se realizó en microplacas Inmulon II (Dynatech Laboratories Inc.). Con base en la experiencia obtenida en la detección de anticuerpos contra *C. jejuni* se sensibilizaron las microplacas con el antígeno previamente obtenido, a una concentración de 1 mcgr por pozo. Previo bloqueo de los sitios de adsorción inespecífica con albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma Chemical co. St. Louis MO.) y la eliminación de la ASB con buffer salino de fosfatos (PBS), se aplicaron por duplicado los sueros a diferentes diluciones. El conjugado empleado fue antigamaglobulinas totales (anti-humano o anti-conejo [Dako Co. Denmark] según el caso) unidas a una peroxidasa y una vez adicionado el sustrato (Ortofenilendiamina más peróxido de hidrógeno) la reacción se evaluó a los 15 min. a 450 nm. Las curvas del logaritmo de la dilución contra la absorbancia de esta estandarización se muestran en la figura 6, la dilución óptima de los sueros fue de 1:1000 si se emplea una concentración de antígeno de 1 mcgr por pozo.

La optimización del empleo de antígeno, se efectuó evaluando, en forma de tablero de ajedrez, diferentes diluciones del suero positivo con diferentes concentraciones de antígeno. La figura 7 muestra las curvas de esta estandarización, de la cual se dedujo que con una concentración de 5 mcg/ml de antígeno se obtiene una sensibilización adecuada de la microplaca de ELISA.

Exposición a animales y sus productos como un factor de riesgo para infección por *H. pylori*.

Con objeto de determinar si personas con exposición constante y estrecha a animales y sus productos presentan títulos de anticuerpos contra *H. pylori* mayores que personas sin este tipo de exposición, se realizó un estudio piloto en el cual se analizaron los sueros de 25 personas trabajadoras de un rastro, y se compararon sus títulos de anticuerpos contra *H. pylori*, con 25 sueros de pacientes de INNSZ tomados para los exámenes rutinarios de ingreso al instituto; se excluyeron en esta valoración a aquellos pacientes que presentaron VDRL (+) o antecedentes de contacto estrecho con animales o su productos. Además, para determinar si los títulos de anticuerpos contra *C. jejuni* influyen en el análisis de la detección de anticuerpos contra *H. pylori*, determinamos en todos los sueros los títulos de anticuerpos contra *C. jejuni*. Para el análisis de los resultados se determinaron las medias, desviaciones estándar y *t* de Student, estos resultados se muestran en la Tabla III y de ellos concluimos que:

1.- Los títulos de anticuerpos Hp-específicos de las personas del rastro estudiadas, son significativamente superiores a los de las personas no expuestas a animales, y poseen 13.2 veces mayor riesgo de tener anticuerpos Hp-específicos que las personas no expuestas.

Tabla 3. Resultados de la detección de anticuerpos contra *Helicobacter pylori* por el método de ELISA en las personas trabajadoras de un rastro general en comparación con los pacientes de INNSZ. (Estudio piloto).

Grupo etario	Rastro		INNSZ		P'
	n	D.O. ($\bar{X} \pm D.E.$)	n	D.O. ($\bar{X} \pm D.E.$)	
< 30 años	7	1.03 ± 0.47	5	0.608 ± 0.09	>.05
30 a 40 años	12	1.19 ± .026	6	0.809 ± 0.17	<.01
> 40 años	5	0.80 ± .016	12	0.713 ± 0.20	>.1
Total	25	1.03 ± 0.33	25	0.073 ± 0.20	<.001

t de Student.

2.- La diferencia en los títulos de anticuerpos contra *H. pylori* persistió siendo mayor en las personas expuestas a animales al compararlos por grupos de edad; aunque solamente en el grupo de 30 a 40 años la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < .05$).

3.- No existió una diferencia estadísticamente significativa entre los títulos de anticuerpos contra *C. jejuni* de las personas expuestas y las no expuestas a animales.

4.- El índice de correlación de las absorbancias obtenidas del ELISA de los sueros de personas del rastro para la determinación de anticuerpos contra *H. pylori* y contra *C. jejuni*, fue de 0.022, lo que indica que si existe reactividad cruzada entre anticuerpos contra *Cj* y *Hp* esta es irrelevante.

5.- Es muy posible que la transmisión de *H. pylori* al humano, sea a través de productos animales.

6.- Por lo que es de singular importancia la realización de más estudios dirigidos a determinar el papel del cerdo en la fisiopatología de enfermedad ácido péptica asociada a *H. pylori*.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

H. pylori es un microorganismo aislado de mucosa gástrica en pacientes con enfermedad ácido péptica con una frecuencia que ha llegado a hasta el 100% de los casos (7). La relación causa efecto, ha sido demostrada en los estudios efectuados en modelos experimentales (25,26,27); hasta el momento se desconocen las fuentes de infección y mecanismos de transmisión al humano, así como su papel en la fisiopatogenia de enfermedad ácido péptica.

Las teorías fisopatogénicas clásicas que no incluyen a *H. pylori* tienen muchas deficiencias para explicar los diferentes eventos que suceden en esta enfermedad; a excepción de aquellas entidades clínicas de gastritis y/o úlcera que tienen una causa bien definida, como es en el Síndrome de Zollinger - Ellison, o en la gastritis atrófica autoinmune, o bien en la gastritis erosiva.

En la actualidad la única forma de realizar el diagnóstico de enfermedad ácido péptica asociada a *H. pylori* es la endoscopia y cultivo de la biopsia de mucosa gástrica en medios selectivos, pues aunque se ha demostrado que la detección de anticuerpos por el método de ELISA es bastante específica (97%) y aceptablemente sensible (81%) (7), esta prueba no se encuentra disponible y tiene reactividad cruzada con *C. jejuni* (26), esto último puede afectar su especificidad dependiendo de la prevalencia de infección por *C. jejuni* en la población en que se emplea. Es necesario corroborar los resultados descritos por Goodwin (7) y por Newell (13) en nuestra población, que es endémica para infección por *C. jejuni*; para contar con un método de diagnóstico no invasivo confiable y con un instrumento para determinar la relación entre la exposición al cerdo y sus productos con la presencia de anticuerpos contra *H. pylori*; ya que los resultados en la detección de anticuerpos Hp-específicos en los sueros de las personas del rastro y a los resultados de los estudios en modelos experimentales, sugieren que el cerdo juegue un papel muy importante como reservorio en los

mecanismos de transmisión al humano. Si esto último es cierto, se podrán implementar medidas para evitar la transmisión de *H. pylori* al humano, lo que dará por resultado la disminución de la incidencia de enfermedad ácido péptica asociada a *H. pylori*.

H i p ó t e s i s

H. pylori se asocia a la mayoría de los casos de enfermedad ácido péptica, y esta asociación puede determinarse indirectamente mediante la detección de anticuerpos séricos específicos; por la técnica de ELISA, con un rango de confiabilidad aceptable.

El cerdo es uno de los reservorios naturales de *H. pylori* y la exposición a este animal y/o a sus productos constituye un factor de riesgo para infección en el humano.

O b j e t i v o s

1.- Determinar la frecuencia de enfermedad ácido péptica asociada a infección por *H. pylori* en pacientes sometidos a endoscopia en el INNSZ.

2.- Validar la detección de anticuerpos séricos específicos contra antígenos de *H. pylori* por el método de ELISA indirecto, como una prueba diagnóstica de infección por *H. pylori*.

3.- Determinar la frecuencia de infección por *H. pylori* en una muestra de cerdos para consumo en la Cd. de México.

4.- Determinar si la exposición al cerdo y/o a sus productos, constituye un factor de riesgo para infección por *H. pylori* en el humano.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio:

Esta investigación consta de tres fases que interaccionan entre si para lograr los objetivos: una es observacional, otra es un estudio comparativo, y la tercera es un estudio de casos y controles

Fase I. Estudio descriptivo en que se determinó la prevalencia de infección por *H. pylori* (Hp.) en un grupo de cerdos para consumo humano.

Fase II. Validación de la detección de anticuerpos por el método de ELISA como prueba de infección por Hp.

Fase III. Estudio de casos y controles para determinar factores de riesgo mediante la detección de anticuerpos contra Hp. en grupos de personas con diferentes tipos y grados de exposición al cerdo y/o sus productos.

Fase I:

Para determinar la prevalencia de infección por Hp. en cerdos, en un rastro privado localizado en la periferia de la Cd. de México, se tomaron porciones de mucosa gástrica de 40 cerdos seleccionados en forma aleatoria en tres días diferentes. Las muestras se procesaron para cultivo en medios selectivos para *H. pylori*, tinción de Warthin-Starry e inmunofluorescencia indirecta (32); además se les tomó una muestra de sangre para detección de anticuerpos Hp-específicos por el método de ELISA. Se consideró como cerdo infectado cuando cultivo o al menos dos de los tres métodos diagnósticos alternativos fueron positivos.

Fase II:

La validación de la detección de anticuerpos Hp-específicos se efectuó en un grupo de pacientes que fueron sometidos a panendoscopia de vías digestivas superiores con fines diagnósticos y/o terapéuticos, a quienes previo consentimiento verbal, se les tomaron 6 porciones de mucosa antral para diagnóstico histológico y cultivo en medios selectivos para *H. pylori* (estándar de oro), y 10 ml. de sangre venosa periférica para determinación de anticuerpos contra este microorganismo (indicador a validar).

Fase III:

Para determinar si existe asociación entre infección por Hp. y exposición al cerdo y/o sus productos, a un grupo de personas con diferentes tipos de exposición, se les tomaron 10 ml. de sangre venosa periférica, y se determinó la asociación entre dicha exposición y los títulos de anticuerpos contra *H. pylori*.

Todas las personas incluidas en el estudio fueron interrogadas sobre sintomatología ácido péptica, contacto con animales vivos, contacto con productos animales y consumo de productos animales y vegetales mediante un cuestionario elaborado exprofeso (anexo), el cual además incluyó reactivos para determinar el estrato socioeconómico. El cuestionario, previas modificaciones del original, se consideró mediante consenso con la validez suficiente para lograr los objetivos.

Selección de Poblaciones :

Fase I. Se incluyeron 40 cerdos seleccionados en forma aleatoria en tres días diferentes en un rastro privado dedicado exclusivamente a la matanza de cerdos, los cerdos sacrificados en este rastro provenían de diferentes partes del país, tanto de granjas porcicultoras como de la crianza de patio trasero.

Fase II. Para la validación de la detección de anticuerpos, se incluyeron a pacientes que con fines diagnósticos y/o terapéuticos fueran a ser sometidos a panendoscopia de vías digestivas superiores en el servicio de endoscopia del INNSZ. La muestra mínima calculada para este grupo fue de 80 pacientes con enfermedad ácido péptica asociada a *H. pylori* 80 pacientes sin ella. Esta cifra se estimó en base a que esperamos encontrar una sensibilidad de la prueba del 95% y que deseamos tener una precisión de ± 0.05 alrededor de dicha cifra. Utilizando la fórmula de 95% Intervalos de Confianza alrededor de una proporción $IC\ 95\% = 1.96 \sqrt{\frac{P \times Q}{n}}$, tenemos que $n = \frac{P \times Q}{.05^2 / 1.96^2} = \frac{.95 \times .05}{.0009370} = 50$ sin embargo tomando en cuenta una posible pérdida de 30% estimamos conveniente contar con 80 pacientes por grupo.

Fase III. Para determinar si el cerdo constituye un factor de riesgo para infección por *Hp* en el humano, además de las personas incluidas en la Fase II de este estudio se tomó un grupo de personas con diferentes tipos de exposición al cerdo, se incluyeron a unas personas que tuvieran contacto con cerdos vivos (veterinarios, porcicultores, etc.), otras que tuvieran contacto directo con productos del cerdo (trabajadores del rastro, tablajeros, etc), otras sin exposición a animales o sus productos, pero que consumieran productos del cerdo con frecuencia variable (población general), y personas que no tuvieran contacto con cerdos y que no consumieran sus productos (vegetarianos.). Dado que hasta el momento no existen datos sobre la prevalencia de anticuerpos contra *H. pylori* en personas con diferentes grados de exposición al cerdo, no fue posible estimar la muestra mínima a estudiar. Las personas que se incluyeron en este grupo, fueron captadas en granjas porcicultoras, rastros y banco de sangre del INNSZ, y los vegetarianos fueron captados mediante un anuncio en el periódico.

Criterios de Elegibilidad :

Criterios de inclusión: pacientes para endoscopia y biopsia.

- a) Pacientes del INNSZ mayores de 18 años y menores de 75 años.
- b) Que fueran a ser sometidos a panendoscopia con fines diagnósticos y/o terapéuticos en el servicio de endoscopia del INNSZ.
- c) Que no hubiesen recibido antibióticos o sales de bismuto en la semana previa a la realización del procedimiento endoscópico.
- d) Que no recibieran medicación o tuviesen algún padecimiento capaz de producir inmunosupresión.

Criterios de exclusión : Pacientes para endoscopia y biopsia.

- a) Pacientes con hipertensión portal o diatesis hemorrágica
- b) Pacientes que por manejo quirúrgico carecieran de antro gástrico.
- c) Pacientes sin ayuno o con hemorragia de tubo digestivo alto reciente.

Criterios de inclusión: personas expuestas al cerdo o a sus productos:

- a) Personas mayores de 18 años y menores de 75 años.
- b) Personas que accedieran a ingresar al estudio que implica un cuestionario por escrito y la donación de 10 ml. de sangre.
- c) Personas sin medicación o enfermedad inmunosupresora.

Estimación de factores de confusión.

En el cuestionario elaborado exprofeso (Anexo) para determinar el grado de exposición al cerdo y sus productos se incluyó un grupo de variables consideradas con posibles factores de confusión. La comparabilidad de estas variables entre los grupos formados por los diferentes tipos de exposición al cerdo y entre los pacientes con ELISA positivo para *H. pylori*, con los pacientes con ELISA negativo, se estimó y ajustó en el análisis efectuado para aquellas que mostraron un desbalance importante.

Las variables incluidas fueron :1) Edad: por ser una variable que en estudios previos a mostrado tener asociación con la infección por *H. pylori* (37). 2) Sexo: Por tener efecto sobre la tipos de ocupación de las personas. 3) Lugar de residencia y estrato socioeconómico: por ser variables que muy frecuentemente influyen en la prevalencia de las enfermedades infecciosas.

Análisis de los datos:

Fase I. Para la descripción de la infección en el grupo de

cerdos se emplearon proporciones.

Fase II. El estudio de validación de la serología se analizó mediante el cálculo de los valores de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. La significancia estadística de la tabla de contingencia de 2 x 2 se analizó mediante la prueba de χ^2 corregida por Yates.

Para el control de calidad de la prueba de ELISA, se calcularon los coeficientes de variación promedio intra e interensayo en los duplicados de las pruebas de los pacientes sometidos a panendoscopia y biopsia.

Fase III. El análisis de la exposición al cerdo como factor de riesgo, se efectuó mediante el cálculo de la Razón de Momios mediante regresión logística uni y multivariada (STATA), en esta última, se incluyeron solo aquellas variables que en el análisis univariado, mostraron un nivel de significancia de $p < 0.10$.

La comparación de los índices de absorbancia entre los grupos, se efectuó mediante ANOVA de una y de dos vías, y t de Student, sin embargo, dado que la distribución de los datos fue francamente no Gausiana y las desviaciones estándar de las medias fueron muy amplias, también se efectuaron las comparaciones mediante análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney empleando la modificación de Bonferroni para comparaciones múltiples). Los ajustes para los factores de confusión detectados, se efectuaron en la regresión logística.

Definiciones :

Helicobacter pylori : Bacilo gram negativo de estructura curva o espiral con motilidad característica, oxidasa (+), catalasa (+), ureasa (+) y resistente a vancomicina, trimetoprim y polimixina, que no crece en aerobiosis y se aísla de mucosa

gástrica de humanos o cerdos, en un ambiente microaerofílico estricto.

Gastritis: Infiltración de la mucosa gástrica por células inflamatorias (polimorfonucleares y/o mononucleares).

Clasificación : (Wyatt y Dixon [33]). (Tabla IV)

Gastritis tipo A = Inflamación de la mucosa gástrica de etiología autoinmune en la que predomina la atrofia y la metaplasia intestinal, y frecuentemente se asocia a anemia perniciosa.

Gastritis tipo B = Inflamación de la mucosa gástrica de etiología posiblemente infecciosa en la que predominan los infiltrados inflamatorios de tipo mononuclear y polimorfonuclear, el epitelio se encuentra deformado y existe disminución de la mucina intracelular.

Gastritis por reflujo = Inflamación de la mucosa gástrica secundaria a una lesión de origen químico, en la que predomina el edema sobre los infiltrados inflamatorios.

Gastritis Varioliforme (erosiva crónica) = Inflamación de la mucosa gástrica en la que la fibrosis es la característica predominante, y se acompaña de hiperplasia foveolar, además llama la atención la escasa reacción inflamatoria que se observa.

Gastritis eosinofílica = Inflamación de la mucosa gástrica caracterizada por infiltración de eosinófilos, se asocia a procesos alérgicos y/o parasitosis.

Gastritis granulomatosa = Inflamación de la mucosa gástrica en la que predominan los granulomas, y que es habitualmente secundaria a procesos granulomatosos generalizados.

Clasificación de Gastritis Crónica

Clasificación	Etiología
Gastritis crónica tipo A	Autoinmune
Gastritis crónica tipo B	Bacteriana (<i>H. pylori</i>)
Gastritis química	Reflujo, Zollinger-Ellison
Gastritis linfocítica	Reacción atípica a <i>H. pylori</i>
Gastritis Eosinofílica	Alérgica
Gastritis granulomatosa aislada	Idiopática

Intensidad de la gastritis: La intensidad de la gastritis se consideró como Leve, Moderada o Severa en base a la intensidad del infiltrado inflamatorio, el número relativo de polimorfonucleares y la presencia o ausencia de ulceración esfacelo u otros cambios en el epitelio superficial vistos a 100X.

Intensidad de infiltrado inflamatorio: El grado de infiltración polimorfonuclear, eosinofílico o mononuclear se caracterizó en escaso, moderado o intenso en base a la cantidad de estas células y su presencia intraepitelial.

Infección por *Helicobacter pylori* en el humano: Cultivo de biopsia de mucosa antral positiva para Hp. o tinción de Warthin-Starry positivas en la biopsia de mucosa antral.

Infección por *H. pylori* en cerdo: Cultivo de biopsia de mucosa gástrica positivo o al menos dos de las siguientes pruebas positivas : Tinción de Warthin-Starry, Detección de anticuerpos séricos Hp-específicos e Inmunofluorescencia indirecta.

Infección por *H. pylori* en casos y controles: Índice de absorbancia en la detección de anticuerpos Hp-específicos, superior a el promedio más dos desviaciones estándar de los valores obtenidos por el grupo de pacientes negativos por cultivo, ureasa e histología (tinción de Warthin-Starry).

Ureasa positiva = Cambio de coloración del medio de Christensen de naranja a rosa o morado en menos de 24 hrs que no sea atribuible a otro organismo productor de ureasa.

Tinción de Warthin-Starry positiva = Observación directa con el objetivo de 100X (inmersión) de 2 o más estructuras bacilares curvas o espirilares de color café oscuro en 2 o más campos del corte histológico de la biopsia de mucosa antral.

Estándar de Oro para hacer diagnóstico de enfermedad ácido péptica asociada a *Helicobacter pylori* por detección de anticuerpos séricos: Cultivo positivo de *H. pylori* de la biopsia de mucosa antral y/o la tinción de Warthin-Starry positiva.

Colección y Procesamiento de las Muestras.

Biopsia de mucosa gástrica:

Durante el procedimiento endoscópico se tomaron 6 porciones biopsia de mucosa antral; las primeras 2 fueron depositadas en 0.5 ml de solución buffer salino de fosfatos (PBS) estéril a 4°C, para ser transportadas al laboratorio de investigación de infectología; la segunda porción biopsia fue depositada en 0.5 ml de caldo urea de Christensen y las últimas dos se colocaron sobre 1 cm² de papel filtro el cual se depositó en un frasco con formalina al 10% y se transportó al servicio de Patología.

Las primeras 2 porciones biopsia se homogeneizaron en la solución de transporte y con la suspensión formada se inocularon dos cajas de agar BHI suplementado con polienriquecimiento al 1% (Bioxon ,México), sangre de caballo al 7%, vancomicina 6 mg/Lt polimixina 5 mg/Lt, Anfotericina 4 mg/Lt, Trimetoprim 20 mg/Lt y se inoculó además, 1 tubo con 8 ml de BHI semisólido con el mismo suplemento, y un agar BHI igualmente suplementado pero sólo con anfotericina y vancomicina como inhibidores. Los medios inoculados fueron incubados a 37°C. en ambiente microaerofílico (CO₂ 10%, O₂ 5% y N₂ 85%). Los cultivos se revisaron a los 3,5 y 7 días. En el caso de existir crecimiento se determinó si se trataba de *H. pylori*; tanto por morfología colonial (Colonias grises o translúcidas de 1 a 2 mm de diámetro) como por morfología microscópica, y se determinó la presencia de oxidasa y ureasa. Una vez aislado e identificado el microorganismo se procedió a cultivarlo en forma masiva en medios sólidos para posteriormente suspenderlo en caldo BHI con glicerol al 15% , en viales de 2 ml, para su almacenamiento a -70°C.

La urea de Christensen se interpretó a la hora, a las 4, 8 y 24 horas, posterior a esto, con objeto de determinar la presencia de otros microorganismos productores de ureasa, se inoculó una caja de agar sangre de carnero.

Las porciones biopsia en patología fueron incluidas en una sola cápsula, una preparación se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) y otra con la técnica de Warthin-Starry. El diagnóstico histopatológico fue emitido por el patólogo a cargo de las piezas quirúrgicas en forma ciega, es decir, sin conocer los datos clínicos, ni bacteriológicos del caso.

Almacenamiento de Sueros:

A todos los pacientes se les tomaron 10 ml de sangre periférica, esta se centrifugó a 4000 RPM durante 15 min, se obtuvo el suero y se guardó en 5 alícuotas de 500 ul y una de 1 ml a -70°C hasta su procesamiento para detección de anticuerpos contra *H. pylori*.

Detección de anticuerpos contra *H. pylori*.

Preparación de antígeno:

Se cultivó en forma masiva la cepa CCUG 15818 en caldo BHI con suero de caballo al 10% hasta obtener 1.5 gramos de bacterias (Peso mojado) pesadas inmediatamente después de haber centrifugado el caldo de cultivo durante 20 min a 14000 RPM; la pureza de los paquetes celulares fue confirmada mediante tinción de gram y cultivo en aerobiosis. Dado que no es técnicamente posible obtener los 1.5 gramos de bacterias en un solo cultivo por la cantidad de medio que se requiere, cultivamos de 1 a 2 lts de caldo BHI por

semana con un rendimiento aproximado de 1 a 3 gr de bacterias por litro de caldo de cultivo.

Una vez obtenidos los 1.5 gramos de bacterias, se efectuaron 2 lavados con agua estéril, centrifugando cada vez 20 minutos a 14000 RPM.

Se determinó nuevamente el peso total de las bacterias y se expuso a la glicina ácida Ph 2.2 a una concentración de 25 ml por gramo de bacterias, se mantuvo la suspensión en agitación durante 45 minutos, se centrifugó nuevamente durante 20 min a 14000 RPM y el sobrenadante se dializó durante 48 hrs contra agua estéril con una membrana de celulosa con punto de corte de 12 a 14 kilodaltones (Kd), posterior a esto se ultrafiltró la suspensión concentrando a la décima parte del volumen inicial mediante el sistema de Amicon diafiltrado, y se determinó concentración de proteínas por el método de Coomasie, así como el perfil electroforético en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida y se comparó con el obtenido por Newell (13).

Detección de anticuerpos por el método de ELISA.

Se sensibilizaron las microplacas de ELISA con el antígeno obtenido a una concentración de 5mcgr/ml de proteínas, (.5mcgr por pozo) depositando 100ul por pozo se incubó durante toda la noche. Se bloquearon los sitios de adsorción inespecífica con albúmina bovina libre de gamaglobulinas (Sigma Chemical Co. St. Louis MO.) y se aplicaron los sueros a probar con una dilución de 1 a 1000, 200 ul por pozo por duplicado; el control positivo de la prueba fue el suero del paciente de quien aislamos la cepa 86-2 INNSZ y el control negativo fue el suero tomado de un paciente en convalecencia de diarrea por *C. jejuni* (SR63); se lavaron las microplacas con PBS tres veces, y se aplicó el conjugado consistente en antigamaglobulinas totales humanas unidas a una peroxidasa (Dako Co. Denmark) a una dilución de 1:3000 y se incubó

durante 90 minutos, pasados los cuales se lavó con Tris buffer salino (TBS) tres veces y dos veces más con PBS, finalmente se agregó el sustrato y la reacción se leyó a los 45 minutos a 450 nanómetros. Las lecturas de absorbancia se consignaron en una libreta y en el programa de computadora elaborado exprofeso (base de datos del programa Paradox 3).

Los criterios para aceptar o rechazar una microplaca de 96 pozos fueron: que la lectura de absorbancia del control positivo no fuera menor de 0.3 y que esta fuera al menos 3 veces la lectura de absorbancia del control negativo.

Con objeto de hacer comparables las lecturas de absorbancia en el ELISA entre las diferentes microplacas, se efectuó una transformación a un Índice de absorbancia, esta se llevó a cabo mediante una regla de tres, tomando como la unidad a la lectura de absorbancia del suero control positivo en cada placa. El punto de corte para determinar si un índice de absorbancia de un suero dado era positivo o negativo, se estableció tomando el índice de absorbancia correspondiente a la percentila 95 del grupo de pacientes que fueron negativos tanto por cultivo y ureasa como en la tinción de Warthin-Starry. Sin embargo, con objeto de contar con un punto de corte más generalizable y obtener mayor especificidad de la prueba aun a costa de la sensibilidad, el punto de corte establecido para el análisis de la fase III (casos y controles) fue el correspondiente al promedio más dos desviaciones estándar de los índices de absorbancia del grupo de pacientes con todas las pruebas negativas (Cultivo, Warthin-Starry y Ureasa).

Ensayos de inhibición

La determinación de la especificidad de los anticuerpos contra *H. pylori* detectados en el ELISA, se realizó recubriendo las microplacas como se describió anteriormente y posterior al paso de bloqueo de sitios de adsorción inespecífica, se adicionaron

concentraciones conocidas de antígeno libre (0.04 a 30 mcg/ml) de *H. pylori* o de *C. jejuni* (IP 383, INNSZ) según el caso, depositándose 50ul en pozos independientes y por duplicado para cada concentración. Al mismo tiempo y en los mismos pozos, se adicionaron 50 ul de suero con títulos de anticuerpos conocidos contra *H. pylori* o contra *C. jejuni* concentrados 10 veces su título original. Estos sueros fueron: Hiperinmunes de conejo contra *H. pylori* (título final 1:3125) y contra *C. jejuni* (1:5000) y humanos contra *H. pylori* (1:3125) y contra *C. jejuni* (1:3125). Posterior a este paso, el ensayo se continuó en la forma anteriormente descrita.

La prueba competitiva fue interpretada como positiva cuando la inhibición homóloga fue igual o mayor al 50%. El porcentaje de inhibición para cada concentración fue calculado con los promedios de las lecturas de absorbancia de 6 ensayos.

Electroinmunotransferencia.

Electroforesis:

Se determinaron los pesos moleculares de las bandas protéicas contenidas en el antígeno de *H. pylori* y de *C. jejuni* empleado un gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% y una cámara de electroforesis (Miniprotean II Biorad lab. Richmond CA.), el corrimiento electroforético se realizó con un voltaje de 200 mv durante 60 minutos. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 14 a 97 Kd (Low molecular weights, Sigma Chemical CO. St. Louis MO.).

Inmunotransferencia:

Las proteínas de superficie extraídas con glicina ácida tanto

de *H. pylori* como de *C. jejuni* una vez separadas en el gel de poliacrilamida, fueron transferidas al papel de nitrocelulosa mediante un gradiente eléctrico de 100 mv durante 60 min a 4°C en un buffer tris 20mM-glicina (Sigma lab.) 190mM metanol (Merk Laboratories West Germany) al 20% (v/v). Una vez transferidas las proteínas, se cortaron tiras del papel de nitrocelulosa de .5 cm y se bloquearon los sitios de adsorción inespecífica con gelatina al 3% en tris/HCl 10mM durante una hora. Se adicionaron los sueros homólogos y heterólogos tanto de conejo como humanos diluidos en TBS-gelatina al 1% (diluciones 1:50 y 1:25 respectivamente); se incubaron las membranas durante 18 horas y previo lavado por triplicado con TBS se adicionó el conjugado correspondiente (Antigamaglobulinas totales de conejo en cabra, o antigamaglobulinas totales humanas en conejo, unidas a una peroxidasa. Dako Co. Denamark) diluido en gelatina 1% en TBS 1:100 para conejo y 1:250 para humano y se incubó durante 3 horas al terminó de las cuales se efectuó nuevo lavado por triplicado y se adicionó el sustrato (H₂O₂, 4 cloro alfa-naftol en TBS, Bio-Rad lab.) la reacción se detuvo a los 15 minutos con H₂O.

Con objeto de determinar si la detección de anticuerpos contra *H. pylori* no está en relación a los niveles de anticuerpos contra *C. jejuni*, se determinaron niveles de anticuerpos contra ésta bacteria en todos los sueros de las personas incluidas en el estudio.

RESULTADOS .

FASE I: PREVALENCIA DE INFECCION POR *H. pylori* EN CERDOS.

El estudio de la prevalencia de infección por *H. pylori* en cerdos se realizó en 40 cerdos seleccionados aleatoriamente en tres días diferentes en un rastro privado periférico a la Cd. de México. A todos ellos se les tomaron 3 biopsias de mucosa gástrica y 6 ml de sangre venosa. Las biopsias obtenidas, fueron procesadas para cultivo, tinción de Warthin-Starry, detección de ureasa y detección de *H. pylori* por inmunofluorescencia. La sangre obtenida se empleo para la detección de anticuerpos Hp-específicos mediante el ELISA indirecto.

De los 40 cerdos estudiados, en once se obtuvieron al menos dos de la pruebas positivas, lo que representa una prevalencia de infección del 27.5%. Los resultados de estas pruebas alternativas para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, muestran que la tinción de W-S asociada a la detección de anticuerpos Hp-específicos por el método de ELISA presentaron el mayor porcentaje de positividad (12.5%), seguido de la asociación de la tinción de W-S con la inmunofluorescencia (10%) y solamente en el 5% se presentaron las tres pruebas positivas (Tabla 5). El aislamiento de *H. pylori* fue exitoso en una sola de las biopsias y en 17/40 (42.5%) no existió evidencia alguna de infección por este microorganismo.

Tomando solamente la Inmunofluorescencia como método de diagnóstico, por tener una especificidad alta (95%) y se un método directo, la prevalencia de infección por *H. pylori* en cerdos no se altera, siendo esta de 25%.

Es importante mencionar que al momento de tomar las biopsias de mucosa gástrica, el estómago de los cerdos se encontraba altamente contaminado por otros microorganismos e incluso la mayoría de ellos contenían restos alimentarios. Los microorganismos contaminantes más frecuentemente aislados de los cultivos de las biopsias de mucosa gástrica de éstos cerdos fueron

Proteus sp. y *Pseudomonas sp.* La contaminación por estos microorganismos impidió que la detección de ureasa fuera evaluable.

La figura 8 es un ejemplo de las tinciones de Warthin-Starry realizadas en las biopsias de estos cerdos, en ella se aprecian las estructuras espirilares correspondientes a los GCLO y algunas otras estructuras bacterianas contaminantes.

Tabla 5. Prevalencia de infección por *H. pylori* en 40 cerdos de un rastro exclusivo de cerdos.

POSITIVO	n	(%)	PROBABLE POSITIVO	n	(%)
W-S-IFA+ELISA	2	(5)	IFA	4	(10)
W-S-IFA	4	(10)	W-S	4	(10)
W-S+ELISA	5	(12.5)	ELISA	4	(10)
TOTAL	11	(27.5)		12	(30)

Todas las pruebas negativas = 17 cerdos (42.5%).

Solo un cultivo de las biopsias fue positivo.

IFA = Inmunofluorescencia indirecta.

W-S = Tinción de Warthin-Starry.

ELISA = Anticuerpos séricos Hp-específicos.

Positivo = Al menos dos pruebas positivas

Probable positivo = solo una prueba positiva



Figura 8 Tinción de Warthin-Starry de la mucosa gástrica de cerdo. En ella se aprecian estructuras bacterianas curvas y espirales en la cripta.

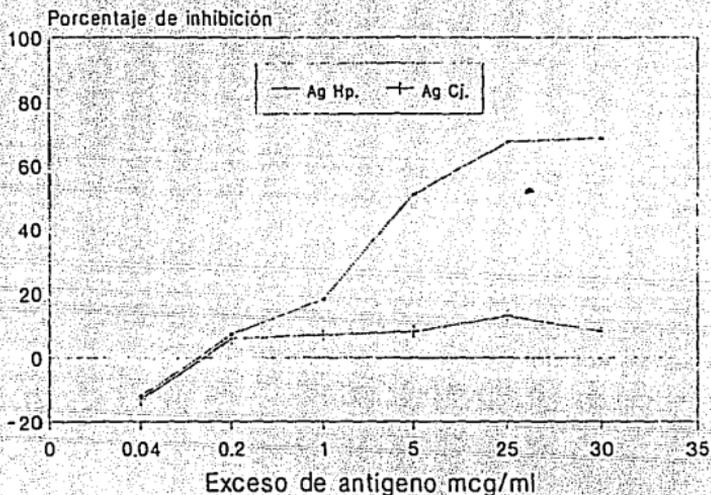
FASE II: VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS
Hp-ESPECÍFICOS POR EL MÉTODO DE ELISA.

Reactividad cruzada:

La importancia de la reacción cruzada entre antígenos de *C. jejuni* y *H. pylori*, se evaluó mediante pruebas de inhibición en ELISA. La máxima inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo de *H. pylori* por los antígenos de *C. jejuni* fue de 13% a una concentración de antígeno libre de *C. jejuni* de 25 mcg/ml, mientras que la inhibición homóloga con una concentración similar de antígeno de *H. pylori* fue de 67.4% (figura 9). Por otro lado, la máxima inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo contra *C. jejuni* por los antígenos de *H. pylori* fue de sólo 8.7% a una concentración de 5 mcg/ml de antígeno libre de *H. pylori*, esta inhibición fue menor a concentraciones mayores (6% y 3% a 25 y 30 mcg/ml respectivamente), mientras que la inhibición homóloga con *C. jejuni* fue de 32% a 5 mcg/ml y aumentó hasta 56% a concentraciones mayores de antígeno libre (figura 10). Al emplear sueros hiperinmunes de conejo en los ensayos de inhibición, los resultados fueron muy similares (figura 11 y 12).

La reactividad cruzada fue estudiada mediante la caracterización electroforética de las proteínas de superficie extraídas por glicina ácida, de uno y otro microorganismos (figura 13), y de estas las que comparten estructuras antigénicas. Para ello fue necesaria la utilización de la electroinmunotransferencia, la cual mostró que el suero hiperinmune contra *H. pylori* fue capaz de reaccionar debilmente sólo con las proteínas de 62 y 63 Kilodaltones (kda) de *C. jejuni*, mientras que, el suero hiperinmune contra *C. jejuni* reconoce las bandas protéicas de 62, 63, 66 y 44 kda contenidas en el antígeno de *H. pylori* (figura 14).

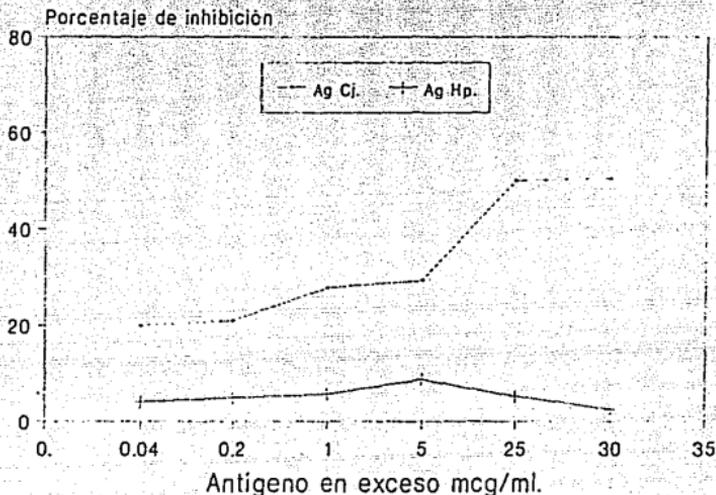
INHIBICION DE SUERO HUMANO anti-H. pylori



Hp-*Helicobacter pylori*
Cj-*Campylobacter jejuni*

Figura 9. Ensayo de inhibición de anticuerpos contra *H. pylori* (Suero de un paciente con infección por *H. pylori*). La máxima inhibición de la reacción antígeno anticuerpo por antígeno de *C. jejuni* fue de 13% a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno libre.

INHIBICION DE SUERO HUMANO anti-C. jejuni

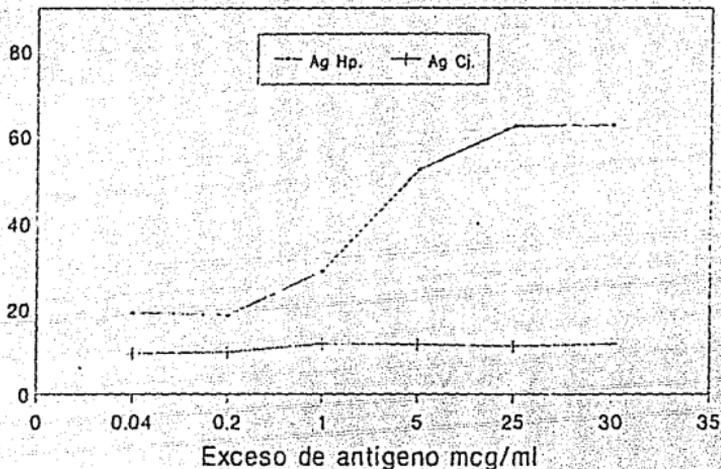


Cj•*Campylobacter jejuni*
Hp•*Helicobacter pylori*

Figura 10. Ensayo de inhibición de anticuerpos contra *C. jejuni* (suero de un paciente en convalecencia de infección por *C. jejuni*). La máxima inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo por antígenos de *H. pylori* fue de 8.7% a una concentración de 5 ug/ml de antígeno libre.

INHIBICION DE SUERO HIPERINMUNE Hp-ESPECIFICO

Porcentaje de inhibición

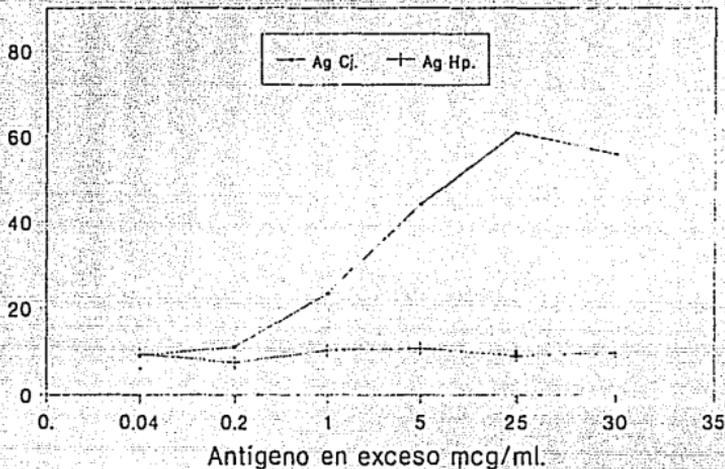


Hp-*Helicobacter pylori*
Cj-*Campylobacter jejuni*

Figura 11. Ensayos de inhibición de anticuerpos contra *H. pylori* (suero hiperinmune de conejo). La máxima inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo por antígenos de *C. jejuni* fue de 10% a una concentración de 5 μ g/ml de antígeno libre.

INHIBICION DE SUERO HIPERINMUNE Cj-ESPECIFICO

Porcentaje de inhibición



Cj • *Campylobacter jejuni*
Hp • *Helicobacter pylori*

Figura 12. Ensayo de inhibición de anticuerpos (Suero hiperinmune de conejo) contra *C. jejuni*. La máxima inhibición de la reacción antígeno-anticuerpo, por antígeno de *H. pylori* fue de 6% a una concentración de 25 ug/ml de antígeno libre.

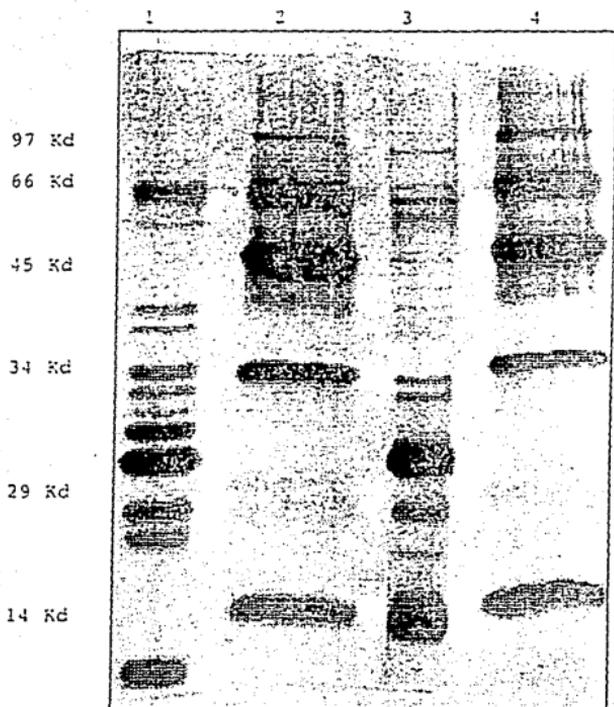


Figura 13 Electroforesis de proteínas de superficie extraídas con glicina ácida, de *C. jejuni* (carril 1) y de *H. pylori* (carril 3) y sus pesos moleculares (carriles 2 y 4).

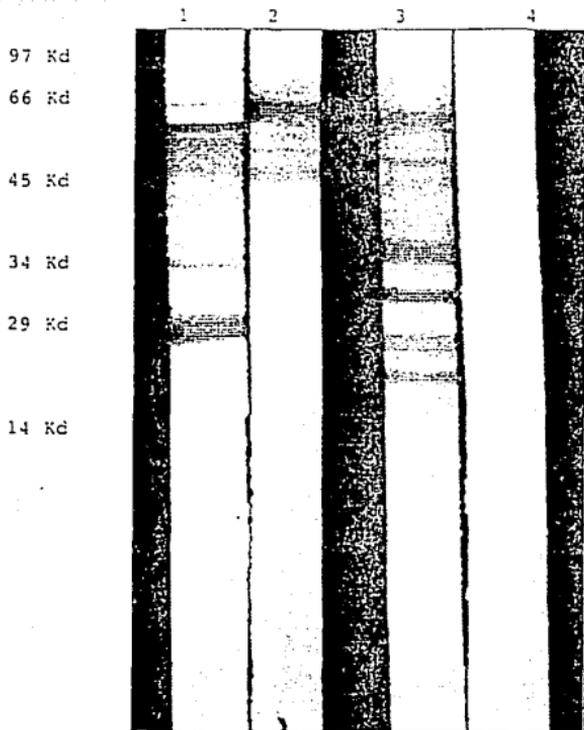


Figura 14. Electroimmunotransferencia. Los carriles centrales (2 y 3) corresponden a antígeno de *C. jejuni* y los extremos (carriles 1 y 2) a antígeno de *H. pylori*. Los carriles 1 y 2 se expusieron a suero hiperinmune contra *H. pylori* y los carriles 3 y 4 a suero hiperinmune contra *C. jejuni*. La reactividad cruzada de los anticuerpos contra *H. pylori* se dio en el complejo protéico de 62 Kd a 66 kd y en la banda de 44 Kd; mientras que la del suero contra *C. jejuni* sólo se dio en la banda de 62 Kd en forma muy tenue.

Validación de la detección de anticuerpos contra *H. pylori*:

Se incluyeron 152 pacientes (72 hombres y 79 mujeres) con una edad promedio de 42.6 años. En 87 pacientes el cultivo fue positivo, de los cuales, 82 (94.25%) presentaron evidencia histológica de gastritis, y 5 (5.7%) mostraron una mucosa gástrica prácticamente normal.

La detección de anticuerpos por la técnica de ELISA se efectuó en 151/152 de los pacientes incluidos y el punto de corte entre los valores positivos y negativos se estableció en base a la percentila 95 de las lecturas de absorbancia del grupo de pacientes negativos para *H. pylori* por los tres parámetros microbiológicos (cultivo, W-S y Ureasa), este fue de 0.469, por lo que se consideró como una prueba de ELISA positiva, si el promedio de las 4 lecturas de absorbancia era igual o mayor a 0.470. Al transformar los valores de las lecturas de absorbancia en índice de absorbancia, el punto de corte no se modificó en forma sustancial siendo este de 0.459 (figura 15).

La distribución de los resultados positivos en las diferentes pruebas diagnósticas en relación con la detección de anticuerpos Hp-específicos por el método de ELISA, mostró una mayor sensibilidad y especificidad (94% y 95% respectivamente) cuando se asociaron el cultivo y la tinción de Warthin-Starry (Valor de Kappa=.91), siendo la segunda con mayor concordancia la tinción de Warthin-Starry sola (Kappa = .80), seguida esta del diagnóstico histológico de gastritis (Kappa = .73). (Tabla 6).

Los promedios de los índices de absorbancia de la detección de anticuerpos contra *H. pylori* mostraron una diferencia significativa entre los pacientes sin gastritis y los que presentaron imágenes histológicas de gastritis incluso leve, y aunque en forma no significativa, también existió diferencia en los promedios de los

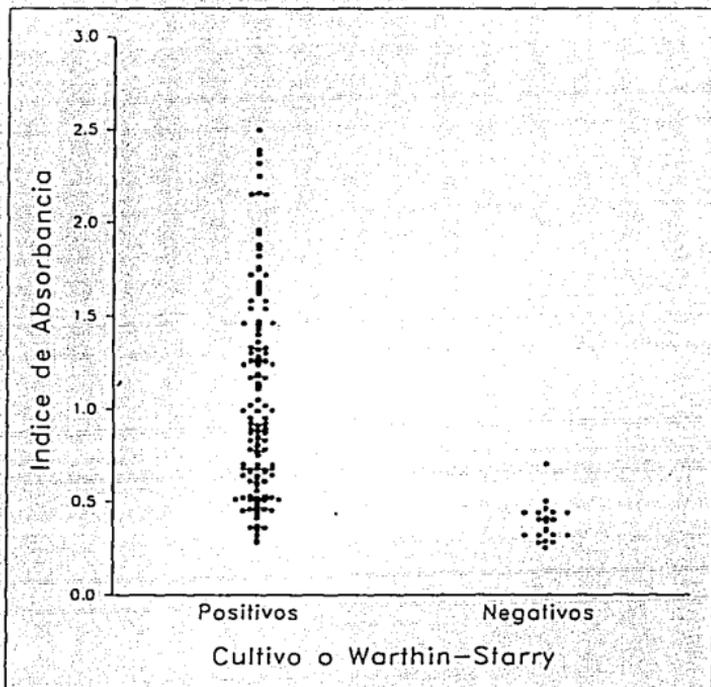


Figura 15. Distribución de los índices de absorbancia en la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA indirecto en los pacientes sometidos a biopsia de la mucosa del antro gástrico (n=151). Se consideró como positivos a los que tuvieron el cultivo o la tinción de Warthin-Starry positiva.

índices de absorbancia entre los pacientes que mostraron gastritis leve, moderada o grave (Tabla 7).

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA en relación a las diferentes pruebas de diagnóstico de infección por este microorganismo.

Método de Diagnóstico	ELISA*/Otra prueba			
	Positivos (n=117)	Negativos (n=34)	S.	E.
Warthin-Starry	111/125	20/29	88%	68%
Histológico**	106/123	17/28	86%	60%
Ureasa	89/95	28/56	93%	50%
Cultivo	81/86	29/65	94%	45%
Cultivo y W-S	116/130	20/21	94%	95%

*Detección de anticuerpos *H. pylori*-específicos en Índice de absorbancia.

**Imagen histológica compatible con gastritis en el objetivo de ICX.

S= Sensibilidad E= Especificidad.

Tabla 7. Relación entre los niveles de anticuerpos Hp-específicos y la intensidad de la gastritis en la imagen histológica.

Intensidad de la Gastritis	n	I.A. ELISA	
		$\bar{X} \pm DE$	IC 95%
Negativa	28	0.494 \pm 0.333	
Leve	54	0.839 \pm 0.481	0.072 a 0.636*
Moderada	49	1.166 \pm 0.519	0.054 a 0.600*
Grave	20	1.442 \pm 0.614	-0.122 a .674

* p<.05

I.A. ELISA= Índice de absorbancia en ELISA.

La intensidad del infiltrado inflamatorio (Neutrófilico, eosinófilico o mononuclear), mostró una relación directa con los niveles de anticuerpos en índice de absorbancia, estos fueron significativamente menores en los pacientes que presentaron infiltración escasa comparados con los que tenían infiltrado moderado, y aun cuando en forma no significativa, los promedios de los índices de absorbancia de los pacientes con infiltración intensa fue mayor que en los pacientes con infiltración moderada (tabla 8).

Tabla 8. Relación entre los títulos de anticuerpos Hp-específicos (índice de absorbancia en ELISA) y el tipo e intensidad del infiltrado inflamatorio en la mucosa gástrica.

Infiltrado	Neutrófilo (n) $\bar{X} \pm DE$	Eosinófilo (n) $\bar{X} \pm DE$	Mononuclear (n) $\bar{X} \pm DE$
Escaso	(82) .769 \pm .508	(47) .607 \pm .440	(36) .564 \pm .344
Moderado	(45) 1.182 \pm .548	(76) 1.108 \pm .527	(75) .993 \pm .546
Intenso	(24) 1.236 \pm .497	(28) 1.186 \pm .551	(40) 1.277 \pm .530

DE = Desviación estándar

* = Student: $P < .05$

Sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA indirecto.

El cálculo de la sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori* por ELISA se realizó, al igual que otros autores (7,13), empleando como estándar de referencia, el cultivo y/o la tinción de W-S. Al analizar los valores de absorbancia del ELISA, antes de convertirlos a Índice

de Absorbancia (I.A. ELISA), la sensibilidad de la prueba fue de 91% y la especificidad de 95% ; al transformar estos valores a Índice de Absorbancia, la sensibilidad disminuyó a 88.5% y la especificidad no se modificó (Tabla 9). Cuando el estándar de referencia fue el cultivo y/o la tinción de W-S más la prueba de ureasa, la sensibilidad aumento a 94% y la especificidad disminuyó a 50% tanto en los resultados del ELISA crudo como en los transformados a índice de absorbancia.

Si analizamos de la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA y se establece como punto de corte al promedio de los índices de absorbancia del grupo de pacientes negativos por los tres parámetros microbiológicos (Cultivo, tinción de W-S y ureasa) más 2 veces el valor de la desviación estándar la sensibilidad fue de 78.5 y la especificidad de 95.3% empleando como estándar de referencia a el cultivo o la tinción de Warthin-Starry (Tabla 9).

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA indirecto.

	Punto de corte		
	O.D. ELISA	Índice de absorbancia Percentila 95'	$\bar{X} + 2 DE'$
	0.470	0.4592	0.584
Sensibilidad	91%	88.5%	78.5%
Especificidad	95%	95%	95.3%
V. Predictivo (+)	99%	99%	99%
V. Predictivo (-)	61%	56%	58.3%

Del grupo de pacientes negativos para *H. pylori* por los tres parámetros microbiológicos evaluados.

O.D. ELISA = Lecturas de absorbancia sin modificaciones.

Índice de absorbancia = Lecturas de absorbancia modificadas mediante regla de tres en base al valor del control positivo.

Control de calidad:

La reproducibilidad de la detección de anticuerpos contra *H. pylori* por el método de ELISA, se evaluó calculando el promedio de los coeficientes de variación intraensayo e interensayo empleando los valores, en índice de absorbancia, de los duplicados de cada uno de los 151 sueros del grupo de pacientes incluidos en esta fase; estos coeficientes de variación fueron de 5.84% y 12.09% respectivamente.

FASE III: DETERMINACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA
H. pylori EN PERSONAS CON DIFERENTES TIPOS Y GRADOS DE
EXPOSICION AL CERDO Y/O A SUS PRODUCTOS.

En esta fase se incluyeron a las 152 personas de la fase II, más 160 donadores de sangre, 25 trabajadores de un rastro general, 28 de un rastro de cerdos y 9 vegetarianos.

Estos grupos fueron clasificados de acuerdo a su exposición al cerdo o a sus productos en las siguientes categorías: 1) Muy alta exposición Trabajadores del rastro exclusivo de cerdos (n = 28), 2) Alta exposición Trabajadores del rastro general (n = 25), 3) Baja exposición, Población general, Donadores de sangre (n = 160), 4) No expuestos, Vegetarianos sin contacto con cerdos (n = 9), 5) Pacientes con infección por *H. pylori* comprobada por cultivo o tinción de Warthin-Starry (n = 131) y 6) Pacientes no infectados por *Helicobacter pylori* comprobado por cultivo, Warthin-Starry y ureasa, (n = 21).

Del total de personas estudiadas en esta fase, 112 fueron mujeres y 262 hombres, no existiendo diferencia en la frecuencia de personas infectadas por *H. pylori* entre uno y otro sexos (62.5% y 66% respectivamente). La prevalencia de infección en general fue de 65.1% (243/374) siendo más frecuente en el grupo de muy alta exposición (85.7%, 24/28) seguido del de alta exposición (80% , 20/25) y del de baja exposición (61.25%, 98/160); el grupo no expuesto mostró una prevalencia de 55.5% (5/9) y el grupo de pacientes sometidos a endoscopia y biopsia de mucosa gástrica mostró una prevalencia de 86% (131/152).

La descripción de la frecuencia con que se registraron las diferentes variables contenidas en el cuestionario, en los que tuvieron niveles de anticuerpos positivos para infección por *H. pylori*; así como los que resultaron negativos para esta prueba se muestran en la tabla 10; en ella resalta que los que se dedican

Tabla 10. Descripción de la frecuencia de las variables investigadas y su distribución entre las personas con infección por *H. pylori* y sin ella de acuerdo a el nivel de anticuerpos específicos contra este microorganismo

Ocupación	Infección por <i>H. Pylori</i>		
	positiva n(%)	negativa n(%)	Total n(%)
Manejo de cerdos	47(81)	11(19)	58(16.5)
Matancero o carnicero	42(82)	9(17)	51(13.6)
Campeño	8(57)	6(43)	14(4.0)
Oficinista	21(55)	17(45)	38(10.8)
Médico	10(56)	8(44)	18(4.8)
Ama de Casa	45(71)	18(29)	63(18)
Vendedor	11(84)	2(16)	13(3.7)
Enfermera	3(50)	3(50)	6(1.7)
Otro	103(61)	66(39)	169(48.4)
Exposición a Animales			
Cerdos	48(64)	27(36)	75(21.4)
Vacas	20(74)	7(26)	27(7.7)
Pollos	20(65)	11(35)	31(8.8)
Otras aves	32(64)	18(36)	50(14.3)
Ovinos	8(66)	4(34)	12(3.4)
Perros	114(65)	67(35)	181(52)
Gatos	28(50)	28(50)	56(16)
Caballos	11(34)	21(66)	32(9.1)
Mustélidos	10(63)	6(37)	16(4.5)

Tabla 11. Descripción de la frecuencia del consumo de productos animales y de vegetales, y su distribución entre positivos y negativos en la detección de anticuerpos contra *H. pylori*.

	Infección por <i>H. Pylori</i>		Total n(%)
	positiva n(%)	negativa n(%)	
Productos Consumidos			
Res	215(64)	12(36)	336(96)
Visceras de res	162(67)	80(33)	242(69)
Cerdo	201(64)	115(36)	316(90)
Visceras de cerdo	160(61)	103(39)	263(75)
Moronga	96(64)	53(36)	149(43)
Lechón	36(49)	37(51)	73(21)
Hígado de cerdo	72(62)	45(38)	117(34)
Jamón	70(66)	36(34)	106(30)
Cueritos	121(62)	75(38)	196(56)
Chicharrón	182(63)	106(37)	288(83)
Chorizo	135(59)	92(41)	227(66)
Longaniza	127(61)	80(39)	207(59)
Nana	68(63)	41(37)	109(31)
Pollo	218(64)	124(36)	342(98)
Visceras de Pollo	125(64)	69(36)	294(84)
Molleja	103(66)	52(34)	155(44)
Hígado de pollo	98(64)	56(36)	154(44)
Pulmón de Pollo	12(92)	1(8)	13(3.7)
Tripas de pollo	19(66)	10(34)	29(8.3)
Pescado	203(62)	120(38)	323(93)
Otras carnes	171(62)	102(38)	273(78)
Verduras	214(63)	124(37)	338(97)
Verduras no lavadas	124(70)	54(30)	178(51)

tanto al manejo de productos animales como al manejo de cerdos, más frecuentemente se encuentran infectados por *H. pylori* que los que tienen otros tipos de ocupación exceptuando a los vendedores quienes tienen una frecuencia de infección similar al de los matanceros o carniceros. La frecuencia de infección por *H. pylori* fue más frecuente entre las personas que refirieron exposición a vacas que los que refirieron exposición a otros animales incluyendo el cerdo.

La mayoría de los pacientes (98%) refirieron consumir productos animales (338/349). El consumo de verduras también fue muy frecuente (96.8%), sin embargo, solo el 51% consumía verduras mal lavadas y de estos últimos, el 70% se encontró con títulos altos de anticuerpos contra *H. pylori* (tabla 11).

Los posibles factores de confusión valorados fueron: edad, sexo, lugar de residencia y estrato socioeconómico, la tabla 12 señala que solo la edad presentó un desbalance importante entre positivos y negativos así como entre todos los grupos con diferente exposición al cerdo; más aun, la edad mostró una relación directa con los títulos de anticuerpos expresados en índice de absorbancia, es decir, a medida que la edad se incrementa, los niveles de anticuerpos son mayores (tabla 13); esto permitió estratificar el resto del análisis por esta variable, la edad.

El análisis de los promedios de los índices de absorbancia de la detección de anticuerpos contra *H. pylori*, mostró que en al menos uno de los grupos es significativamente diferente de los demás grupos con diferentes grados de exposición al cerdo (ANOVA, $p=0.0003$), esta diferencia fue igualmente significativa entre los índices de absorbancia de los grupos de pacientes infectados y no infectados por *H. pylori* ($p<0.0001$).

Tabla 12. Determinación de posibles factores de confusión mediante la detección de desbalance importante entre positivos y negativos así como entre los grupos con diferente exposición a cerdos.

Factores Analizados	(n)Positivo $\bar{X} \pm DE$	(n)Negativo $\bar{X} \pm DE$	χ^2 (p)	ANOVA grupos
Edad	(243)39.7 \pm 14	(134)35.7 \pm 14	9.7(.008)	.0001
Indice S/E	(177)1.8 \pm 3.3	(131)1.86 \pm 2.1	10.55(.9)	.498
Masculino	(173)	(89)		
Femenino	(70)	(42)	.49(.51)	.598

Indice S/E = Índice socioeconómico: resultado de dividir las percepciones entre los gastos en alimentación.

Tabla 13. Relación entre los niveles de anticuerpos contra *S. pylori* (Índice de absorbancia en ELISA) y la edad.

Gpo. Etario	n	Edad $\bar{X} \pm DE$	<i>H. Pylori</i> $\bar{X} \pm DE$
< 30 años	123	23 \pm 3.6	.819 \pm .502
30 a 49 años	166	38 \pm 5.8	.944 \pm .519
\geq 50 años	85	60 \pm 6.9	1.112 \pm .622
			Pearson r = .99
			p < .05

Los índices de absorbancia de las personas con muy alta y alta exposición al cerdo y sus productos resultaron significativamente más elevados que los niveles de anticuerpos de las personas con baja exposición, y no encontrándose una diferencia significativa entre el grupo no expuesto y el de baja exposición al cerdo o sus productos, aun cuando se aprecia una tendencia a ser mayores los

niveles de anticuerpos en el grupo no expuesto (Tabla 14). Sorprendentemente, se encontró que los niveles de anticuerpos de los grupos con alta y muy alta exposición son muy similares a los del grupo de pacientes infectados por *H. pylori*.

El análisis paramétrico es aplicable a pesar de que los valores de las desviaciones estándar son muy amplios, ya que existe homoscedasticidad, pues la varianza mayor entre la menor no es mayor de 3 (1.92), y el análisis no paramétrico de estos datos no fue diferente (Tabla 14).

Tabla 14. Diferencia de los niveles de anticuerpos contra *H. pylori* en los grupos expuestos al cerdo (ANOVA), comparando mediante *t* de Student los títulos de anticuerpos de los grupos con alta, muy alta exposición y no expuesto con el grupo de baja exposición, empleando la modificación de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Grupos expuestos al cerdo y/o sus productos				Pacientes con endoscopia y biopsia	
Grupo(n)	I.A. $\bar{X} \pm DE$ (Med.)	p*	Grupo(n)	I.A. $\bar{X} \pm DE$ (Med.)	
Muy alta (28)	1.17 \pm .65 (.920)	.024	Infectados (11)	1.06 \pm .54 (.919)	
Alta (25)	1.27 \pm .68 (1.116)	.002	No infectados (11)	0.38 \pm .099 (.186)	
Baja (160)	0.84 \pm .49 (.687)				
No expuesto (9)	1.08 \pm .82 (.516)	.16			
ANOVA, p = .0003 K-Wallis, p = .0001			t-Student, p = .0001 U-Mann Whitney, p = .0001		

I.A. = Índice de absorbancia de ELISA

Med. = Mediana

* *t* de Bonferroni y *U* de Mann Whitney: igual nivel de significancia

** Cultivo, W-S y Ureasa negativos

La estratificación por edad, al someter los datos a un análisis de varianza de dos vías, mostró que aun cuando la edad de

las personas entre los grupos es diferente ($p=.0016$), las diferencias entre los índices de absorbancia persisten siendo significativas ($p=.0013$).

Factores de Riesgo para Infección por *H. pylori*.

El análisis de las variables incluidas en el cuestionario como posibles factores de riesgo para infección por *H. pylori*, se efectuó mediante regresión logística (paquete estadístico STATA), siendo la variable dependiente el diagnóstico de infección por *H. pylori* basado en la detección de anticuerpos específicos contra esta bacteria.

Inicialmente se efectuó una regresión logística de cada variable (análisis univariado) y en base a este se descartaron aquellas variables que no mostraran asociación con la infección por *H. pylori* con una significancia estadística $\leq .20$; en esta fase del análisis se encontró que ser matancero o carnicero así como el manejo de cerdos, representan un riesgo laboral significativo para la infección por *H. pylori* (R.M. = 2.83 y 2.61 respectivamente), y el consumo de vísceras de res y verduras mal lavadas, también mostraron ser factores de riesgo significativos para la infección por este microorganismo (R.M. = 1.61 y 1.72 respectivamente); por otro lado, la exposición a vacas mostró una razón de momios de 1.69 pero el nivel de significancia fue $< .20 > .05$ (Tabla 15).

Otras variables, como la exposición a caballos o a gatos y el consumo de lechón, chorizo, o el consumo frecuente de carne de res, también mostraron una asociación significativa, pero el riesgo relativo aproximado fue de orden protector es decir, menor de 1 (tabla 15).

Tabla 15. Factores de riesgo para infección por *H. pylori* determinada esta por niveles de anticuerpos específicos. Análisis univariado (Regresión logística\STATA).

Factor Investigado	Razón de Momios	p
Edad	1.57	.004
Ocupación		
Matancero o carnicero	2.83	.007
Manejo de cerdos	2.61	.007
Vendedor	3.25	.129
Ama de casa	1.54	.157
Exposición a animales		
Cerdos	1.53	.063
Vacas	1.69	.145
Caballos	0.26	.001
Gatos	0.51	.023
Consumo de productos		
Verduras mal lavadas	1.72	.016
Vísceras de res	1.61	.046
Pulmones de pollo	7.19	.060
Lechón	0.47	.005
Chorizo	0.59	.030
Carne de res frecuente*	0.30	.046
Vísceras de cerdo	0.62	.082
Pescado frecuente*	0.69	.096

* Más de 1 vez por semana

Dado que la edad mostró una fuerte asociación con los niveles de anticuerpos contra *H. pylori*, se efectuó una regresión logística para cada variable estratificando por la edad (Análisis bivariado). Los resultados de este análisis fueron muy similares a los del análisis univariado, encontrando que dedicarse al sacrificio de animales o ser carnicero, y el manejo de cerdos (cerdos vivos o sus productos) mostraron una razón de momios de 3.16 y 2.82 respectivamente, ambas estadísticamente significativas.

La exposición a gatos y a caballos resultaron con una razón de momios protectora contra la infección por este microorganismo. El consumo de vísceras de res (R.M.=1.74) y verduras mal lavadas (R.M.=1.96) estratificando por edad mostraron ser factores de riesgo significativos para la infección por *H. pylori*, y el consumo de lechón persistió como un factor protector para la infección por este microorganismo (Tabla 16).

Las variables que habían mostrado una asociación con la infección por *H. pylori* con un nivel de significancia $\leq .20$ en el análisis univariado, fueron incluidas en un primer análisis multivariado agrupandolas por tipo de exposición (exposición laboral, exposición a animales y consumo de productos animales y vegetales), y se incluyó a la edad como factor confusor en cada modelo.

El modelo de regresión logística múltiple efectuado con las variables relacionadas a la ocupación, mostró que sólo el ser matancero o carnicero y el manejo de cerdos son factores de riesgo significativos para infección por *H. pylori* (R. M. = 3.83 y 3.78 respectivamente); ser vendedor mostró una razón de momios de 3.55 pero con una $p=.128$ (tabla 17). En el análisis multivariado de la exposición a animales, la razón de momios para la exposición a vacas fue de 2.67 con un valor de $p=.07$ y la exposición a caballos persistió con una razón de momios dentro del rango protector (R.M.=0.21) con un nivel de significancia de $p=.001$ (tabla 17). El

consumo de los productos analizados mostró que la ingesta de vísceras de res y verduras mal lavadas son factores de riesgo significativos para infección por *H. pylori* (R. M.= 2.52 y 1.81 respectivamente), y el consumo de pulmones de pollo aun cuando mostró una razón de momios de 7.00 dio un valor de $p= .074$. Tanto el consumo de lechón como el consumo frecuente de carne de res y de pescado persistieron con razones de momios significativas dentro del rango de protección (tabla 17)

Finalmente, las variables que mostraron una asociación con la infección por *H. pylori* en el análisis multivariado con un nivel de significancia $\leq .10$, se incluyeron en una última regresión logística multivariada, respetándose la agrupación de las variables por tipo de exposición e igualmente controlando por edad como factor confusor. Además se generaron nuevas variables con las combinaciones de estas variables.

En la exposición de tipo laboral, solamente el ser matancero o carniceró y el manejo de cerdos resultaron ser factores de riesgo significativos para la infección por *H. pylori* (Tabla 18) y la combinación de ambas incrementó el riesgo en forma discreta.

La exposición a vacas se presentó con una razón de momios de 3.01, esta asociación se encontró estrechamente relacionada con la exposición a caballos, de tal manera que sin controlar por la exposición a este animal, la exposición a vacas no es significativa (Tabla 18); sin embargo al combinar la exposición a vacas con la no exposición a caballos el riesgo se incrementó hasta 42.01.

Solamente el consumo de verduras mal lavadas y de vísceras de res (Pancita), mostraron ser factores de riesgo para infección por *H. pylori* y extrañamente, el consumo de lechón y la ingesta de carne de res o de pescado más de 1 vez por semana se presentaron como factores protectores para la infección por esta bacteria. (tabla 18); al efectuar las combinaciones de estas variables el.

Tabla 16. Factores de riesgo para infección por *H. pylori* (Títulos positivos de anticuerpos). Análisis de las variables que en forma univariada tuvieron un nivel de significancia $\leq .20$, estratificando por edad.

Factor investigado	Razón de Momios	p
Ocupación		
Manejo de cerdos	2.82	.004
Matanzero o Carnicero	3.16	.04
Exposición a animales		
Cerdos	1.61	.042
Caballos	0.29	.002
Gatos	0.53	.04
Consumo de productos		
Visceras de res	1.74	.024
Verduras mal lavadas*	1.96	.004
Pulmón de pollo	5.65	.095
Lechón	0.47	.006
Carne de res frecuente**	0.31	.041
Pescado frecuente**	0.64	.051
Chorizo	0.62	.057

* Lavados solo con agua o no lavados.

** Más de 1 vez por semana.

Tabla 17. Análisis multivariado de los posibles factores de riesgo para infección por *H. pylori*, empleando las variables que en forma univariada mostraron un nivel de significancia $\leq .20$, agrupándolas por tipo de exposición y controlando por edad en cada modelo.

Factor Investigado	Razón de Momios	p
Ocupación		
Matancero o carnicero	3.83	.028
Manejo de cerdos	3.78	.032
Vendedor	4.22	.097
Edad (Confusor)	1.36	.017
Exposición a animales		
Vacas	2.67	.077
Caballos	0.26	.001
Gatos	0.58	.085
Edad (confusor)	1.40	.032
Consumo de productos		
Verduras mal lavadas	1.81	.019
Visceras de res	2.52	.001
Pulmones de pollo	7.00	.074
Lechón	0.43	.005
Carne de res frecuente*	0.28	.033
Pescado frecuente*	0.57	.026
Edad (confusor)	1.65	.003

* Más de 1 vez por semana

Tabla 18 . Análisis multivariado de los posibles factores de riesgo para infección por *H. pylori*. Regresión logística múltiple (Stata) de las variables con nivel de significancia ≤ 0.10 en análisis multivariado previo, agrupadas por tipo de exposición y ajustando por edad.

Factor Investigado	Razón de Momios	p
Ocupación		
A) Matancero o carnicero	3.03	.005
B) Manejo de cerdos	3.10	.040
C) Edad (Confusor)	1.53	.006
D) A + B	3.36	.003
Exposición a animales		
A) Vacas	3.01	.041
B) Caballos	0.20	.001
C) Edad (confusor)	1.41	.027
D) A + no B	42.01	.005
Consumo de productos		
A) Vísceras de res	2.13	.004
B) Verduras mal lavadas	1.64	.041
C) Lechón	0.42	.003
D) Carne de res frecuente*	0.28	.032
E) Pescado frecuente*	0.54	.011
F) Edad (confusor)	1.76	.001
G) A + B	3.20	.001
H) A + B + no C	17.30	.010
I) A + B + no C + no D	42.0	.010
J) A + B + no C + no D + no E	Predicción perfecta	

* Más de 1 vez por semana

riesgo se incrementa de tal manera hasta que el consumir vísceras de res, verduras mal lavadas y además no haber comido lechón y no comer carne de res o pescado al menos dos veces por semana predice perfectamente la infección por *H. pylori*.

Determinación de anticuerpos contra *C. jejuni*

La detección de anticuerpos contra *C. jejuni* en todas las personas del estudio, nos permitió establecer la ausencia de correlación entre los niveles de anticuerpos contra *C. jejuni* y los niveles de anticuerpos contra *H. pylori* determinado esto tanto por grupos como en forma global. Por otra parte, los anticuerpos contra *C. jejuni* tampoco mostraron correlación con la edad (Pearson, $r = 0.17$). Los niveles de anticuerpos contra *C. jejuni* fueron altos en la mayoría de los trabajadores del rastro general y bajos en los trabajadores del rastro de cerdos en los que el promedio del índice de absorbancia fue de 0.441 (tabla 19).

Factores de riesgo para infección por *Campylobacter jejuni*

Al igual que para *H. pylori* y con objeto de determinar si los factores de riesgo identificados para infección por esta bacteria no eran un reflejo de la exposición a otros microorganismos del género *Campylobacter*; se determinaron los factores de riesgo para tener niveles altos de anticuerpos contra *C. jejuni*.

La tabla 20 muestra como la exposición laboral al cerdo, no es un factor de riesgo para infección por *C. jejuni* sino que al contrario, tanto ser matancero o carnicero como tener exposición laboral al cerdo o a sus productos, tienen una razón de momios dentro del rango de protección para infección por este microorganismo la cual es significativa tanto en forma univariada como multivariada; mientras que dedicarse a otro tipo de ocupación como ser chofer, obrero, estudiante etc., es un factor de riesgo

(R.M.= 1.78) significativo para infección por *C. jejuni* en el análisis univariado.

Tabla 19. Relación entre los niveles de anticuerpos (índices de absorbancia) contra *H. pylori* y contra *C. jejuni* en los grupos con diferentes grados de exposición al cerdo o a sus productos (r de Pearson).

Grupo de exposición	I.A. <i>C. jejuni</i>	I.A. <i>H. Pylori</i>	n	r	r ²
	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$			
Muy alta	0.441±.155	1.170±.650	28	.038	.0014
Alta	0.918±.167	1.270±.678	25	.011	.00013
Baja	0.815±.316	0.841±.490	160	.153	.02356
No expuesto	1.095±.345	1.083±.821	9	.547	.2995
Pacientes					
Infectados	0.783±.321	1.061±.544	131	.149	.022
No Infectados	0.650±.148	0.385±.099	21	.149	.022
Global	0.779±.315	0.952±.565	374	.128	.0164

Por otro lado, en cuanto a la exposición a animales, sólo la exposición a cerdos mostró una razón de momios significativa siendo esta dentro del rango protector (0.446 en el análisis univariado y de 0.464 en el multivariado) (Tabla 20); y en cuanto al consumo de los diferentes productos investigados, solamente el consumo de hígado de pollo mostró ser factor de riesgo significativo para infección por *C. jejuni* (R.M.= 2.13) en el análisis multivariado (Tabla 20)

Tabla 20. Factores de riesgo para infección por *C. jejuni*; análisis uni y multivariado (Regresión logística\STATA).

Factor Investigado	Análisis			
	Univariado		Multivariado	
	R.M.	p	R.M.	p
Ocupación				
Matancero o Carnicero	0.115	.0001	0.763	.0001
Manejo de cerdos	0.400	.004	0.133	.0001
Vendedor	1.526	.558	0.740	.762
Ama de casa	1.558	.234	0.739	.675
Otro tipo	1.766	.034	0.624	.460
Edad	0.895	.527	0.869	.486
Exposición a animales				
Cerdos	0.446	.006	0.464	.017
Vacas	0.624	.288	0.583	.292
Gatos	2.110	.08	2.179	.087
Caballos	2.84	.094	3.55	.056
Consumo de productos				
Vísceras de Res	0.934	.811	1.150	.664
Vísceras de pollo	0.601	.061	0.661	.357
Lechón	0.795	.460	0.789	.470
Molleja	0.632	.081	0.808	.631
Hígado de Pollo	1.180	.555	2.131	.038
Verduras mal lavadas	0.752	.344	0.760	.313

DISCUSIÓN.

Helicobacter pylori ha emergido como el agente causal de la gastritis crónica inespecífica denominada actualmente Gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* (33). La infección por este microorganismo, tiene influencia sobre la evolución de la úlcera duodenal, demostrado por estudios terapéuticos en los que al erradicar al microorganismo de la mucosa gástrica, el índice de recaídas de Úlcera duodenal a un año disminuye del 100% al 15% (34).

Hasta ahora, *H. pylori* ha sido aislado solamente de la mucosa gástrica de primates y de humanos (22), con la existencia de una descripción de un sólo aislamiento de la mucosa gástrica de cerdo (22). Por lo que, si existe un posible reservorio natural es aún desconocido.

La prevalencia de infección en los 40 cerdos estudiados, fue de 2.5% basándose solamente en el cultivo. Sin embargo, debido a las dificultades técnicas en el aislamiento del microorganismo, esta cifra subestima la prevalencia real de la infección en estos animales; por otro lado, las pruebas diagnósticas alternativas efectuadas en este grupo de cerdos tales como la detección de anticuerpos Hp-específicos, la tinción de Warthin-Starry y la Inmunofluorescencia, muestran que la prevalencia es de 27.5%, al considerarse al menos dos pruebas positivas para diagnóstico de infección, y de 57.5% al considerar sólo una prueba positiva, lo que nos permite considerar al cerdo como uno de los reservorios naturales de *H. pylori*; esto podrá ser confirmado en estudios posteriores en la medida en que los métodos de aislamiento sean mejorados, y se pueda evitar que los microorganismos contaminantes sean una limitante en el aislamiento de *H. pylori*, y se puedan efectuar comparaciones entre los microorganismos provenientes de la mucosa gástrica de cerdos con los de los humanos.

Los métodos de diagnóstico alternativos empleados en esta fase del estudio (Inmunofluorescencia, Tinción de Warthin-Starry y detección de anticuerpos específicos por ELISA), no han sido ni validados en cerdo por la limitante de un estándar de referencia; sin embargo, la similitud entre la mucosa gástrica y en general todo el aparato digestivo del cerdo con el del humano; nos permiten pensar que su utilidad es similar al emplearlas en el cerdo.

Dada la limitante en establecer un punto de corte para la absorbancia en el ELISA de los cerdos, se utilizó el promedio de los valores de absorbancia de los pacientes con todas las pruebas negativas, más tres desviaciones estándar (I.A. > 0.682), estimándose con ello al rededor del 98% de especificidad, con una sensibilidad del 70%.

Para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, es necesaria la endoscopia y la biopsia de mucosa gástrica lo cual limita la investigación epidemiológica y el escrutinio de pacientes con sintomatología gastrointestinal alta, por lo que se ha propuesto la utilización de métodos indirectos como la detección de anticuerpos específicos como un método diagnóstico alternativo de gran utilidad (7). Sin embargo, la posible reactividad cruzada con otros microorganismos del género *Campylobacter* en particular *jejuni* y *coli* pudiese resultar en una elevada proporción de falsos positivos, en especial en lugares como México en donde la infección por *C. jejuni* presenta una alta prevalencia (35). En nuestro estudio epidemiológico de transmisión de *H. pylori*, fue determinante primero validar la detección de anticuerpos *H. pylori*-específicos por el método de ELISA y cuantificar el porcentaje de reactividad cruzada presente con *C. jejuni*.

La reactividad cruzada valorada mediante pruebas de inhibición de ELISA y de electroinmunotransferencia, muestran resultados similares a los informados por otros autores (13). Al utilizarse las proteínas de superficie extraídas con glicina ácida

como antígeno de captura, la reactividad cruzada entre antígenos y anticuerpos es baja en los ensayos de inhibición y en los de electroinmunotransferencia se aprecia que los anticuerpos que reaccionan en forma cruzada, son los dirigidos contra *H. pylori* hasta un 13%, estos en efecto, dan como resultado cierta cantidad de falsas positivas, pero estas son en la detección de anticuerpos contra *C. jejuni*, y no al detectar anticuerpos contra *H. pylori* ya que en esta última prueba, la reactividad cruzada con *C. jejuni* fue de sólo 8.7% lo cual no parece tener importancia en la interpretación clínica del resultado, ya que la especificidad de la prueba fue del 95%.

La reactividad cruzada esta dada por una afinidad diferente hacia un antígeno similar contenido en ambas bacterias, este antígeno pudiese ser la proteína de 62 kda que corresponde a una proteína flagelar y que aparece reaccionando en forma cruzada en nuestros ensayos de electroinmunotransferencia (fig 12).

La reacción cruzada en la detección de anticuerpos por el método de ELISA, puede llegar a ser muy elevada (36), si se emplea como antígeno de captura a la bacteria completa (13), ya sea en forma sonicada o formalinizada, en este caso se sugiere adsorber los anticuerpos con afinidad a antígenos de *C. jejuni*, preincubando los sueros con extractos crudos de esta bacteria antes de efectuar la detección de anticuerpos contra *H. pylori*; esto no descarta que con la adsorción, se pierdan, por su afinidad a *C. jejuni*, anticuerpos dirigidos originalmente contra *H. pylori*, por lo que con objeto de no afectar la sensibilidad de la prueba, se ha utilizado como punto de corte, entre positivos y negativos, un valor de absorbancia más bajo. En cambio, si se emplean las proteínas de superficie extraídas con glicina ácida como antígeno de captura, la reactividad cruzada es muy baja (8.7%), no habiendo necesidad de preadsorber los sueros con *C. jejuni*.

Otro factor que consideramos ayudó en forma importante a disminuir los efectos de la reactividad cruzada sobre la especificidad de la prueba, fue el emplear el suero de una persona con títulos elevados contra *C. jejuni* como control negativo en cada microplaca de ELISA.

La frecuencia de gastritis asociada a cultivo positivo de *H. pylori* (84.5%) fue similar a la encontrada por otros autores (9) al igual que el aislamiento de *H. pylori* en la mucosa gástrica de personas sin evidencia histológica de gastritis (5%); sin embargo si consideramos como indicador de infección a la ureasa o al W-S la frecuencia de gastritis asociada a *H. pylori* es mayor (93.8% y 94.6% respectivamente) pero no diferente a lo informado por otros autores (7).

La detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori* por el método de ELISA mostró ser tan sensible y específica en nuestra población como en otras con una menor prevalencia de infección por *C. jejuni* (7), lo cual nos permite concluir que la reactividad cruzada informada por otros autores (13,36) no tiene importancia clínica y epidemiológica.

La utilidad del ELISA para determinar la existencia de gastritis, se aplicó a la información del grado de infiltración por neutrófilos, eosinófilos y mononucleares, y demostró que la cantidad de anticuerpos se encuentra en relación directa a la intensidad del infiltrado inflamatorio, esto es, que índices de absorbancia superiores a 0.900 corresponden a un infiltrado moderado, y niveles por arriba de 1.100 corresponden en la mayoría de los casos a una infiltración intensa. Los índices de absorbancia menores de 0.700 corresponderán a un infiltrado inflamatorio escaso, lo que, si se trata de polimorfonucleares, se considera dentro de los límites de la normalidad.

La especificidad de la prueba es dependiente del estándar de referencia. Las diferencias en especificidad están dadas por la diferente sensibilidad del estándar de oro, esto es: Si el estándar es poco sensible, una prueba con mayor sensibilidad al compararla aparecerá como poco específica, como sucede con el ELISA cuando se compara con el cultivo o la ureasa; lo inverso sucede cuando el estándar no es muy específico como sucede con el W-S en donde la prueba de ELISA parece ser poco sensible.

La selección de un estándar de referencia combinado, nos permitió un cálculo más real de la sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos Hp-específicos por el método de ELISA.

De todo lo anterior se deriva que la detección de anticuerpos por el método de ELISA empleando como antígeno las proteínas de superficie extraídas con glicina ácida, es un método de diagnóstico confiable, que no se ve afectado en forma importante por la reactividad cruzada y que puede ser empleado como método alternativo a la endoscopia y la biopsia de mucosa gástrica; por lo que su utilidad principal será en la evaluación epidemiológica de la infección por *H. pylori* y en el escrutinio de pacientes con sintomatología gastrointestinal alta.

La transmisión de *Helicobacter pylori* al humano, en base a estudios seroepidemiológicos efectuados en personas internadas en una institución para retrasados mentales, y en familiares de personas infectadas por este microorganismo, se ha postulado que sea de persona a persona (28,29); sin embargo, en estos estudios no se tomó en cuenta a otros factores como alimentación y exposición a animales que estos sujetos seguramente compartían.

En la fase III de nuestro trabajo, aún cuando nuestra hipótesis propone al cerdo como un eslabón importante en la cadena de transmisión de *H. pylori* al humano, el incluir reactivos en el cuestionario para investigar la exposición a otros animales y a el

consumo de diferentes productos animales y vegetales, nos permitió no sesgar al sujeto entrevistado e identificar otras posibles fuentes de transmisión.

La inclusión de reactivos para identificar posibles factores de confusión permitió identificar a la edad como la única variable que no se distribuyó en forma uniforme entre positivos y negativos ni en los grupos, y su relación directa con la infección por *H. pylori*. Estableciéndose que a mayor edad, mayor frecuencia de infección y así como mayores niveles de anticuerpos.

Esta asociación con la edad fue descrita por otros autores (37), y es tan importante que los resultados del análisis no estratificados por esta variable, son poco interpretables.

La prevalencia de infección por *H. pylori* en base a la detección de anticuerpos Hp-específicos en los 374 sujetos estudiados en la fase III (65.1%) no fue diferente de la prevalencia de infección en el grupo de población general (donadores de sangre) (61.25%) y tampoco fue diferente a los descrito por otros autores (38,39); esto implica que el grupo control es realmente representativo de la población general.

Esta prevalencia es demasiado alta para lo que se considera recomendable en un estudio de casos y controles, sin embargo, si bien no esperamos que este estudio definiera sin lugar a dudas el papel del cerdo en la transmisión de *H. pylori* al humano, si logra determinar los requerimientos para la realización de un estudio longitudinal en personas que sin infección por esta bacteria se expusieran a los factores de riesgo aquí definidos, se efectuó este escrutinio para determinar factores que influyen en la infección por *H. pylori* en vez de un estudio de cohortes que por su costo y duración no es el más indicado.

Los resultados de la detección de anticuerpos Hp-específicos mostraron que la distribución de positivos y negativos en los grupos fue muy diferente, de manera que los índices de absorbancia en los sujetos con alta exposición y muy alta exposición, fueron significativamente superiores a los índices del grupo con baja exposición a productos del cerdo, tanto en forma univariada (ANOVA, $p=.0003$) como estratificando por edad (ANOVA, $p=.0013$).

Las desviaciones estándar son muy amplias en todos los grupos, esto sugiere que sería preferible utilizar un análisis no paramétrico, sin embargo, dado que se cumple el principio de Homoscedasticidad ($s^2_H/s^2_m = 1.92$) el análisis paramétrico de los datos fue válido y los resultados del análisis no paramétrico no son diferentes.

Al efectuar comparaciones múltiples utilizándose t de Student o U de Mann-Whitney ambas con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, se demostró que las diferencias son a expensas de los índices de absorbancia del grupo de baja exposición que son muy bajos en comparación a los de los grupos con alta y muy alta exposición; estableciéndose que a mayor exposición al cerdo y sus productos los niveles de anticuerpos Hp-específicos son más elevados.

El grupo no expuesto no mostró una diferencia en sus índices de absorbancia con respecto a los del grupo de baja exposición, esto probablemente se debió a que el número de sujetos fue bajo, y la desviación estándar muy dispersa, sin embargo, si se comparan las medianas de estos grupos, es posible apreciar que la mediana del grupo no expuesto de 0.516 es menor a la del grupo con baja exposición que fue de 0.687, Sin descartar la existencia de otras fuentes de infección a las que estas personas vegetarianas hayan estado expuestas.

La sintomatología investigada en los 349 sujetos a los que se les aplicó el cuestionario anexo, mostró que la presencia de eructos (RM=1.87 IC95% 1.13 a 3.08) y la presencia de dolor epigástrico actual (RM=2.08 IC95% 1.23 a 3.49) fueron los únicos datos clínicos al interrogatorio que mostraron asociación significativa con la presencia de niveles positivos de anticuerpos contra *H. pylori*, y estos solamente en el análisis no estratificado por la edad (No se muestran resultados por no ser objetivo de este trabajo).

Los diferentes tipos de ocupación de los sujetos entrevistados se mostró que la exposición laboral al cerdo, tiene un riesgo al menos 3 veces mayor de infección por *H. pylori*, ya sea por ser matancero o carnicero o tener otros tipos de exposición laboral al cerdo como es el manejo de cerdos vivos o de sus productos sin cocinar. El riesgo para ambos tipos de exposición laboral al cerdo fue similar no siendo posible establecer un gradiente de riesgo en las personas expuestas al cerdo, que dependiera del tipo de labor que se desempeñe con el cerdo o sus productos, probablemente esto se debió al número limitado de personas con la misma labor, en el manejo de cerdos o sus productos.

La exposición a animales vivos y no a productos sin cocinar, demostró que la exposición a vacas es un factor de riesgo para infección por *H. pylori* similar a trabajar con cerdos, esto sumado al consumo de vísceras de res que presentó una razón de momios significativa en los análisis, nos permite concluir que la res y el consumo de sus productos probablemente jueguen un papel importante en la trasmisión de *H. pylori* al humano. Actualmente no es posible explicar el porque de la relación inversa entre la exposición a caballos y la infección por *H. pylori* aunque pudiese ser que la estrecha relación entre la exposición a caballos y la no exposición a vacas explique porque la exposición a caballos es protectora para la infección por *H. pylori*.

La exposición a otros animales vivos no mostró un riesgo mayor para infección por esta bacteria.

En cuanto al consumo de los diferentes productos animales, como ya se mencionaba, solamente el consumo de "pancita" (visceras de res) es un riesgo significativo para infección por este microorganismo.

El consumo de verduras y legumbres no mostró una asociación entre el tipo y la frecuencia de su consumo con la infección por *H. pylori*, pero si el consumo de verduras mal lavadas, el cual representa un riesgo significativo para infección por esta bacteria.

Es posible que el consumo de estos productos en esas condiciones posean un papel en la transmisión de *H. pylori* al humano, y que por ello cerca de la mitad de los vegetarianos estudiados tuvieran títulos altos de anticuerpos H₂-específicos.

El consumo de lechón probablemente por ser un tipo de cerdo aun no contaminado, mostró en los diferentes análisis estadísticos, una razón de momios protectora, aunque es posible que se trate de una asociación espuria.

El análisis de las mismas variables para determinar asociación con infección por *C. jejuni*, se encontró que el ser matancero o carnicero, o el dedicarse a trabajar con cerdos o sus productos así como la exposición a cerdos vivos protege contra la infección por este microorganismo.

En contraste, el dedicarse a otro tipo de ocupación o el consumo de hígados de pollo constituyen un riesgo significativo para infección por *C. jejuni*.

Los resultados de este análisis corroboran que los factores de riesgo específicos para infección por *H. pylori* no son un reflejo de la exposición a otras bacterias como *C. jejuni*.

CONCLUSIONES.

1. La prevalencia del 27.5% de infección por *H. pylori* en cerdos, fue obtenida mediante las pruebas de diagnóstico alternativas de Inmunofluorescencia, Warthin-Starry y detección de anticuerpos Hp-específicos.

2. El cultivo de *H. pylori* en mucosa gástrica de cerdo es un procedimiento difícil, debido a la contaminación por otros microorganismos.

3. Se sugiere que el cerdo sea uno de los reservorios naturales de *H. pylori*.

4. La detección de anticuerpos específicos por el método de ELISA contra *H. pylori* es una prueba diagnóstica confiable para la infección por este microorganismo.

5. La reactividad cruzada de los anticuerpos contra *H. pylori* y *C. jejuni* fue del 8.7% sin importancia en la utilidad en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

6. La frecuencia de infección por *H. pylori* en la población general fue del 66%.

7. La exposición laboral al cerdo o a sus productos constituye un factor de riesgo para infección por *H. pylori* en el humano.

8. La exposición a bovinos y el consumo de sus vísceras son un factor de riesgo para infección por *H. pylori* en el humano

9. Probablemente las bovinos también sean un reservorio natural de *H. pylori*

10. El consumo de verduras mal lavadas es un factor de riesgo para infección por *H. pylori*

11. Las verduras mal lavadas pueden estar contaminadas con *H. pylori* y jugar un papel importante en su transmisión.

12. Es posible que *Helicobacter pylori* se transmita al humano principalmente a través de verduras y productos animales contaminados; por lo que se requiere de realizar estudios para determinar la frecuencia de aislamiento de *H. pylori* en estas posibles fuentes de infección.

B i b l i o g r a f í a

- 1.- Warren JR, Marshall BJ, Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; 1: 1273-5.
2. Marshall BJ, *Campylobacter pyloridis* Gastritis J. Infect. dis 1986 153;4:650-57.
- 3.- Bizzozero G, Ueber die schlauchformigen drüsen des magendar mkanals und die beziehungen. Arch F. mikr Anat 1893; 42:82 (citado en 1).
- 4.- Salomon H. Ueber das spidillum des saeuetieres und sein ver halten zu den belegzellen (Abstrakt 1) Zentralbl F. Bakt. 1896;19:433-42 (citado en 1).
- 5.- Steer HW, Colin-Jones DG, Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenexolone sodium GUT 1975; 16:590-7.
- 6.- Marshall BJ, Warren JR, Unidentified curved bacilli in the Stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1:1312-14.

7.- Goodwin SC, Blincow E, Peterson G, et al, Enzyme-Linked in-
munosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: Correlation with
presence of *C. pyloridis* in the gastric mucosa. J. Infect. Dis.
1987; 155;3:488-94.

8.- Lambert JR, Dunn KL, Eaves ER, et al, Pyloric CLO in the
human stomach. Med. J. Aust. 1985;143:174.

9.- Buck EG, Gourley KW, Lee KW, et al. Relation of *Campylobacter*-
pyloridis To gastritis and peptic ulcer. J. Infect. Dis.
1986;155;4:644-69.

10.- Von Wulffen H, Heeseman J, Butzow G, et al. Detection of
Campylobacter pyloridis in patients with antrum gastritis and
peptic ulcer by culture, complement fixation test and
immunoblot. J. Clin. Microbiol 1986;24; 5: 716-19.

11.-Jones DM, Lessella AM, Eldridge J, *Campylobacter*-like
organism on the gastric mucosa: Culture, histological, and
serological studies. J. Clin. Pathol 1984;37:1002-1006.

12.-Mills SD, Kurjanczyk L, Penner JL, Identification of a common
antigen among the *Campylobacters*. Abstracts of the IV
international workshop on *Campylobacter* infections 1987 Abst.
106.

13.-Newell DG, Identification of the outer membrane proteins of *Campylobacter pyloridis* and antigenic cross-reactivity between *C. pylori* and *C. jejuni* J. of Gen. Micro 1987;133:163-170.

14.-Perez-Perez GI, and Blazer MJ, Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. Infect. Immun 1987;55:1256- 63.

15.-Newell DG, Stacey AR, Hawtin PR, et al. The antigenicity of *C. pylori* urease. "the Vth international workshop on *Campylobacter* infections" feb 1989, Pto Vallarta Mex. Abst 198.

16.-Evans DJ, Evans DG, Graham DY and Klein PD. A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection .Gastroenterology 1989;96:1004-8.

17.-Weber AF, schmidfiel EF, Electron microscopic and bacteriologic studies of spirilla isolated from the fundie stomach of cats and dogs. Am. J. Vet. Res. 1962;23:422-27.

18.-Lee A, Hazell SL, O'rourke J, and Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect Immun 1988;56:11:2843-2850.

19.-Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Petersen M, Collins MD, Sly 1, McConell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacters pylori* mustelae to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Bacteriol 1989;39:397-405

20.--Kasper G, Dickgiesser N, Isolation from gastric epithelium of *Campylobacter* like bacteria that are distinct from *Campylobacter pylori* Lancet 1985;1:111-12.

21.--Brondson MA, pyloric *Campylobacter* isolated from non-human primate stomach. Abstracts of the IV international workshop on *Campylobacter* infections 1987 Abst. 27.

22.--Jones DM, and Eldridge J, Gastric *Campylobacter*-like organism (GCLO) from man (*C. pyloridis*) compared with GCLO strains from the pig, baboon, and ferret. Abstracts of the IV Int. workshop on *Campylobacter* infections 1987;Abst 72.

23.--Blazer MJ, Gastric *Campylobacter*-like organism, gastritis and peptic ulcer disease. Gastroenterol 1987;93:371-83.

24.--Bruce D, Hokey JN, and Waitking AS, Numerical classification and identification of *Campylobacter* by DNA - restriction endonuclease analysis. Abstracts of the IV international workshop on *Campylobacter* infections 1987 Abst. 208.

25.--Krawowka S, Morgan RD, Kraft GN, Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. Infect. Immun 1987;55:2789-96.

26.--Baskerville A, and Newell DG, Gastritis Associated with *Campylobacter pylori* infection in Rhesus monkey: A model for human disease. Abstracts of the IV international workshop on *Campylobacter* infections 1987 abst. 28.

- 27.- Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, and Fox J. *Helicobacter pylori* infection in Gnotobiotic Beagle Dogs Infect Immun 1990;58:2606-2612.
- 28.- Berkowicz J, Lee A, Person to person transmission of *Campylobacter pylori* Lancet 1987;2: 680-81.
- 29.- Mitchell MH, Bohane DT, Antibody to *Campylobacter pylori* in families of index children with gastrointestinal illness to *H. pylori* Lancet 1987, 2:681-82.
- 30.- Vaira D, Holyon J, Londei M, et al. *Campylobacter pylori* in abattoir workers: is it a zoonosis?. Lancet sept 24, 1988 p725-726.
- 31.- Goodwin S, Armstrong J, et al. Is *Campylobacter pylori* a zoonosis?. Lancet oct 22 1988 p968.
- 32.- McCoy EC, Doyle D, Burda X, et al, Superficial antigens of *Campylobacter (vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. Infect. Immun 1975;11:517-25.
- 33.- Wyatt JI, and Dixon MF, Chronic gastritis - A pathogenetic approach Jour. Pathol. 1988;154:113-124.
- 34.- Coghlan JG, Gilligan D, Humphries H, McKenna D, Dooley C, Sweeney E, Keane C, O'Morain C, *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcer a 12-month follow-up study. 1987 Lancet ii:1109-1111.

35.- Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R, Intestinal Infection with *Campylobacter* : A cohort study in Mexican children. Lancet 1988;I:503-506

36.- Hazel MM, Lee A, Berkowicz J, and Borody T. The use of serology to diagnose active *Campylobacter pylori* infection. Med J Aust 188;149:604-609.

37.- Graham DY, Klein PD, Opekun AR, Boutton TW, Effect of age on the frequency of active *Campylobacter pylori* infection diagnosed by [¹³C] urea breath in normal subjects and patients with peptic ulcer disease. J. Infect Dis 1988;157:777-780

38.- Dehesa M, Dooley CP, Fitzgibbons P, Cohen H, Lacus C. Prevalence and distribution of *C. pylori* in asymptomatic Hispanic population. In: Proceedings of the Fifth International Workshop on *Campylobacter* infections. Puerto Vallarta Mexico February 1989:38

39.- Jones DN, Eldridge J, Fox AJ, Sethi P, Whorwell PJ. Antibody to the gastric *Campylobacter*-like organism ("*Campylobacter pyloridis*")-Clinical correlations and distribution in the normal population. J. Med Microbiol 1986;22:57-62

I. IDENTIFICACION.

Nombre: _____

apellido paterno

apellido materno

nombre(s).

Edad: _____

Sexo: _____

Domicilio: _____

Lugar de residencia: _____

Teléfono: _____

Ocupación: _____

Antigüedad en el trabajo: _____

Lugar de captación: _____

(1) Endoscopías INNS2

(4) Carnicería

(2) Banco de sangre INN2

(5) Granja de cerdos

(3) Rastro

(6) Otro, especifique: _____

I ANTECEDENTES PATOLOGICOS:

1.- Ha tenido molestias que sugieran gastritis o úlcera ?

(1) SI (2) NO

Señale cuáles:

(1) Pirosis (agruras, acidez).

(4) Meteorismo ("muchos gases")

(2) Eructos (repetir).

(5) Regurgitaciones (que se le

(3) Dolor epigástrico

regresa la comida).

(en la boca del estómago)

(6) Vómitos.

Otros, especifique: _____

Actualmente que molestias ha tenido? _____

2.- Le han dicho alguna vez que tiene gastritis, úlcera o algún otro padecimiento relacionado con su estómago ?

(1) NO

(3) Úlcera

(2) Gastritis

(4) Hernia hiatal

Otros, especifique: _____

3.- Como se hizo el diagnóstico?

(1) Clínico

(3) Endoscopia

(2) Radiológico.

(4) Biopsia

ESTAS TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

II ALIMENTACION:

4.- Acostumbra ud. comer carne? (1) SI (2) NO ! _ !

5.- De cual (o cuáles) ? (1) Res (4) Pescado ! _ ! _ ! _ ! _ !
 (2) Cerdo (5) Cabrito ! _ ! _ ! _ ! _ ! _ !
 (3) Pollo (6) Borrego

Otros tipos, especifique: _____

6.- Desde cuando no come carne de:

(1) Res (4) Pescado ! _ ! Fecha: ! _ ! _ ! _ !
 (2) Cerdo (5) Cabrito ! _ !
 (3) Pollo (6) Borrego ! _ ! Fecha: ! _ ! _ ! _ !
 mes año

7.- Con que frecuencia come o comía ud. carne de:

(1) 3 o más veces por semana Res? ! _ !
 (2) 2 veces por semana Cerdo? ! _ !
 (3) 1 vez por semana Pollo? ! _ !
 (4) 2 veces al mes Pescado? ! _ !
 (5) 1 vez al mes Cabrito? ! _ !
 (6) No come carne Borrego? ! _ !

8.- En caso de que ud. no coma carne de cerdo, no lo hace porque ?

(1) Le produce malestar
 (2) No le gusta

Especifique : _____ ! _ ! _ ! _ !

9.- Como come ud. los siguientes productos animales?

(1) Bien cocida. (2) Termina medio (3) Cruda

Carne de res ! _ !
 Carne de pollo ! _ !
 Carne de cerdo ! _ !
 Pescado ! _ !

En caso de comer algún producto animal crudo, con que frecuencia lo consume.

Especifique: _____

10.- Que productos del cerdo consume ud.? ! _ ! _ ! _ ! _ !

(1) Sólo carne de cerdo (4) "Cueritos" (curtidos)
 (2) Lechón (5) Visceras (7) No come cerdo
 (3) Carne y chicharrón (6) Sólo jamón

11.- Come ud. vísceras de cerdo? (Nana, chorizo, longaniza, moronga, hígado, riñón, etc.)

(1) SI (2) NO

Especifique cuáles: _____

Pancita de res?

Visceras de pollo?

Especifique cuales: _____

12.- Con que frecuencia come ud. vegetales?

- (1) 3 o más veces por semana (4) 2 veces al mes
(2) 2 veces por semana (5) 1 vez al mes
(3) 1 vez por semana (6) No come vegetales

13.- Que tipos de vegetales consume ?

- (1) Leguminosas (frijol, habas, garbanzo, etc.)
(2) Tubérculos (Papa, zanahoria, betabel, etc.)
(3) Verduras (Lechuga, acelgas, berros, etc.)

14.- Como prepara los vegetales que consume ?

- (1) Los limpia meticulosamente y emplea desinfectante
(2) Sólo los lava con agua
(3) No los lava
(4) Los cuece
(5) Son enlatados

=====

III: OCUPACION

15.- Ha tenido contacto con animales en los últimos 5 años?

- (1) SI (2) NO

Especifique con que animales: _____

Especifique hace cuanto tiempo:

16.- El lugar donde ud. trabaja es:

- (1) Un rastro (3) Es una granja de cerdos
(2) Una carnicería (4) Otro lugar sin relación al cerdo
(5) Es ama de casa.

17.- En caso de trabajar con cerdos, especifique que labor desempeña con ellos: _____

18.- Tiene ud. contacto con cerdos vivos? (1) SI (2) NO

Especifique: No. de horas al día:.....
No. de días por semana:.....

19.-Si ud. tiene poco contacto con cerdos especifique:

- (1) Convive con cerdos a menos de 10 metros de su vivienda.
 - (2) Visita cerdos al menos una vez por semana.
 - (3) No tiene contacto con cerdos.
- Especifique, No. de horas al mes:.....

20.-Que tanto contacto tiene ud. con productos del cerdo no cocinados?

Especifique, No. de horas por día:.....
No. de días por semana:.....

=====

IV ESTRATO SOCIOECONOMICO.

21.-Cuanto gana ud ?..... \$

22.-Cuanto se gasta en alimentación
mensualmente en su casa ?..... \$

23.-Cuantas personas comen diariamente en su casa?..... No.

24.-Cuantas personas dependen de su salario?..... No.

=====

V EXAMENES PARACLINICOS.

Diagnóstico endoscópico: _____

Diagnóstico histológico: _____

Diagnóstico microbiológico: Ureasa: _____ Tiempo: _____

Gram: _____ Warthin-Starry _____

Cultivo: _____ Medios: _____ Tiempo: _____

ELISA (O.D.): _____