

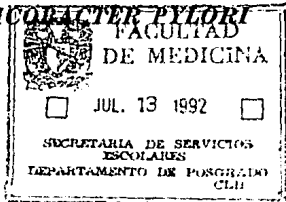
11215 10
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

UTILIDAD DE LA PRUEBA DE UREA MARCADA CON C-14 EN LA DETECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI



T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN:
GASTROENTEROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"
DRA. ELIZABETH OLIVA SANCHEZ MORALES

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	NO. PAGINA
I. ANTECEDENTES CIENTIFICOS.	1
II. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	13
III. OBJETIVOS.	14
IV. HIPOTESIS.	14
V. MATERIAL Y METODOS.	
DISEÑO DEL ESTUDIO.	15
SELECCION DE LA MUESTRA.	
A) CRITERIOS DE INCLUSION.	15
B) CRITERIOS DE EXCLUSION.	16
PROCEDIMIENTOS DE EVALUACION.	
A) HISTORIA CLINICA.	16
B) PANENDOSCOPIA.	17
C) TINCION DE HEMATOXILINA Y EOSINA.	17
D) METODO DE WARTHIN-STARRY	20
E) PRUEBA DE ALIENTO CON UREA MARCADA CON C-14	22
EJECUCION DEL ESTUDIO.	24
ANALISIS DE LOS DATOS.	25
VI. RESULTADOS.	26
VII. DISCUSION.	30
VIII. CONCLUSIONES.	35
IX. BIBLIOGRAFIA.	36

UTILIDAD DE LA PRUEBA DE UREA MARCADA CON C-14 EN
LA DETECCION DE HELICOBACTER PYLORI

HELICOBACTER PYLORI

En 1983 cuando Warren y Marshall aislaron exitosamente al *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica inflamada de humanos y lo caracterizaron parcialmente (1,2), el microorganismo fue propuesto como causa de la gastritis histológicamente demostrable. Sin embargo, la detección microscópica de bacilos helicoidales en mucosa gástrica se remonta a casi un siglo atrás, ya que en 1893 en forma incidental, se encontraron a estos bacilos en los estómagos de perros (3), posteriormente en ratas y gatos (4). En 1906 se descubrieron, pero no se aislaron, microorganismos similares en pacientes con carcinoma gástrico ulcerado (5); éste fue el primer informe en humanos, al que le siguieron otros más. En 1983 Warren (1) informó el hallazgo de un bacilo curvo, no identificado, en contacto estrecho con el epitelio de biopsias gástricas que mostraban gastritis crónica activa. En un comunicado adicional, Marshall (2) describió el cultivo de esta bacteria a partir de biopsias antrales, utilizando las técnicas para aislar *Campylobacter*. De aquí que el bacilo recibió el nombre de *Campylobacter pyloridis* (6), y fue conocido por un tiempo como *Campylobacter pylori*; su nombre actual es el de *Helicobacter pylori* (7).

El *Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo, curvo o helicoidal (1) que mide 2.5 um por 0.5 um (2) y que tiene cuatro flagelos en uno de sus extremos (2,11). Es oxidasa y catalasa positivo (10,12). Para su crecimiento requiere de un medio con almidón, suero o carbón (13). Es sensible a diversos antimicrobianos incluyendo penicilina G, eritromicina, tetraciclina, metronidazol, tinidazol y gentamicina y es resistente al trimetoprim con sulfametoxazol, ácido nalidixico y vancomicina (14-17). Es sensible también a las sales de bismuto y resistente a la acción de los bloqueadores H2, carbenoxolona, sucralfato y antiácidos (14-15,17,18).

Se localiza por abajo de la capa de moco del estómago humano (18) donde se protege del ácido gástrico (19-20), al cual es sensible (21,22). Tiende a agruparse en los espacios intercelulares del epitelio gástrico verdadero y en el epitelio de metaplasia gástrica en el esófago (esófago de Barrett) o de duodeno (23,24). No se encuentra en sangre y excepcionalmente se ha descrito en otros órganos de la economía (25-27).

Diversas investigaciones sobre sus características taxonómicas lo separaron del resto de campylobacters. Así, el patrón único en la estructura de sus ácidos grasos, sus características de crecimiento, la secuencia de su RNA y de sus enzimas (28), y su alto contenido de ureasa endógena son algunas de ellas. La primera descripción sobre la presencia

de la actividad de ureasa localizada en estómago fue por Luck y Seth (8) en 1924. Estudios en humanos (9) confirmaron una asociación entre la presencia de la enzima y enfermedad ulcerosa; finalmente Langerberg (10) detectó al *Helicobacter pylori* como productor de ureasa. Esta propiedad puede tener importantes implicaciones patogénicas y se ha utilizado en el desarrollo de pruebas diagnósticas para la presencia del organismo en mucosa gástrica (29-30). La ureasa está compuesta de dos subunidades de aproximadamente 30-60 Kd, cuyos genes han sido secuenciados (31-32).

El mecanismo de transmisión de la bacteria se desconoce; sin embargo, es probable que ocurra de persona a persona (33).

HELICOBACTER PYLORI Y ENFERMEDAD ACIDO PEPTICA

Inicialmente se informó (12) la presencia de *Helicobacter pylori* en el 87% de los casos de úlcera péptica, en el 55% de gastritis y en el 50% de normales. Estudios posteriores han demostrado que casi todos los sujetos a los cuales se les aísla *Helicobacter pylori* de la mucosa antral, tienen gastritis histológicamente demostrable, correlacionando el número de bacterias con la intensidad de la gastritis, especialmente con la gastritis crónica activa (34-41,44). La gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* se conoce como gastritis tipo B, con objeto de distinguirla de la gastritis

encontrada en la anemia perniciosa (tipo A) (43).

La gastritis antral se encuentra en una proporción alta de los pacientes con úlcera gástrica y/o duodenal. El *Helicobacter pylori* se ha encontrado en el antro en >95% de los pacientes con úlcera duodenal, en el 75% de los que presentan úlcera gástrica; en el 50% de los sujetos con dispepsia no ulcerosa y en el 20% de normales (44).

La prevalencia de *Helicobacter* en la población normal, aumenta con la edad. Se ha observado, que la raza y el grupo étnico son factores que se asocian a una mayor frecuencia y aparición a edad más temprana de la infección por *Helicobacter pylori* en sujetos sanos (42).

Se han descrito tres patrones de gastritis crónica activa en pacientes con *Helicobacter pylori*: 1) Gastritis crónica activa en el antro asociada a mucosa normal. 2) Gastritis crónica activa dispuesta en "parches" conjuntamente con áreas que presentan gastritis crónica y áreas de mucosa normal. 3) Gastritis crónica activa presente en todo el estómago (21,39).

ETIOPATOGENIA DE LA GASTRITIS ASOCIADA A *HELICOBACTER PYLORI*

La relación etiológica entre *Helicobacter pylori* y gastritis, se ha confirmado siguiendo los postulados de Koch, los criterios de Bradford Hill (45) y mediante la detección de

respuestas inmunes relacionadas con infección.

La gastritis asociada a *Helicobacter pylori* puede reflejar la colonización de un tejido inflamado por otra causa o puede representar una infección bacteriana primaria. Existen argumentos para sostener la teoría de infección primaria: El hecho de que la inoculación de *Helicobacter pylori* condujo a colonización en cerdos (46-48), y la evidencia de dos sujetos que ingirieron intencionalmente *Helicobacter pylori* presentando una respuesta inflamatoria intensa con neutrófilos abundantes, primero en el antro y luego en el cuerpo del estómago (49-50). En uno la infección y la inflamación se resolvieron espontáneamente. En el segundo, la infección se asoció con hipoclorhidria, y aunque la secreción ácida se normalizó, el sujeto presentó gastritis crónica (50). Se ha sugerido que *Helicobacter pylori* puede producir una proteína capaz de inhibir la función de células parietales (51).

La evidencia indirecta que sugiere que el microorganismo causa gastritis, viene de estudios en los cuales se administraron antibióticos a sujetos con gastritis asociada a *Helicobacter pylori*. Hubo una relación muy clara entre supresión o erradicación del microorganismo y resolución de la gastritis (38,44,52,53). Por otra parte, la reacción inflamatoria como respuesta a la infección por *Helicobacter pylori*, que incluye linfocitos T y células plasmáticas, se acompaña de una respuesta humoral intensa con Acs IgA e IgG (54,55).

Se ha investigado mucho sobre los factores virulentos que permiten al *Helicobacter pylori* escapar de las propiedades bactericidas del ácido gástrico, colonizar al epitelio gástrico, dañar a las células epiteliales e inducir una respuesta inflamatoria, tales factores incluyen: motilidad (56), presencia de proteasas (57), fosfolipasas (58), citocinas (59,60), citotoxinas (61), y ureasa (62-64). Se ha sugerido que la ureasa protege al *Helicobacter pylori* del efecto bactericida del ácido (64); otros autores proponen que mejora la adherencia bacteriana (65).

En términos generales se acepta que *Helicobacter pylori* causa gastritis, sin embargo, existe controversia si la gastritis por *Helicobacter* es realmente una enfermedad que conduzca a síntomas.

METODOS DE DETECCION DEL HELICOBACTER PYLORI

Actualmente se cuenta con técnicas directas e indirectas para la detección de *Helicobacter pylori*, las cuales pueden dividirse en cinco categorías: 1) Examen histológico, 2) Cultivo de las biopsias, 3) Examen serológico, 4) Prueba rápida de ureasa y 5) Pruebas de aliento con urea marcada con isótopos de carbono.

1) ESTUDIOS HISTOLOGICOS. Se han utilizado las tinciones de plata de Warthin Starry (35), Gimsa (56).

Hematoxilina-Eosina (12,67), Gram (68) y en menor proporción las siguientes técnicas y métodos histológicos: Naranja de acridina (69), microscopio de contraste de fases (70) y técnicas inmunohistoquímicas (71).

De todas las tinciones utilizadas, la de Warthin Starry es la mejor para identificar al microorganismo; con una sensibilidad hasta del 90% (35). La menos sensible es la de Hematoxilina-Eosina (12-67).

Este método tiene la desventaja de requerir un procedimiento invasivo (panendoscopia) para obtener la biopsia de mucosa gástrica. Sin embargo, a pesar de la naturaleza invasiva de la endoscopia, este procedimiento, permite la identificación de enfermedad macroscópica asociada a *Helicobacter pylori*, como úlcera péptica o gastritis.

Debido a que existe poca correlación entre el aspecto macroscópico de la mucosa y la presencia de gastritis histológica el examen endoscópico no puede usarse para la detección de gastritis (72); por tal motivo cuando el examen histológico se usa para identificar *Helicobacter pylori*, en forma simultánea puede confirmarse la presencia de gastritis; por lo tanto, deberá emplearse la tinción de Hematoxilina Eosina para identificar el grado de gastritis y la de Warthin Starry, específica para la bacteria.

2) CULTIVO. El aislamiento de *Helicobacter pylori*

mediante el cultivo de la biopsia de mucosa gástrica, es un procedimiento complicado, por la naturaleza del microorganismo y por un gran número de factores difíciles de controlar.

Se han utilizado los medios de agar chocolate, de Skirrow y Skirrow modificado; que tienen una sensibilidad del 77 al 94% (35,73,74).

Este método, combina las desventajas de requerir un procedimiento invasivo (panendoscopia) y la larga espera para obtener los resultados.

3) EXAMEN SEROLOGICO. Se han detectado anticuerpos contra *Helicobacter pylori* en suero mediante procedimientos de aglutinación bacteriana, fijación de complemento y ELISA. De estos tres métodos, ELISA es el más recomendable (75,76). Informándose una sensibilidad hasta del 94% (34).

Debido a que estas pruebas serológicas son indirectas y dependen de la función del sistema inmunológico del huésped, tienen problemas inherentes. Los individuos en un estadio inicial de la infección, pueden tener niveles no detectables de anticuerpos, y una vez que la infección se ha establecido el grado de respuesta con anticuerpos, parece estar en función al número de microorganismos. Además, una vez que se ha establecido la reacción Ag-Ac, no se resuelve concomitantemente con la erradicación de la bacteria; pueden detectarse bajos niveles de anticuerpos IgG durante varios

años, después de haberse resuelto la infección. Finalmente, de acuerdo al antígeno utilizado en estas pruebas, pueden obtenerse reacciones cruzadas con *C. jejuni*.

4) PRUEBA RAPIDA DE UREASA. Esta prueba se basa en la producción de ureasa por *Helicobacter pylori*; la ureasa degrada a la urea en amonio y bicarbonato resultando en un incremento del pH en el medio, actividad que puede detectarse mediante indicadores de pH.

El agar de Christensen se desarrolló en 1946 para la detección de ureasa en microorganismos (77). Mc Nulty y Wise (29) describieron la primer prueba rápida de ureasa para *Helicobacter pylori*.

El CLO test (Delta West, Perth, Australia Oeste) disponible comercialmente, es una prueba rápida de ureasa en agar de Christensen modificado; desarrollada por Marshall (78). Con esta prueba se ha informado una sensibilidad y especificidad hasta del 100% , pero disminuyó notablemente cuando la biopsia se tomó del fondo gástrico (10).

La mayor ventaja de la prueba rápida de ureasa sobre el examen histológico y los demás métodos descritos, es la rapidez con la cual se obtienen los resultados, sin embargo requiere de panendoscopia, existe el error de muestreo y cuando la biopsia presenta escasos microorgrnismos, puede dar falsos negativos.

5) PRUEBA DE ALIENTO CON UREA MARCADA CON ISOTOPOS DE CARBONO.

Este es un método no invasivo, comparable con la biopsia de estómago (quizá superior, ya que evita el error de muestreo), en la detección de *Helicobacter pylori*; relativamente nueva, en términos generales la tendencia es a utilizar la menor cantidad de radioisótopo, y abreviarla al menor tiempo posible, además de realizar análisis adecuados que nos permitan establecer el punto de corte óptimo para considerar a una prueba como positiva o negativa.

Al igual que la prueba rápida de ureasa, las pruebas de aliento con isótopos, dependen de la actividad de la ureasa del *Helicobacter pylori*. La ureasa al romper a la urea permite la liberación de CO₂, el cual se absorbe y finalmente se exhala; de esta manera la degradación gástrica de la urea marcada con C¹⁴, puede medirse en el aire espirado. Se han descrito dos pruebas de aliento basadas en este concepto (79,80).

Graham y colaboradores describieron la prueba de aliento utilizando urea marcada con Carbono-13 (79).

La prueba de aliento utilizando urea marcada con Carbono-14 (C-14) fue descrita por Marshall y Surveyor (80). Esta prueba tiene las ventajas de no ser invasiva, evita el error de muestreo en las biopsias, además que permite seguir al paciente después del tratamiento.

La prueba de aliento con urea marcada con C-14, no implica ningún riesgo de contaminación radioactiva, ya que según la Asociación Internacional de Energía Atómica, la dosis máxima permisible para este isótopo es de 6.6×10^2 microcuries, mientras que en la prueba se administran únicamente 10 microcuries, dosis menor que la radiación recibida por un sujeto que se someta a un estudio radiológico de rutina (81).

Sabemos que la prueba ideal deberá detectar al agente causante sin generar falsos positivos, y por la pobre correlación entre el cuadro clínico y gastritis (82-83), deberá detectar no sólo al microorganismo, sino también a la enfermedad: gastritis histológica. Hasta el momento, únicamente mediante el estudio histológico de la mucosa; estamos capacitados para detectar tanto al *Helicobacter pylori* como a la gastritis histológica.

La dificultad para definir a la gastritis asociada a *Helicobacter pylori* de otra manera que no sea por métodos histológicos, es un argumento a favor de su utilización como estándar de oro, sin olvidar que es un método invasivo y tiene además el error de muestreo. Por tal motivo las pruebas alternativas para el diagnóstico de gastritis asociada a *Helicobacter pylori* juegan un papel importante en la investigación.

ERRADICACION DE HELICOBACTER PYLORI

Entre los medicamentos utilizados para erradicar al

Helicobacter pylori, se encuentran los siguientes: Las sales de bismuto, que administradas solas, suprimen al microorganismo, pero resulta en una erradicación a largo plazo en un 10% de los pacientes (84). El uso de tinidazol o metronidazol solos, conducen a resistencia a las drogas en un número considerable (53); sin embargo la combinación de nitroimidazoles con sales de bismuto y otro antibiótico, disminuyen la incidencia de resistencia y los porcentajes de erradicación alcanzan el 75% (85,86). Algunos investigadores sugieren tratamiento triple con metronidazol, bismuto y amoxicilina, aunque aún no está claro que tal régimen sea más efectivo que el tratamiento doble (84,85). Entre los esquemas de tratamiento doble se encuentra el de subsalicilato de bismuto a la dosis de 2.1 g/día/6 semanas, asociado a amoxicilina aplicada en dosis de 2 g/día/2 semanas.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dadas las ventajas de la prueba de la urea discutidas con anterioridad, la atención se ha centrado en su estandarización y optimización. Ello explica esfuerzos recientes (el presente entre ellos) dedicados a su validación en diferentes medios, o a la búsqueda de la dosis de radioisótopo y tiempo de seguimiento mínimos necesarios.

Por otra parte, en términos generales se acepta al *Helicobacter pylori* como agente etiológico de la gastritis tipo B, se desconoce si este tipo de gastritis es capaz de generar síntomas, de ahí la necesidad de investigar si existe un cuadro clínico común en este tipo de pacientes.

Se ha informado que la erradicación del bacilo en pacientes con gastritis crónica activa asociada a *Helicobacter pylori*, resulta en mejoría clínica, endoscópica, e histopatológica, con negativización de la prueba con urea marcada con C-14. Se han propuesto diversos esquemas terapéuticos para su erradicación, por lo que consideramos importante reproducir estos datos, utilizando un esquema doble de tratamiento.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO:

1) Determinar la utilidad de la prueba de aliento con urea marcada, en la detección de *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1) Determinar los signos y síntomas que caracterizan a los pacientes con gastritis asociada a *Helicobacter pylori*.

2) Evaluar la respuesta clínica, endoscópica, histopatológica y mediante la prueba de aliento, posterior a la administración de un esquema doble de tratamiento para erradicar al bacilo.

HIPOTESIS

Para la detección de *Helicobacter pylori*, la prueba de aliento con urea marcada con carbono 14 es tan válida como el estudio histopatológico.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Es un estudio observacional, transversal, comparativo, y prolectivo.

Para valorar la respuesta al tratamiento, se incluyó una fase de seguimiento de pacientes posterior al estudio transversal.

SELECCION DE LA MUESTRA:

Para determinar la prevalencia de la gastritis asociada a *Helicobacter pylori*, previo consentimiento informado se incluyeron a 105 pacientes de la consulta externa del servicio de Gastroenterología que por la naturaleza y magnitud de su sintomatología ácido-péptica ameritaron de estudio endoscópico.

A) Criterios de inclusión:

1. Pacientes de ambos sexos.
2. Mayores de 18 años de edad.
3. Con cuadro sintomático de dispepsia, incluyendo: náusea, vómito, agruras, ardor retroesternal, llenura y eructos.

4. Firmar hoja de consentimiento informado.

B) Criterios de exclusión:

1. Pacientes que hayan recibido durante las 4 semanas previas al estudio: esteroides, AINES, antibióticos, anticoagulantes, amoxicilina o sales de bismuto.
2. Pacientes con coagulopatias.
3. Pacientes alérgicos a la penicilina.
4. Pacientes embarazadas o lactantes.
5. Pacientes con cirugía gástrica previa.

PROCEDIMIENTOS DE EVALUACION:

A) Historia clínica:

Los datos recabados fueron los siguientes:

- 1) Nombre, registro, edad, sexo.
- 2) Cuadro clínico: Tiempo de evolución. Presencia o ausencia de los siguientes síntomas: náusea, vómito, agruras, ardor retroesternal, plenitud postprandial, dolor epigástrico, regurgitaciones y eructos.
- 3) Exámenes generales: BH, QS, EGO, PFH, TP y plaquetas.

B) Panendoscopia:

Estando el paciente en ayunas, era sometido a endoscopia esofagogastroduodenal, describiendo los hallazgos y tomando 2 biopsias de la región antral. Las biopsias eran enviadas a Patología donde se incluían en una cápsula, tificándose una preparación con Hematoxilina-Eosina y otra con la técnica de Warthin-Starry.

C) Tinción de Hematoxilina y Eosina (87).

FIJACION: Puede utilizarse cualquier método de fijación.

TECNICA: Una vez incluido el tejido en parafina, se cortan secciones a 6 micras.

SOLUCIONES:

HEMATOXILINA DE HARRIS

Cristales de Hematoxilina	5.0 g
Alcohol, 95%	50.0 ml
Amonio.....	100.0 g
Agua destilada.....	1000.0 ml
Oxido de mercurio.....	2.5 g

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol, mediante calor, el amonio en agua. Se mezclan las dos soluciones. La

mezcla se hierve rápidamente, se saca del fuego y se le agrega el óxido de mercurio. Se recalienta hasta que tome un color morado, aproximadamente 1 min. Se retira del fuego y se introduce en un depósito con agua fría. La solución está lista para utilizarse en cuanto se enfría. Se pueden agregar 2 a 4 ml de ácido acético a 100 ml de la solución.

ALCOHOL ACIDO

Alcohol, 70%.....	1000.0 ml
Acido clorhidrico concentrado.....	10.0 ml

SOLUCION DE AMONIACO

Agua corriente.....	1000.0 ml
Amoniaco concentrado.....	2 a 3 ml

CARBONATO DE LITIO SATURADO

Carbonato de litio	1.0 g
Agua destilada.....	100.0 ml

SOLUCION DE EOSINA ALCOHOLICA

Eosina Y, soluble en agua	2.0 g
Agua destilada	160.0 ml

SOLUCION DE LUGOL

Ioduro de Potasio	2.0 g
-------------------------	-------

Cristales de Iodo	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

SOLUCION DE ALCOHOL IODADO

Cristales de Iodo	1.0 g
Alcohol, 95%	100.0 ml

SOLUCION DE TIOSULFATO DE SODIO

Tiosulfato de sodio	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml

PROCEDIMIENTO:

1. Xilol, alcohol absoluto, alcohol al 95%.
 2. Si las secciones están fijadas con Zenker, tratarlas con solución de lugol 10 a 15 min. Lavarlas con agua corriente, tratarlas con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 min. Lavarlas con agua corriente.
 3. Hematoxilina de Harris durante 15 min.
 4. Lavar en agua corriente.
 5. Introducir rápidamente en alcohol ácido 3 a 10 veces.
- Checar en el microscopio (los nucleos deben distinguirse del fondo claro).

6. Lavar brevemente en agua corriente.

7. Bañar en la solución de amonio o en la de carbonato de litio saturada hasta que las secciones adquieran color azul claro.

8. Lavar en agua corriente 10 a 20 min.

9. Teñir con eosina de 15 seg a 2 min dependiendo del tiempo de la eosina y de la intensidad del teñido deseado.

10. Alcohol, 95%.

11. Alcohol absoluto (por lo menos dos cambios).

12. Xilol (2 cambios).

13. Montar en bálsamo.

RESULTADOS: Núcleo - azul

Citoplasma - rosa.

D) Método de Warthin-Starry (87).

FIJACION: Formalina, 10%.

TECNICA: Se cortan secciones de parafina a 5-8 micras.

SOLUCIONES:

AGUA ACIDULADA

Un litro de agua acidulada triple con una solución

débil de ácido cítrico (1% o menos) para llevar la solución a un pH de 3.8 a 4.4.

SOLUCION DE NITRATO DE PLATA AL 2% (Para revelar)

Cristales de nitrato de plata..... 2.0 g
Agua acidulada.....100.0 ml

SOLUCION DE NITRATO DE PLATA AL 1% (Para impregnar)

Cristales de nitrato de plata 1.0 g
Agua acidulada 100.0 ml

SOLUCION DE HIDROQUINONA AL 0.15%

Cristales de hidroquinona 0.15 g
Agua acidulada 100.0 ml

SOLUCION DE GELATINA AL 5%

Gelatina 10.0 g
Agua acidulada 200.0 ml

PROCEDIMIENTO:

1. Pasar las secciones através de xilol, alcohol y agua triple destilada. Enjuagar dos veces en agua destilada. (Para los pasos 2 y 3 tomar las secciones con forceps bañados en parafina).

2. Colocar en la solución al 1% de nitrato de plata a 43 GC durante 30 min.

3. Cubrir las secciones con el revelador en el orden dado.

REVELADOR

Agua acidulada en nitrato de plata al 2%	1.50 ml
Gelatina en agua acidulada al 5%	3.75 ml
Hidroquinona al 0.15%	2.0 ml

Las secciones se dejan en el revelador hasta que toman un color café claro o amarillo. En el microscopio las espiroquetas se verán negras en fondo café claro o amarillo.

4. Enjuagar rápidamente en agua caliente (a 56 GC).

5. Enjuagar en agua destilada, deshidratar en pasos sucesivos através de alcohol.

6. Aclarar con 2 cambios de xilol.

7. Montar.

RESULTADOS: Espiroquetas - negras.

Fondo - amarillo a café claro.

E) Prueba de aliento con urea marcada con C-14 (88).

REACTIVOS:

- Urea marcada con C-14

- Sol. alcohólica al 10%.
- Sol. de Hidróxido de Hiamina de New England Nuclear: 1N o 1M.
- Sol. Agua-Sol de New England Nuclear.
- Sol. indicadora de Timolftaleina al 1%.

En un vaso encerado medir 10 mls de alcohol al 10%, agregar 1 ml de urea marcada con C-14, que corresponde a 10 microcuries y 22.2×10^6 dpm. esta solución se le da a tomar al paciente en ayunas.

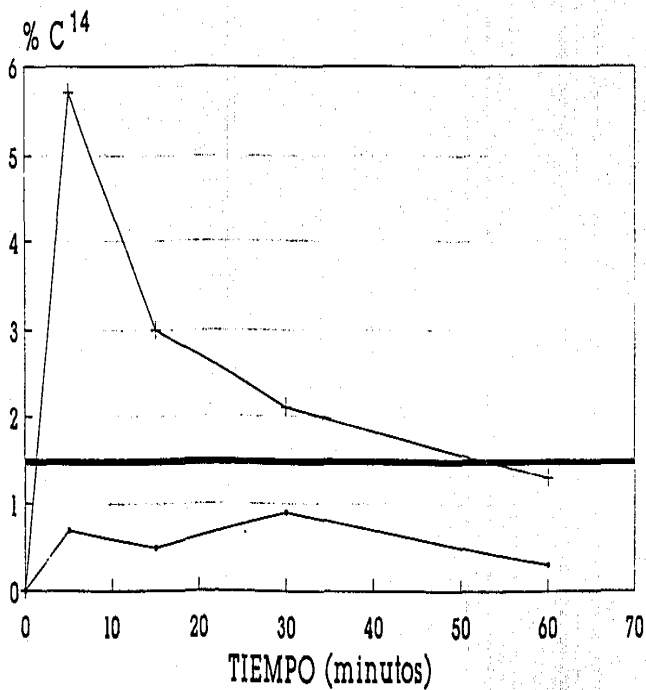
En un frasco de centelleo se colocan 1.5 mls de hiróxido de hiamina, 1.5 mls de alcohol absoluto, 10 ml de Agua-Sol y una gota de timolftaleina y através de una pipeta Pasteur se le hace soplar al paciente hasta que la solución ha captado cantidades equimoleculares de CO2 marcado por efecto de la hiamina. Estas recolecciones se efectúan a los 5, 15, 30 y 60 min.

Los cuatro frascos se pasan a un contador de emisiones beta junto con el estándar de C marcado con dpm conocidas, durante 10 min.

Posteriormente de acuerdo con la lectura que dé el contador de emisiones beta para cada uno de los frascos, se efectúan los cálculos siguientes:

$$\text{Excreción en tiempo} = \frac{\text{dpm/mmol CO}_2 \text{ (muestra)} \times 100 \times \text{Kg}}{\text{dpm administradas.}}$$

PRUEBA DE UREA



—+ Negativo + Positivo

Donde:

- dpm/mmol CO₂ (muestra)
- 100 factor para porcentaje.
- Kg peso corporal del individuo.
- dpm administradas= 22.2×10^6 dpm (de tablas).

Se considera como prueba positiva cuando el resultado es igual o mayor a 1.6. (88).

En la Gráfica 1, ejemplificamos una curva positiva y otra negativa con determinaciones a los 5, 15, 30 y 60 min.

EJECUCION DEL ESTUDIO

Una vez seleccionado el paciente, se le solicitó su consentimiento informado, procediéndose a efectuar historia clínica orientada hacia su problema ácido-péptico. Se le actualizaron sus exámenes generales, incluyendo tiempos de coagulación. Posteriormente se le dió cita para estudio panendoscópico con toma de biopsias, las cuales eran enviadas al servicio de Patología para valorar presencia o no de gastritis crónica activa asociada a *Helicobacter pylori*. Al día siguiente de la endoscopia se le efectuó la prueba de aliento con urea marcada con C-14. Si el paciente resultaba con biopsia y/o prueba de aliento positiva se le iniciaba tratamiento con amoxicilina 2g/día durante 2 semanas y

subsalicilato de bismuto 2.1 g/día durante 6 semanas; al final del tratamiento se sometía nuevamente a evaluación clínica, endoscópica con toma de biopsias y prueba de aliento con urea marcada con C-14.

La evaluación endoscópica, histopatológica y mediante prueba de aliento con urea marcada, se realizaron en forma ciega, es decir, el endoscopista, el patólogo y el químico, desconocían la identidad de los pacientes.

ANALISIS DE LOS DATOS

La validación de la prueba de aliento con urea marcada se efectuó mediante el cálculo de los valores de exactitud, sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%, considerando como estándar de oro a los hallazgos histopatológicos.

La exploración de factores predictores de la presencia de *Helicobacter pylori* se realizó por medio de χ^2 para tablas de contingencia.

RESULTADOS

Se estudiaron 105 pacientes; 36 hombres y 69 mujeres, con edad promedio de 53 años. Todos con cuadro sintomático de dispepsia: en 85 pacientes se presentó dolor epigástrico, en 32 plenitud postprandial, en 63 agruras, en 29 dolor retroesternal, en 39 distensión abdominal difusa y en 44 náusea y/o vómito. En la evaluación endoscópica: en 36 se presentó gastritis folicular, en 53 gastritis petequeial, en 71 gastritis antral, en 34 gastritis en cuerpo, en 28 gastritis en fundus, en 14 úlcera gástrica, y en 7 úlcera duodenal. En la evaluación histopatológica: en 85 se presentó gastritis activa y en 5 cáncer.

En función a los tres estándares considerados, específicamente: a) Tinción de Hematoxilina-Eosina, b) Tinción de Hematoxilina-Eosina más respuesta a tratamiento y c) Tinción de Warthin-Starry, la prevalencia del *Helicobacter pylori* en el grupo estudiado osciló entre el 70% y 74%. (Figuras 1-3).

De los 73 pacientes con tinción de Hematoxilina-Eosina positiva, cuatro tuvieron una prueba de aliento negativa, dando por resultado una sensibilidad de la prueba del 95% (95% IC: 87%- 98%). De los 32 pacientes con tinción negativa, 12 tuvieron una prueba de aliento positiva, resultando en una especificidad del 63% (95% IC: 44%-79%). Considerando los 81 pacientes con prueba de aliento positiva,

TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA

	Positiva	Negativa
Positiva	69	12
Negativa	4	20

PRUEBA DE
LA UREA

Sensibilidad = 0.95 (0.87-0.98)

Especificidad = 0.63 (0.44-0.79)

V.Predictivo(+) = 0.85 (0.76-0.92)

V.Predictivo(-) = 0.83 (0.63-0.95)

Exactitud = 0.85 (0.76-0.91)

Prevalencia = 0.70 (0.60-0.78)

Figura 1.

69 tuvieron tinción de Hematoxilina-Eosina positiva para Helicobacter, dando un valor predictivo positivo de 85% (95% IC: 76%-92%). De los 24 pacientes con prueba de aliento negativa, 20 tuvieron tinción negativa, resultando en un valor predictivo negativo del 83% (95% IC: 63%-95%). En 89 casos los resultados de la prueba de aliento y los de la tinción de Hematoxilina-Eosina coincidieron, resultando en una concordancia o exactitud del 85% (95% IC: 76%-91%) (Figura 1).

Se observó que cinco pacientes que habían resultado biopsia negativos con tinción de Hematoxilina-Eosina, presentaron buena respuesta al tratamiento, por lo que, se consideraron como verdaderos positivos, en base a lo anterior, se decidió comparar la prueba de aliento con la tinción de Hematoxilina-Eosina y respuesta a tratamiento. De esta manera, de los 78 pacientes con tinción de Hematoxilina-Eosina positiva y buena respuesta a tratamiento, cuatro tuvieron una prueba de aliento negativa, dando por resultado una sensibilidad de la prueba del 95% (95% IC: 87%-99%). De los 27 pacientes con tinción y respuesta a tratamiento negativas, siete tuvieron una prueba de aliento positiva, resultando en una especificidad del 74% (95% IC: 54%-89%). Considerando los 81 pacientes con prueba de aliento positiva, 74 tuvieron tinción de Hematoxilina-Eosina positiva con buena respuesta a tratamiento para Helicobacter pylori, dando un valor predictivo positivo de 91% (95% IC: 83%-96%). De los 24 pacientes con prueba de aliento negativa, 20 tuvieron tinción negativa, resultando en

TINCION CON
HEMATOXILINA-EOSINA
Y TRATAMIENTO

Positivos Negativos

PRUEBA DE LA UREA	Positiva	74	7
	Negativa	4	20

Sensibilidad = 0.95 (0.87-0.99)

Especificidad = 0.74 (0.54-0.89)

V.Predictivo(+) = 0.91 (0.83-0.96)

V.Predictivo(-) = 0.83 (0.63-0.95)

Exactitud = 0.90 (0.82-0.95)

Prevalencia = 0.74 (0.65-0.82)

Figura 2.

un valor predictivo negativo del 83% (95% IC:63%-95%). En 94 casos los resultados de la prueba de aliento y los de la tinción de Hematoxilina-Eosina más respuesta a tratamiento coincidieron, resultando en una concordancia o exactitud del 90% (95% IC:82%-95%) (Figura 2).

De los 76 pacientes con tinción de Warthin-Starry positiva, uno tuvo prueba de aliento negativa, dando por resultado una sensibilidad de la prueba del 99% (95% IC: 93%-100%). De los 29 pacientes con tinción negativa, seis tuvieron una prueba de aliento positiva, resultando en una especificidad del 79% (95% IC: 60%-92%). Considerando los 81 pacientes con prueba de aliento positiva, 75 tuvieron tinción de Warthin-Starry positiva para Helicobacter, dando un valor predictivo positivo del 93% (95% IC: 85%-97%). De los 24 pacientes con prueba de aliento negativa, 23 tuvieron tinción negativa, resultando en un valor predictivo negativo del 96% (95% IC: 79%-100%). En 98 casos los resultados de la prueba de aliento y los de la tinción de Warthin-Starry coincidieron, en consecuencia la concordancia o exactitud resultó en 93% (95% IC: 87%-97%) (Figura 3).

De los 18 datos clínicos (sexo, edad, dolor, plenitud, agruras, pirosis, distensión, náusea, vómito), endoscópicos (gastritis folicular, gastritis petequeial, gastritis antral, gastritis en cuerpo, gastritis en fundus, úlcera) e histopatológicos (gastritis activa, cáncer), sólo

TINCION DE WARTHIN-STARRY

	Positiva	Negativa
Positiva	75	6
Negativa	1	23

PRUEBA DE
LA UREA

Sensibilidad = 0.99 (0.93-1.00)

Especificidad = 0.79 (0.60-0.92)

V.Predictivo(+) = 0.93 (0.85-0.97)

V.Predictivo(-) = 0.96 (0.79-1.00)

Exactitud = 0.93 (0.87-0.97)

Prevalencia = 0.72 (0.63-0.81)

Figura 3.

tres de ellos resultaron predictivos de la presencia/ausencia de *Helicobacter pylori*, específicamente gastritis activa ($p=0.001$), gastritis folicular ($p=0.001$) y gastritis antral ($p=0.001$) (Tabla 1). La gastritis activa, se presentó en 68 de 76 pacientes del grupo con *Helicobacter pylori* y en 17 de 29 pacientes del grupo sin *Helicobacter pylori*. La gastritis folicular se detectó en 34 de 76 pacientes del grupo con *Helicobacter pylori* y en 2 de 29 pacientes del grupo sin *Helicobacter pylori*. La gastritis antral, se encontró en 59 de los 76 pacientes del grupo con *Helicobacter pylori* y en 12 de 29 pacientes del grupo sin *Helicobacter pylori*.

De los 85 pacientes con biopsia con tinción de Hematoxilina-Eosina y/o prueba de urea anormal, se eliminaron para tratamiento a 3: uno por linfoma gástrico, otra por tumor neuroendócrino en estómago y uno más por metástasis hepáticas y primario en pulmón. De esta manera, recibieron tratamiento con amoxicilina y sales de bismuto 82 pacientes. De los 56 pacientes, en quienes la biopsia y la prueba de urea se normalizaron, 7 persistieron con síntomas. De los 12 pacientes, en quienes la biopsia y la prueba de urea no se normalizaron, 8 continuaron sintomáticos. Sin embargo, 14 pacientes no acudieron a sus estudios de control; 6 eran foráneos, cuatro no quisieron someterse a nueva panendoscopia y 4 no cumplieron con el tratamiento.

PRESENCIA/AUSENCIA DE H.PYLORI

- VALOR PREDICTIVO DE 18 FACTORES -

FACTOR	WARTHIN-STARRY(+)	WARTHIN-STARRY(-)	VALOR 'P'
	n = 78	n = 29	
SEXO	38.84 %	27.59 %	0.501
DOLOR	88.53 %	79.31 %	0.623
PLENITUD	27.63 %	37.93 %	0.426
AGRURAS	64.47 %	48.28 %	0.195
PIROSIS	30.26 %	20.69 %	0.456
DISTENSION	40.79 %	27.59 %	0.302
NAUSEA/VOMITO	43.42 %	37.93 %	0.788
GASTRITIS ACTIVA	89.47 %	58.62 %	0.001
GASTRITIS FOLICULAR	44.74 %	6.90 %	0.001
GASTRITIS PETEQUAL	50.00 %	61.72 %	0.901
GASTRITIS ANTRAL	77.63 %	41.38 %	0.001
GASTRITIS EN CUERPO	34.21 %	17.24 %	0.142
GASTRITIS EN FUNDUS	28.96 %	20.69 %	0.536
ULCERA	18.42 %	20.69 %	0.912
ULCERA GASTRICA	11.84 %	17.24 %	0.674
ULCERA DUODENAL	7.89 %	3.45 %	0.693
CANCER	2.63 %	10.34 %	0.249
EDAD	48.58+16.08	52.59+15.96	0.392

Tabla 1.

DISCUSION

La prueba de aliento con urea marcada es un método sencillo y no invasivo que nos permite detectar la presencia de *Helicobacter pylori*, con una sensibilidad del 99% y una especificidad del 79%, resultados obtenidos en este estudio, acordes con lo informado en la literatura (80). Asimismo, una prueba de aliento positiva coincide con la presencia de la bacteria en un 93% y una prueba de aliento negativa, coincide con su ausencia en un 96%. Estos dos valores deben ser tomados con cautela, ya que varían en función a la prevalencia de *Helicobacter pylori* en los diferentes grupos de pacientes. La prevalencia de *Helicobacter pylori* en el estudio está inflada dado que los primeros 21 pacientes ingresaron al estudio con la condición de tener tinción con Hematoxilina-Eosina positiva para *Helicobacter pylori*. Excluyendo estos 21 pacientes y considerando que los demás fueron consecutivos, la prevalencia esperada sería de 66%, y los valores predictivos positivo y negativo resultantes serían de 90% y 100%, respectivamente. Por todo lo anterior, se justifican los esfuerzos para tratar de estandarizar dicha prueba con la dosis de radioisótopo y tiempo de seguimiento mínimos necesarios, lo cual haría más seguro a este método, permitiéndonos su utilización en el escrutinio de pacientes con síndrome dis péptico y en estudios epidemiológicos.

Encontramos 6 pacientes con biopsia antral negativa y prueba de aliento evidentemente positiva. A diferencia del estudio de Marshall en el cual no se obtuvieron pruebas de aliento falsas positivas, en este estudio se tomó menor número de biopsias, por lo que probablemente se requiera mayor número de biopsias para establecer el diagnóstico histológico de *Helicobacter pylori*. Asimismo, se ha informado que aproximadamente el 10% de los pacientes con *Helicobacter pylori*, únicamente presentan al microorganismo en las biopsias de fondo gástrico, por lo que el hecho de tomar biopsias de ese sitio, quizá reduzca el número de falsos negativos (89).

En este estudio sólo una paciente presentó biopsia antral positiva y prueba de aliento negativa; es probable que esta paciente haya ingerido antibiótico, ya que presentaba cuadros recurrentes de infección en vías urinarias; sin embargo, en el análisis retrospectivo de su expediente no se encuentra consignado ningún tratamiento con antibióticos y en el interrogatorio directo que se le efectuó, negó tal antecedente.

Debe considerarse que la solución con urea marcada cubre grandes áreas del estómago y por tal motivo es posible que la prueba de urea sea más sensible que la biopsia.

Coincidimos con otros autores (80,89) en que dada la alta sensibilidad y especificidad de la prueba de aliento con urea marcada para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*,

comparada con la biopsia antral y considerando que la enfermedad puede ser focal (21,39) con biopsias falsas negativas; la prueba de aliento puede ser superior a la biopsia con fines diagnósticos y como método de seguimiento, resultando además superior en cuanto a sencillez, riesgo y costo.

En la validación de una prueba diagnóstica es importante utilizar un estándar de oro adecuado. La prueba de la urea resultó menos sensible y específica (95% y 63% respectivamente), cuando se comparó con la tinción de Hematoxilina-Eosina (Figura 1), resultado evidente, ya que esta tinción no es la adecuada para la bacteria, dando por resultado muchos falsos negativos y también falsos positivos. Estos resultados mejoraron cuando se comparó con la misma tinción pero además se tomó en cuenta la respuesta al tratamiento, obteniendo una sensibilidad del 95% y una especificidad del 74%; paralelamente a lo anterior, tampoco constituye un estándar adecuado por los motivos señalados respecto a la tinción y la dificultad para hacer una evaluación clínica objetiva. Es evidente que los resultados de la prueba mejoran cuando se utiliza el estándar adecuado, en este caso, la tinción de Warthin-Starry, dando una sensibilidad del 99% y una especificidad del 79%.

Clinicamente resulta difícil diferenciar a los pacientes con enfermedad ácido-péptica asociada a *Helicobacter pylori* de aquellos que no tienen dicha bacteria, éste es un hecho informado en otros estudios (90), y coincide con el

presente trabajo en el cual no se encontraron diferencias entre el cuadro clínico de los pacientes con infección por *Helicobacter pylori* y el de los pacientes sin ella.

En esta investigación sólo se incluyeron 14 pacientes con úlcera gástrica y 7 con úlcera duodenal, manteniéndose la presencia de *Helicobacter pylori* en la proporción de 64% y 86% respectivamente, confirmando los resultados de la literatura (12,49,91).

Por otra parte, no hubo relación en cuanto al sexo, ni tampoco se encontró diferencia significativa respecto a la edad, datos que concuerdan con otros autores (92).

Es importante señalar en relación a los factores predictores de la presencia/ausencia de *Helicobacter pylori* con significancia estadística, que la gastritis activa resultó con un valor predictivo positivo del 80%; esto es, existe una probabilidad del 80% de que un paciente con gastritis activa tenga *Helicobacter pylori*, por otro lado, su valor predictivo negativo fué del 60%, esto significa que aunque el paciente no tenga gastritis activa, existe un 40% de probabilidades de que exista *Helicobacter pylori*. De igual manera ocurre con la gastritis antral, cuyo valor predictivo positivo es de 83%, pero su valor predictivo negativo es de 50%, lo cual significa que el hecho de no tener gastritis antral, no excluye la presencia de *Helicobacter pylori*, ya que el riesgo de tenerlo

es del 50%. Finalmente, la gastritis folicular con un valor predictivo positivo de 94%, es decir predice muy bien la presencia de *Helicobacter pylori*, pero su valor predictivo negativo es muy bajo (39%), lo cual significa que el hecho de no tener gastritis folicular, no excluye la presencia de *Helicobacter pylori*. En resumen, la presencia de estos tres signos concuerda en una proporción alta con la presencia de *Helicobacter pylori*. Sin embargo, su ausencia no es predictiva de ausencia de la bacteria, lo cual limita el valor de estos signos histológico y endoscópicos en función a su prevalencia.

Respecto a la erradicación de la bacteria con el esquema doble utilizado, obtuvimos una respuesta del 82% incluyendo únicamente a los pacientes que concluyeron su estudio. En este trabajo, de 56 pacientes sintomáticos con biopsia y/o prueba de aliento positivas en quienes se normalizaron tanto la biopsia como la prueba de urea, posterior al tratamiento, únicamente el 12% persistieron con sintomatología dispéptica, por lo que creemos al igual que otros autores que la presencia de *Helicobacter pylori* no es casual y por lo tanto el paciente con dicha sintomatología y que se le documenta la presencia de *Helicobacter pylori*, debe recibir tratamiento para la erradicación de la bacteria.

CONCLUSIONES

1. La prueba de aliento con urea marcada es un método sencillo y no invasivo para detectar la presencia de *Helicobacter pylori*, con una sensibilidad del 99% y una especificidad del 79%.

2. No se encontró un cuadro clínico característico del paciente con gastritis asociada a *Helicobacter pylori*. Únicamente dos datos endoscópicos (gastritis folicular y gastritis antral) y uno histopatológico (gastritis activa), resultaron estadísticamente significativos como predictores de la presencia de *Helicobacter pylori*; sin embargo, cabe señalar que su ausencia no es predictiva de ausencia de la bacteria.

3. Con el esquema doble (amoxicilina y sales de bismuto) utilizado durante 6 semanas, se obtuvo una respuesta del 82% (56 pacientes) con normalización de la biopsia y de la prueba de aliento; de éstos el 12% (7) permanecieron sintomáticos. En el 18% (12) la biopsia y la prueba de urea no se normalizaron, persistiendo sintomáticos el 67% (8).

BIBLIOGRAFIA

1. Warren JR. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis (letter). *Lancet* 1983;1:1273.
2. Marshall B. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
3. Bizzozero G. Ueber die schlauchfoermigen drusen des magendarm kanals und die beziehungen ihres epitheils zu dem oberfachene-pithel der schleimhaut. *Arch F Mikr Anat.* 1893;42:82-152.
4. Salomon H. Ueber das spirillum des sugetiermagens und sein verhalten zu den belegzellen. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1896;19:433-42.
5. Kreinitz W. Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedener verschiedener form im mageninhalte bei carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr.* 1906;32:872.
6. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int J. Syst Bacteriol* 1985;85:223-5.
7. Goodwin CS. Armstrong JA. Chilvers T. et al Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bact* 1989;39:397 405.
8. Luck JM. Seth TN. Gastric urease. *Biochem J* 1924;18:1227-31.
9. Fitzgerald O. Murphy P. Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach. *Ir J Med Sci.* 1950;292:97-159.
10. Langenberg ML. Tytgat GNJ. Schipper MEI. et al. *Campylobacter* like organisms in the stomach of patients and healthy individuals (letter). *Lancet* 1984;1:1348-9

11. Goodwin CS. McCulloch RK. Armstrong JA. et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium. (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1985;19:257-67.
12. Marshall BJ. Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1:1311-5.
13. Bruck GE. Smith JS. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Microbiol* 1987;25:597-9.
14. Marshall BJ. McGeachie DB. Rogers PA. et al. Pyloric campylobacter infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* 1985;142:439-44.
15. Lambert JR. Hansky J. Eaves ER. et al. *Campylobacter* like organisms in human stomach (abstract) *Gastroenterology*. 1985;88:1463.
16. Jones DM. Lessells AM. Eldridge J. *Campylobacter* like organisms on the gastric mucosa: culture, histological, and serological studies. *J Clin Pathol*. 1984;37:1002-6.
17. McNulty CA. Dent J. Wise R. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pyloridis* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28:837-38.
18. Goodwin CS. Blincow ED. Warren JR. et al. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1985;38:1127-31.
19. Williams SE. Turnberg LA. Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a "mucus-bicarbonate" barrier. *Gut* 1981;22:94-6.
20. Quigley EM. Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo: studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology* 1987;92:1876-84.
21. Hazell SL. Lee A. Brady L. et al. *Campylobacter pyloridis* and

- gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis.* 1986;153:658-63.
22. Marshall BJ. Barrett L. Prakash C. et al. Survival of *Campylobacter pyloridis* at acid pH (Abstract) *Gastroenterology.* 1987 92:1517.
 23. Talley NJ. Cameron AJ. Shorter RG. et al. *Campylobacter pylori* and Barrett's esophagus. *Mayo Clin Proc* 1988;63:1176-80.
 24. Steer HW. Surface morphology of the gastroduodenal mucosa in duodenal ulceration. *Gut* 1984;25:1203-10.
 25. de Cothi GA. Newbold KM. O'Connor HJ. *Campylobacter* like organisms and heterotopic gastric mucosa in Meckel's diverticula. *J Clin Pathol* 1989;42:132-4.
 26. Fich A. Talley NJ. Shorter RG. et al. Does *Helicobacter pylori* colonize the gastric mucosa of Meckel's diverticulum? *Mayo Clin Proc* 1990;65:187-91.
 27. Dye KR. Marshall BJ. Frierson HF. et al. *Campylobacter pylori* colonizing heterotopic gastric tissue in the rectum. *Am J Clin Pathol* 1990;93:144-7.
 28. Goodwin CS. Taxonomy of *Helicobacter pylori* and related bacteria. In: Maiferttheiner P, Ditschuneit H, eds. *Helicobacter pylori, gastritis, and peptic ulcer.* Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1990:3-8.
 29. McNulty CA. Wise R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis (Letter). *Lancet* 1985;1:1443-4.
 30. Owen RJ. Martin SR. Borman P. Rapid urea hydrolysis by gastric *campylobacters* (Letter). *Lancet.* 1985;1:111.
 31. Dunn BE. Campbell GP. Perez GI. et al. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1990;265:9494-9.

32. Clayton CL. Pallen MJ. Kleanthous H. et al. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acids Res* 1990;18:362.
33. Drumm B. Perez GI. Blaser MJ. et al. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 1990;322:359-63.
34. Hazell SL. Borody TJ. et al. *Campylobacter pyloridis*. Gastritis I: Detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987;82:292-296.
35. Dehesa M. Importancia clinica del *Campylobacter pylori*. Parte primera. *Rev Gastroenterol Mex* 1989;54:111-119.
36. Berstad A. Alexander B. et al. Antacids reduce *Campylobacter pylori* colonization without healing the gastritis in patients with nonulcer dyspepsia and erosive prepyloric changes. *Gastroenterology* 1988;95:619-624.
37. Brady ChE. Hadfield TL. et al. Acid secretion and serum gastrin levels in individuals with *Campylobacter pylori*. *Gastroenterology* 1988;94:923-7.
38. Glupczynski Y. Burette A. Labbe M. et al. *Campylobacter pylori*-associated gastritis; a double blind controlled trial with amoxicillin. *Am J Gastroenterol* 1988;83:365-72.
39. Hazell SL. Hennessy WB. Borody TJ. et al. *Campylobacter pyloridis*. Gastritis II: distribution of bacteria and associated inflammation in the gastroduodenal environment. *Am J Gastroenterol* 1987;82:297-301.
40. Mc Nulty AM. Gearty JC. et al. *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis, investigation blind, placebo controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate. *Br Med J Clin Res* 1986; 293:645-49.
41. Talley NJ. et al. *Campylobacter pylori* associated gastritis. Is antibiotic therapy now justified? *J Clin Gastroenterol* 1988;10(1):10-12.
42. Dehesa M. Dooley CP. Cohen H. et al. High prevalence of *Campy*

lobacter pylori (C.P.) in an asymptomatic hispanic population
Gastroenterology 1989;96:Suppl:A115.abstract.

43. Taylor KB. Immune aspects of pernicious anemia and atrophic gastritis. Clin. Haematol 1976;5:497-519
44. Rauws EAJ, Langerberg W, et al. Campylobacter pyloridis-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcer treatment. Gastroenterology 1988;94:33-40.
45. Hill AB. The environment and disease: association or causation? Proc R Soc Med 1965;58:1273-5.
46. Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, et al. Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet. Infect Immun 1987;55:2789-96.
47. Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, et al. Helicobacter pylori gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. Infect Immun 1990;58:2606-12.
48. Engstrand L, Gustavsson S, Jorgensen A, et al. Inoculation of barrier-born pigs with Helicobacter pylori: a useful animal model for gastritis type B. Infect Immun 1990;58:1763-8.
49. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, et al. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. Med J Aust 1985;142:436-9.
50. Morris A, Nicholson G. Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol 1987;82:192-9.
51. Cave DR, Vargas M. Effect of a Campylobacter pylori protein on acid secretion by parietal cells. Lancet 1989;2:187-9.
52. Morgan D, Kraft W, Bender M, et al. Nitrofurans in the treatment of gastritis associated with Campylobacter pylori. Gastroenterology 1988;95:1178-84.
53. Glupczynski Y. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori

to antibiotics and bismuth salts and the importance of acquired resistance to antibiotics in treatment failures of *H. pylori*, gastritis, and peptic ulcer. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 1990:49-58.

54. Perez-Perez GI, Dworkin BM, Chodos JE, et al. Campylobacter pylori antibodies in humans. *Ann Intern Med* 1988;109:11-7.
55. Evans DJ Jr, Evans DG, Graham DY, et al. A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection. *Gastroenterology* 1989;96:1004-8.
56. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Campylobacter pylori virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1989;57:1119-25.
57. Sarosiek J, Slomiany A, Slomiany BL. Evidence for weakening of gastric mucus integrity by Campylobacter pylori. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:585-90.
58. Spychal RT, Goggin PM, Marrero JM, et al. Surface hydrophobicity of gastric mucosa in peptic ulcer disease: relationship to gastritis and Campylobacter pylori infection. *Gastroenterology* 1990;98:1250-4.
59. Craig PM, Karnes WE, Territo MC, et al. Helicobacter pylori secretes a chemotactic factor for monocytes and neutrophils. *Gastroenterology* 1990;98:Suppl:A33.abstract.
60. Mai EUH, Perez-Perez GI, Wahl LM, et al. Inflammatory and cytoprotective responses by human monocytes are induced by Helicobacter pylori: possible role in the pathogenesis of type B gastritis. *Gastroenterology* 1990;98:Suppl:A662. abstract.
61. Leunk RD, Ferguson MA, Morgan DR, et al. Antibody to cytotoxin infection by Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol* 1990;28:1181-4.
62. Eaton KA, Morgan DR, Brooks, et al. Essential role of urease in the pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* 1990;98:Suppl:A654. abstract.

63. Smoot DT. Mobley HLT. Chippendale GR, et al. Helicobacter pylori urease activity is toxic in human gastric epithelial cells. Infect Immun 1990;58:1992-4.
64. Marshall BJ. Barrett LJ. Prakash C. et al. Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid. Gastroenterology 1990;99:697-702.
65. Parsons CL. Stauffer C. Mulholland SG. et al. Effect of ammonium on bacterial adherence to bladder transitional epithelium. J Urol 1984;132:365-6.
66. Gray SF. Wyatt JI. Rathbone BJ. et al. Simplified techniques for identifying Campylobacter pyloridis (letter). J Clin Pathol 1986;39:1279.
67. The Gastrointestinal Physiology Working Group. Rapid identification of pyloric Campylobacter in Peruvians with gastritis. Dig Dis Sci 1986;31:1089-94.
68. Gustavsson S. Phillips SF. Malagelada JR. et al. Assessment of Campylobacter-like organisms in the postoperative stomach, iatrogenic gastritis and chronic gastroduodenal diseases: preliminary observations. Mayo Clin Proc 1987;62:265-8.
69. Walters LL. Budin RE. Paull G. Acridine-orange to identify Campylobacter pyloridis in formalin fixed paraffin-embedded gastric biopsies. Lancet 1986;1:42.
70. Pinkard KJ. Harrison B. Capstick JA, et al. Detection of Campylobacter pyloridis in gastric mucosa by phase contrast a ml microscopy. J Clin Pathol 1986;39:112-3.
71. Engstrand L. Pahlson C. Gustavsson S. et al. Monoclonal antibodies for rapid identification of Campylobacter pyloridis (letter). Lancet 1986;2:1402-3.
72. Sauerbruch T. Schreiber MA. Schüssler P. et al. Endoscopy in the diagnosis of gastritis. Diagnostic value of endoscopic criteria in relation to histologic diagnosis. Endoscopy 1984; 16:101-4.

73. Dent J. Mc Nulty CA. New selective medium for *Campylobacter pylori*. Abstracts of the Vth International Workshop on *Campylobacter* Infections. Puerto Vallarta Mex. 1989:127.
74. Glupczynski Y. Labbe M. et al. Comparative evaluation of a new selective culture medium for isolation of *Campylobacter pylori* from gastric biopsy specimens. Abstracts of the Vth International Workshop on *Campylobacter* Infections. Puerto Vallarta Mex. 1989:127.
75. Jones DM. Lessells Am. Eldridge J. *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological, and serological studies. *J Clin Pathol* 1984;37:1002-6.
76. Jones DM. Eldridge J. Fox AJ. et al. Antibody to the gastric *Campylobacter*-like organism ("*Campylobacter pyloridis*") clinical correlations and distribution in the normal population. *J Med Microbiol* 1986;22:57-62.
77. Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol* 1946;52:461-6.
78. Marshall BJ. Warren JR. Francis GJ. et al. Rapid urease tests in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987;82:200-10.
80. Marshall BJ. Surveyor I. Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori*-associated gastritis. *J Nucl Med* 1988;29:11-6.
81. Basic Safety Standards for Radiation Protection. Edition 1967. International Atomic Energy Agency. Vienna 1967; pge.33
82. MacDonald WC. Rubin CE. Gastric biopsy - a critical evaluation *Gastroenterology* 1967;53:143-70.
83. Slurala M. Isokoski M. Varis K. et al. Prevalence of gastritis in a rural population: bioptic study of subjects selected at random. *Scand J. Gastroenterol* 1968;3:211-23.
84. Raws EAJ. Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:1233-5.

85. O'Riordan T. Mathai E. Tobin E. et al. Adjuvant antibiotic therapy in duodenal ulcers treated with colloidal bismuth sub citrate. *Gut* 1990;31:999-1002.
86. Weil J. Bell GD. Powell K. et al. Helicobacter pylori infection treated with a tripotassium dicitrate bismuthate and metronidazole combination. *Aliment Pharmacol Ther* 1990;4:651-7.
87. Gridley MF. Manual of histologic and special staining techniques. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 1957.
88. Marshall BJ. Surveyor I. Fifteen minute Urea-C14 breath test for the diagnosis of Campylobacter associated gastritis. *Gastroenterology* 1987;92:abstract.1518.
89. Paul G. Yardley J: Pathology of C. pylori-associated gastric and esophageal lesions. In *Campylobacter pylori in gastritis and peptic ulcer disease*. M Blaser (ed). New York. Igaku-Shoin. 1989.
90. Parsonnet J, Blaser M, Perez-Perez G, et al. Symptoms and risk factors of Helicobacter pylori infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* 1992;102:41-46.
91. Licata A, Naso P, Bartoloni G, et al. Campylobacter pylori: un reperto occasionale o un fattore patogenetico costante nella patologia peptica ed infiammatoria gastroduodenale? Considerazioni personali. *Minerva-Dietol-Gastroenterol*. 1990;36:133-7.
92. Kunz U, Hantzschel U, Kratzsch KH, et al. Zur Haufigkeit des Nachweises von Campylobacter pylori. *Z Gesamte Inn Med*. 1990;45:389-91.