

Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad úlcero péptica.

JOSÉ IGNACIO MONCAYO ORTIZ

MSc. Microbiología, Profesor Facultad de Ciencias de la Salud. U. T.P.

JORGE JAVIER SANTACRUZ IBARRA

MSc. Microbiología, Profesor Facultad de Ciencias de la Salud. U. T. P.

MARTHA LUCÍA MONTES BEDOYA

Lic. Bacteriología y Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

BEATRIZ FRANCO OSPINA

Médica Patóloga, Profesora Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

MANUEL ALFONSO LÓPEZ B.

Médico Patólogo, Profesor Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

EMIRO ALFONSO MEISEL CH.

Médico Gastroenterólogo, Centro de Especialistas del Risaralda

FABIO SALAZAR JARAMILLO

Médico Gastroenterólogo, Centro de Especialistas del Risaralda

Asesor estadístico:

HERMAN JOSÉ SERRANO L.

PhD en Matemáticas. Docente Facultad de Ciencias Básicas. U.T.P.

Resumen

Se estudiaron 50 pacientes de diferentes edades y sexo con diagnóstico clínico y endoscópico de enfermedad úlcero péptica, 33 pacientes (66%) padecían úlcera duodenal y 17 pacientes (34%) tenían úlcera gástrica. A cada paciente se

le tomaron cinco biopsias a las cuales se le practicaron Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cultivo, prueba rápida de ureasa (PRU) y examen histológico.

*Los resultados para cada uno de los métodos utilizados para detectar el *H. Pylori* mostraron que: la PCR, para amplificar el gen *ureC* de *H. pylori* en los ADNs extraídos de las biopsias, amplificó un segmento de 294 pb en 49 (98%) de los especímenes de los 50 pacientes; el número de cultivos positivos fueron 19 (38%); la prueba rápida de ureasa (PRU) a partir de biopsia antral mostró que 35 (70%) pacientes eran positivos para *H. Pylori*, y el examen histológico por coloración de azul de toluidina modificada para *H. pylori* en biopsia antral fue de 47 (94%) pacientes y en la biopsia del corpus fue de 44 (88%) pacientes.*

*La concordancia de la PCR del gen *ureC* realizada en las biopsias de los pacientes con cultivo positivo, mostró una sensibilidad y especificidad de la PCR del 100%. El análisis estadístico al comparar la PCR frente al cultivo y la prueba rápida de ureasa mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). También hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el examen histológico frente al cultivo y la prueba rápida de ureasa. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la PCR y el examen histológico.*

*En conclusión, con la técnica de la PCR se obtuvo el porcentaje más alto de detección de *H. pylori* seguido por el examen histológico, la combinación de estos dos métodos podría garantizar mayores éxitos en el diagnóstico de la infección. Sin embargo, estas dos técnicas son métodos invasivos que requieren de la disponibilidad de un endoscopista altamente entrenado y la elección dependería de la situación clínica.*

PALABRAS CLAVES: *Helicobacter pylori*, enfermedad úlcero-péptica, úlcera gástrica, úlcera duodenal, PCR, ureC, PRU.

Recibido para publicación: 05-03-2002

Aceptado para publicación: 10-05-2002

Introducción

El *Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa en forma de espiral que coloniza el estómago humano e infecta más de la mitad de la población mundial, en particular en países en vía desarrollo donde compromete entre el 80% a 90% de las personas. Sin embargo, a pesar de la alta prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en la población, la mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos y solamente entre el 10 al 20% desarrollan enfermedad^(1,2). La hipótesis que podría explicar este comportamiento está basada en la existencia de diferentes cepas de *H. pylori* que varían en su virulencia⁽³⁻⁶⁾.

En la actualidad, se aceptan al menos cuatro enfermedades ampliamente reconocidas como causadas por *H. pylori*: úlcera duodenal (UD), úlcera gástrica (UG), adenocarcinoma de la parte distal del estómago (antro y fundus) y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT)⁽⁷⁾.

Este bacilo helicoidal gramnegativo está implicado en la génesis de más de 90% de los casos de úlceras duodenales y 80% de las úlceras gástricas. Muchos estudios han mostrado que los pacientes infectados con la bacteria presentan un riesgo 15% mayor de desarrollar enfermedad úlcero-péptica; de igual manera, las posibilidades de padecer adenocarcinoma gástrico aumentan en casi 9 veces. Por otro lado, los beneficios que se logran al erradicar el germen son excelentes, pues disminuye la recurrencia de úlceras, pueden producir regresión de linfomas de bajo grado asociados a mucosa gástrica (MALT), y en forma adicional, permiten mejorar las condiciones de vida del paciente^(1,2).

Existen varios métodos que pueden ser usados para confirmar la presencia de *H. pylori*. Estos métodos se pueden clasificar en dos categorías: aquellos métodos que detectan la infección en forma indirecta como el serológico y la prueba de aliento (urea breath test) y no requieren endoscopia (no invasivos). Los segundos son métodos directos que son utilizados para detectar el microorganismo en el espécimen de biopsia como el examen histológico, el cultivo, la prueba rápida de ureasa (PRU) y, requieren endoscopia (invasivos).

El método de cultivo aunque es específico (100%), posee una sensibilidad entre 75-90% debido a la difi-

cultad de cultivar *H. pylori* por ser un microorganismo microaerófilo y exigente en los nutrientes⁽⁸⁻¹⁰⁾.

La prueba rápida de la ureasa con sensibilidad entre 85-95% y especificidad 90-95%, es el método más barato y utilizado en las salas de endoscopia para detectar la infección por *H. pylori*. Sin embargo, su verdadera utilidad depende de la calidad de la prueba de ureasa utilizada. En estudios realizados por Moncayo et al^(11,12) con la financiación de COLCIENCIAS y la Universidad Tecnológica de Pereira demostraron la baja sensibilidad de la prueba de la ureasa utilizada por la unidad endoscópica involucrada en el estudio (69%).

Otro método de rutina, es el estudio histológico con sensibilidad entre 85-90% y especificidad de 95-100%, a través del cual se puede demostrar directamente la presencia del germen en una muestra de mucosa gástrica, el cual también permite el compromiso subyacente. En ausencia de inflamación crónica, la infección puede ser realmente excluida^(13,14). Usualmente se recomienda el examen de al menos dos biopsias del antro debido a la distribución desigual de las lesiones inflamatorias y de la bacteria o a la posibilidad de problemas técnicos asociados a la recolección, al transporte o al procesamiento de las muestras.

La prueba de ELISA sirve para detectar anticuerpos, tiene una sensibilidad entre 85-98% y especificidad 80-95%, es un método no invasivo y la detección de anticuerpos de clase IgG está disponible ampliamente y tiene mayor uso y aplicabilidad que IgA. Está dirigida contra antígenos específicos de *H. pylori*, es un método no invasivo que tiene la ventaja de poder utilizarse con facilidad en grandes estudios epidemiológicos y sirve para conocer la prevalencia de la infección. En la práctica clínica se ha sugerido como prueba de tamizaje^(15,16).

Otro método no invasivo es la prueba de la urea en la respiración (Urea Breath Test) con sensibilidad entre 90-100% y especificidad > 95%. Este método mide el CO₂ producido cuando la ureasa de *H. pylori* metaboliza la urea marcada con carbono ¹³C o ¹⁴C, tiene una sensibilidad y especificidad de 90 a 99%. Es útil para confirmar la cura de la infección después de 4 semanas de haber completado el tratamiento. Falsos negativos son posibles si la prueba es realizada en pacientes con reciente tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, antimicrobianos o compuestos con bismuto. Es una técnica especializada y costosa⁽¹⁷⁾.

En los últimos años, se han aplicado métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *H. pylori* en muestras de biopsia con una sensibilidad entre 85-95% y especificidad 95-100%^(18,19). Adicionalmente varios estudios han demostrado la utilidad de PCR en jugo gástrico, saliva, placa dental y heces (HpSA:H.pylori Stool Antigen)⁽¹⁸⁻²¹⁾. Los ensayos basados en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han empleado para detectar la presencia de ADN de *H. pylori* usando como blanco varios tipos de genes (23S rRNA, ureC, cagA, gen de adhesinas, etc)⁽²²⁻²⁴⁾.

El propósito de este estudio fue utilizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar un gen específico de *H. pylori* directamente en biopsia y los resultados obtenidos compararlos con los obtenidos mediante el cultivo, prueba rápida de ureasa y examen histológico.

Materiales y métodos

Pacientes: Se incluyeron 50 pacientes de cualquier edad y sexo con diagnóstico clínico y endoscópico de enfermedad úlcero-péptica, que asistieron a consulta con gastroenterólogos del Centro de Especialistas de Risaralda (CER) y aceptaron por escrito participar en la investigación. Se tuvo en cuenta los siguientes criterios de exclusión:

- Pacientes que hubiesen ingerido antibióticos durante las seis (6) semanas antes de la endoscopia.
- Pacientes que hubiesen ingerido inhibidores de la bomba de protones o bismuto, durante los quince (15) días antes de la endoscopia.

Endoscopia gastroduodenal: De cada paciente con úlcera duodenal o úlcera gástrica se tomaron 5 biopsias, para establecer el número de biopsias se siguió la metodología propuesta por Lage et al (8). Las biopsias obtenidas fueron distribuidas para el análisis de la siguiente forma: con una biopsia antral se practicó la prueba rápida de ureasa (Lutecia de Colombia). La biopsia anterior junto con una biopsia del cuerpo se utilizaron para el examen histológico. Una tercera biopsia del antro con una cuarta de cuerpo se utilizaron para el cultivo. La quinta biopsia de la región antral se sometió a la técnica de PCR.

Para la limpieza y desinfección de los endoscopios se

siguió los protocolos previamente establecidos en las unidades de endoscopia. Este procedimiento se realizó antes y después de cada procedimiento y al finalizar la sesión de endoscopia. Se tuvo un especial cuidado en el lavado y desinfección de todos los canales de cada endoscopio, así como de los fórceps de biopsia⁽²⁵⁾.

Cultivo: Las biopsias se transportaron en forma refrigerada desde la Unidad de Gastroenterología del CER al laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Pereira, usando el medio de transporte de glicerol al 20% en caldo tioglicolato⁽²⁶⁾. Retiradas las biopsias del medio de transporte, se mezclaron con solución salina estéril, se maceraron con un homogeneizador manual (Deltaware Pellet Pestle) y se sembraron en la superficie de diferentes medios de cultivo selectivos para *Helicobacter*. Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento primario fueron:

- Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Oxoid), suplementado con sangre o suero de caballo (Oxoid) al 7%, Isovitale X (BBL), y los antibióticos trimetoprim, vancomicina y anfotericina.
- Agar tripticasa soya (Difco o BBL) suplementado con sangre oveja al 7%, y los antibióticos vancomicina, anfotericina, bacitracina, ácido nalidíxico y polimixina B.

Condiciones de incubación: Se utilizaron diferentes metodologías simultáneas o individuales para lograr un máximo aislamiento de la bacteria, las siguientes fueron las condiciones de incubación:

- Incubación bajo condiciones microaerofílicas de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂ a 37°C por 5 a 7 días (Water Jacketed Incubator, Nuaire).
- Jarra de anaerobiosis (Difco) con sistema de generación de gas (*Campylobacter* Microaerophilic System, Difco) por 5 a 8 días a 37°C.
- Bolsas plásticas selladas: los cultivos se colocaron en bolsas plásticas, a las cuales se les inyectó CO₂, luego se sellaron herméticamente y se incubaron en una cámara de CO₂ (Incubadora de CO₂, Revco) a 37°C por 5 a 8 días.

La observación del crecimiento de la bacteria se realizó a los 3, 5 y 7 u 8 días de incubación y cuando hubo crecimiento la bacteria fue identificada por morfología

de la colonia, coloración de Gram y las pruebas de oxidasa, ureasa y catalasa.

Prueba rápida de ureasa (PRU): A partir de la muestra de la biopsia de mucosa antral, se realizó la prueba rápida de ureasa (Lutesia de Colombia), la prueba fue leída en los primeros 20 minutos y descartada como negativa a las 2 horas.

Examen histológico: La biopsia antral recobrada de la prueba rápida de ureasa y la biopsia del cuerpo en la úlcera gástrica o biopsia antral en la úlcera duodenal, se enviaron al laboratorio de histopatología de la Universidad Tecnológica en el Hospital Universitario San Jorge, en una solución amortiguada de formalina al 10%, para ser procesadas y coloreadas con azul de toluidina modificada⁽²⁷⁾ y hematoxilina-eosina⁽²⁸⁾. Los cortes histológicos fueron leídos por dos patólogos expertos en forma individual y sin conocimiento de los resultados de las otras técnicas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Para la extracción de ADN de biopsia, se utilizó el protocolo descrito por Valentine⁽²⁹⁾. Brevemente este método parte de un homogeneizado de la biopsia tratado con un buffer de extracción de tejidos (Tris-HCl 50mM, pH 7.2; EDTA 1mM con SDS al 1% y 100mg de proteinasa K/ml) e incubado a 55°C por 2 horas. La extracción del ADN se realizó por la técnica de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. El ADN fue reconstituido en 50ml de buffer TE 1X estéril y almacenado a -20°C. Se utilizó una pareja de iniciadores para amplificar el gen ureC. La secuencia, la posición de acople y la longitud esperada de los productos de DNA amplificados se muestran en la tabla 1.

La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 ml en termocicladores GeneAmp PCR System 9700 y 2400, Perkin Elmer. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, treinta ciclos con desnaturalización a 94°C por un (1)

minuto, acoplamiento (annealing) a 60°C por un (1) minuto y extensión a 72°C por un (1) minuto; y una extensión final a 72°C por 4 minutos.

Se utilizaron como control positivo cepas de referencia de *H. pylori* NTCC11637 y NTCC12908 (National Collection of Type Cultures, Public Health Laboratory Service, London, Great Britain) y como control negativo cepas de enterobacterias aisladas rutinariamente en el laboratorio de Microbiología. Para evitar contaminaciones cruzadas, la preparación, la manipulación de las muestras, la preparación del gel de detección y la realización del PCR se hicieron en sitios separados (8).

Cantidades de 10ml de cada mezcla obtenida por PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1.5 – 2%) (Sigma) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Análisis estadístico: una vez comprobado que la muestra es representativa, se determinaron las proporciones y sus intervalos de confianza utilizando distribuciones multinomiales. Se hizo una aproximación a la distribución normal y se usó una confiabilidad de 96% en todas las pruebas. La metodología reduce al mínimo los falsos positivos, y la diferencia entre las pruebas es sobre todo en el número de falsos negativos.

Resultados

De los 50 pacientes incluidos en el estudio, 33 pacientes (66%) padecían úlcera duodenal y 17 pacientes (34%) tenían úlcera gástrica.

La PCR para amplificar el gen ureC de *H. pylori* en los ADNs extraídos de las biopsias amplificó un segmento de 294 pb en 49 (98%) de los especímenes de los 50 pacientes; 57.9% correspondieron a pacientes con úlcera duodenal y 42.1% a pacientes con úlcera gástrica. La figura 1 muestra la banda de amplificación de 294pb del gen ureC de varios pacientes.

Tabla 1. Oligonucleótidos (primers) específicos para el gen ureC, utilizados en la PCR.

NOMBRE DEL GEN	INICIADORES	SECUENCIA DEL NUCLEÓTIDO	LOCALIZACIÓN EN EL GEN	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR (pb)
UreC*	93275 93276	5'-AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T-3 5'-AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC -3'	1293-1318 1587-1563	294

*La posición de los iniciadores específicos para el gen ureC fueron reportados por Labigne et al (30).



Fig 1. PCR ureC de cepas aisladas de pacientes con EUP. Líneas 1-7 muestran cepas Urec+ (294pb), línea 8 control positivo y línea 9 control negativo. M:marcador molecular 123pb Ladder.

El número de cultivos positivos obtenidos de los 50 pacientes fueron 19 (38%). Al amplificar el gen ureC por PCR en los pacientes con cultivo positivo, el 100% de los pacientes con úlcera duodenal y 94.1% de pacientes con úlcera gástrica contenían *H. pylori* por la técnica de la PCR.

Al comparar la PCR con el examen histológico no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.31$), pero frente al cultivo y prueba rápida de ureasa mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=1.8 \times 10^{14}$ y $p=0.0002$, respectivamente).

Los 19 pacientes con cultivos positivos, fueron positivos para el gen ureC amplificado por el método de la PCR con 100% de especificidad y sensibilidad comparado con el método del cultivo.

La prueba rápida de ureasa (PRU) a partir de biopsia

antral mostró que 35 (70%) pacientes eran positivos para *H. pylori* de los cuales 25 (50%) padecían úlcera péptica y los restantes (50%) úlcera gástrica. El análisis estadístico de esta prueba frente al cultivo no mostró diferencia estadísticamente significativa ($P=0,108$)

Los resultados por el método histológico utilizando la coloración de azul de toluidina modificada mostraron que 47 pacientes (94%) en biopsia antral y 44 pacientes (88%) en biopsia del corpus fueron positivos para *H. Pylori*. Al comparar esta prueba con las pruebas de cultivo y PRU mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00002$ y $p=0,037$, respectivamente)

Comparando los cuatro métodos de diagnóstico, la PCR detectó 98%, el cultivo 38%, la PRU 70% y el examen histológico (azul de toluidina modificada en biopsia antral) 94% de los 50 pacientes estudiados (tabla 2). Entre estos métodos, el mejor para decidir si la bacteria está presente o no, se puede afirmar estadísticamente que es cualquiera de estos dos métodos: la PCR o el examen histológico, y su razón de verosimilitud es mucho mayor que la del siguiente que es la PRU ($LR=1,4$) y mas del doble que el método del cultivo ($LR=2,57$).

Discusión

En esta investigación se estudió un grupo de pacientes con enfermedad úlcero-péptica diagnosticados por endoscopia y toma de muestras de biopsias gástricas para detectar el *H. pylori*.

En la actualidad se dispone de gran variedad de técnicas de PCR para la detección de *H. pylori* directamente en biopsia. La PCR realizada con iniciadores específicos para amplificar el gen ureC reportados por Labigne

Tabla 2. Comparación de los cuatro métodos utilizados en la detección de *H. pylori* en pacientes con enfermedad úlcero-péptica

Método	PCR (%)	Cultivo (%)	PRU (%)	Histológico* (%)
Positivo	49 (98)	19 (38)	35 (70)	47 (94)
Negativo	01 (2)	31 (62)	15 (30)	03 (6)

* Azul de toluidina modificada en biopsia antral

et al⁽³⁰⁾ mostró 100% de especificidad para *H. pylori*, ninguno de los ADN's de las cepas bacterianas utilizadas como controles negativos fueron amplificadas para el gen ureC. Adicionalmente, la amplificación del gen ureC por PCR directamente en biopsia mostró que en el 100% de los casos se correlacionó con la positividad del cultivo en los mismos pacientes, demostrándose la sensibilidad y especificidad del método de la PCR reportada por otros investigadores^(8,9,30).

En nuestro estudio la PCR estableció que el 100% de los pacientes con UD y el 94.1% con UG estaban infectados por *H. Pylori*, acorde con los resultados obtenidos por otros investigadores que han demostrado que un 90-98% de los pacientes con UD y 80-90% de los pacientes con UG están infectados con *H. pylori*⁽³¹⁾.

Por otra parte, existen publicaciones que reportan falsos positivos en la PCR por contaminación del laboratorio o los endoscopios^(8,18,19), pero la contaminación de las áreas de trabajo de los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Tecnológica de Pereira fue poco probable por la ejecución estricta del protocolo establecido para evitar esta situación.

Existe numerosa información acerca de la sensibilidad del método de cultivo en la detección de la infección por *H. pylori*, mostrando un amplio rango de sensibilidad. El espectro de los datos publicados es muy variable. Algunos reportan sensibilidad baja, como en nuestro estudio (38%), otros con sensibilidad mayor al 90%, lo cual depende de diversos factores que influyen la obtención de cultivos positivos para *H. Pylori*^(8-10,32-34).

Los resultados variables en sensibilidad y especificidad de la prueba rápida de la ureasa (PRU) reportados en la literatura científica, dependen de varios factores, como el tipo de prueba comercialmente disponible, el tiempo de lectura (20 minutos, 1 hora o 24 horas o más), o el número de biopsias probadas (generalmente solo se realiza en biopsia antral, existiendo la posibilidad de que la bacteria no se encuentre en antro pero sí en corpus). Sin embargo, la mayor parte de las PRUs comercialmente disponibles indican una excelente sensibilidad (85-95%) y especificidad (95-100), pero estos parámetros pueden ser reducidos bajo ciertas circunstancias y pueden producir resultados falsos negativos en pacientes con sangrado del sistema gástrico superior, si el contenido gástrico es

contaminado con sangre^(35,39). Adicionalmente, pueden producirse resultados falsos negativos en pacientes que recientemente hayan recibido medicamentos inhibitorios de la bomba de protones, antagonistas del receptor-H2, antibióticos, o compuestos con bismuto⁽³⁵⁻³⁸⁾. Los resultados obtenidos en el estudio con la PRU (70%) demuestran que ésta prueba debe ser evaluada en su sensibilidad y especificidad frente a PRUs de reconocido prestigio internacional (CLO Test, PyloriTek).

Al igual que en la prueba de la ureasa, las técnicas histológicas para *H. pylori*, muestran variaciones en los resultados de la detección de la infección por *H. pylori*. La sensibilidad y especificidad del método histológico (85-90%), también se ven afectadas por muchos factores, como por ejemplo la experiencia del observador (patólogo)^(13,14,27). Los resultados obtenidos con la técnica de azul de toluidina modificada⁽²⁷⁾ en biopsia antral (94%) está acorde con los datos reportados por otros investigadores^(26,31).

Conclusiones

Aunque el cultivo es frecuentemente la regla de oro estándar para el diagnóstico definitivo de muchas enfermedades infecciosas, los resultados obtenidos en este estudio no lo avalan como un método de rutina en el diagnóstico de la infección, pues tuvo baja sensibilidad y el éxito del crecimiento del microorganismo depende de múltiples factores.

Al comparar los cuatro métodos utilizados en esta investigación, se pudo concluir que la PCR fue el método que más detectó a *H. pylori* y su sensibilidad y especificidad están dentro del rango previamente establecido por otros investigadores (S: 85-90% y E: 90-100%), seguido por el método histológico con una sensibilidad y especificidad reportada de 85-90% y 90-100% respectivamente. La prueba rápida de la ureasa fue poco eficiente en la detección de *H. pylori*. Teniendo en cuenta que la PRU es la técnica de rutina más utilizada en las unidades de endoscopia para el diagnóstico de *H. pylori*, los resultados mostraron baja sensibilidad cuando se consideró como único indicio de presencia de esta bacteria y deberá ser evaluada su real sensibilidad y especificidad o bien para aumentar su sensibilidad debería no solamente hacerse en una biopsia antral sino también en una biopsia del corpus para evitar la distribución irregular del *H. pylori* en la mucosa gástrica.

En conclusión, con la técnica de la PCR se obtuvo el porcentaje más alto para detectar *H. pylori* seguido por el examen histológico; entonces, la combinación de estos dos métodos podría garantizar mayores éxitos en el

diagnóstico de la infección. Sin embargo, estas dos técnicas son métodos invasivos que requieren la disponibilidad de un endoscopista altamente entrenado y la elección dependería de la situación clínica.

Referencias bibliográficas

- Graham, D. Y., et al. Scope and consequences of peptic ulcer disease. How important is asymptomatic *Helicobacter pylori* infection?. *Postgraduate Medicine* 1999; 105(3):100-110.
- Nguyen, TN, Barkun AN, Fallone, CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; 4(3):185-197.
- Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, et al. Cytotoxin production by *Camphylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcer and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989; 27:225-226.
- Grabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338:332-335.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5791-5795.
- Tummuru MKR, CoverTL, Blaser MJ: Cloning and expression of a high-molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61:1799-1809.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284(5418):1328.
- Lage, A. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: Comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2752-2756.
- Zwet, A.A. et al. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy sample. *J Clin Microbiol* 1993; 31(7):1918-1920.
- Roosendaal, R. et al. Recovery of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens is not dependent on the transport medium used. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2798-2800.
- Moncayo, JI, Santacruz, JJ, Montes, M. et al. Tipificación del gen *vacA* de *Helicobacter pylori*. *Rev Med Ris* 1999; 5(2):10-14.
- Moncayo, JI. y Santacruz, JJ. Detección del gen *cagA* y tipificación del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad úlcero-péptica en Risaralda. MEDUNAB 2000. 3(8):69-75.
- Fallone, C. A. et al. Hematoxilín and Eosin Staining of Gastric tissue for the Detection of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1997;2(1):32-35
- Correa, P. Chronic gastritis: Clinico-pathological classification. *Am J Gastroenterol* 1988; 83:504-509.
- Elitsur, Y. Prevalence of *cagA*, *vacA* antibodies in symptomatic and asymptomatic children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 1999;4(2):100-105.
- Cover, T. et al. Serologic detection of infection with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6):1496-1500.
- Taylor, D.N., and M. J. Blaser. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Epidemiol Rev* 1991; 13:42-59.
- Wesblom, T. Phadnis, S. Yang, P and Czinn, S. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. *Clin Infect Dis* 1993; 16:367-371.
- Furuta, Takahisa, et al. Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10):2421-2425
- Zwet, A.A. et al. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32(5):1346-1348.
- Gramley, W. A. et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7):2236-2240
- Taylor, N. et al. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA finger printing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(4):918-923J.
- Akopyanz, N et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detect by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleid Acids Research* 1992; 20(19): 5137-5142.
- Jiang, Q. Kiratsuka, K and Taylor, D. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular Microbiology* 1996; 20(4): 833-842.
- Roosendaal, R. et al. Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 22(4):1123-1126.
- Stewart, G. and Worsley B. *Helicobacter pylori* infection: Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22(1):5-19.
- Vartanian, R. Leung, J. Davis, J. et al. A novel alcian yellow-toluidine blue (Leung) strain for *Helicobacter* species: comparison with standard strains, a cost-effectiveness analysis, and supplemental utilities. *Mod Pathol* 1998; 11(1):72-77.
- Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America(AFIP). Métodos Histotecnológicos. Editado por Prophet, Edna, Mills, B., Arrington, J y Sobin, L.1995.
- Valentine, J. L. Diagnostic Molecular Microbiology-Principles and Applications: PCR detection of *Helicobacter pylori*. Edited by Persing, D H et al. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1993; pag 282-287.
- Labigne,A. Cussac,V and Courcoux, P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsables for ureasa activity. *J Bacteriol* 1991; 173:1920-1931.
- Graham, DY, et al. Recognizing peptic ulcer disease: Keys to clinical and laboratory diagnosis. Symposium/ Postgraduate Medicine/ Diagnosis of Peptic Ulcer Disease. 1999; 105(3):113-133.
- Coudron, P. and Stratton, C. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol* 1995; 33(4):1028-1030.
- Albertson, N, Wenngren, I and Sjostrom J.E. Growth and survival of *Helicobacter pylori* in defined medium and susceptibility to Brij 78. *J Clin Microbiol* 1998; 6(5):1232-1235
- Fresnadillo, M J., et al. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter* 1997; 2(1):36-39.
- Lai, KC, Hui WM and Lam SK. Bleeding ulcers have high false negative rates for antral *H. pylori* when tested with urease test. *Gastroenterology* 1996; 110:A167 (abstract).
- Howen, C. and Hunt, R. Practice guidelines: Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(12):2330-38.
- Bravo, LE. Realpe, JL. Campo, C. et al. Effect of acid suppression and bismuth medications on the performance of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999, 94(9):2380-2383.
- Robinson, RJ, et al. Diagnosing *H. pylori* in patients on proton pump inhibitors: A role for near patient testing? *Gastroenterology* 1997; 112:A270 (Abstract)
- Hosking, SW. et al. Differing prevalence of *Helicobacter* in bleeding and nonbleeding ulcers. *Gastroenterology* 1992; 102:A85.