

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO  
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE  
LABORATORIO: ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA),  
WESTERN BLOT Y REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR); PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*, A PARTIR DE  
MUESTRAS DE HECES, SUERO Y SALIVA

Tesis de Grado para obtener el Título de Especialidad

POR: Lic. SANDRA PARISACA MAMANI

TUTORA: Dra. JAQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

LA PAZ-BOLIVIA

Febrero, 2018

## DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO.

A mis padres; sin su ayuda y constante apoyo es seguro que no estaría donde estoy ni sería lo que soy.

A mis hermanos; por enseñarme que sabiendo afrontar los obstáculos toda meta puede ser alcanzada.

A mi tutora, Dra. Jaqueline Calla de Magariños, sin su ayuda y apoyo no habría realizado todo este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi tutora, Dra. Jaqueline Calla de Magariños, por su ayuda, constantes consejos, por guiar mis pasos en el área de inmunología y hacia este trabajo, y por darme la oportunidad de desarrollarme en su laboratorio. Gracias por darme una oportunidad y por creer en mí.

Al Dr. Carlos Nishi Koide, quien con su apoyo e incondicional ayuda, contribuyo en la recolección de muestras y datos fundamentales para este trabajo. Esto no hubiese dado frutos sin su apoyo.

A todo el personal del Instituto SELADIS por estar conmigo y apoyarme desde el inicio hasta el final de esta aventura.

Al IITCUP (Instituto de Investigaciones Técnico Científicas) y a la Lic. Daniela Artega por su apoyo y colaboración en el presente trabajo.

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
4. JUSTIFICACIÓN .....	21
5. OBJETIVOS .....	23
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	23
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	23
6. MARCO TEORICO.....	24
6.1. DEFINICIÓN DE HELICOBACTER <i>PYLORI</i> .....	24
6.2. HISTORIA .....	24
6.3. CARACTERISTICAS GENERALES.....	26
6.4. INFECCIÓN POR HELICOBACTER <i>PYLORI</i> .....	27
6.4.1. TRANSMISIÓN.....	28
6.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	28
6.4.3. FISIOPATOLOGÍA E INMUNIDAD .....	29
6.4.3.1. GENES ASOCIADOS A LA PATOGENIA .....	30
6.4.3.2. EFECTOS PATOLÓGICOS EN EL ORGANISMO HUMANO .....	32
6.5. EPIDEMIOLOGÍA .....	37
6.6. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO .....	39
6.6.1. MÉTODOS QUE REQUIEREN DE LA ENDOSCOPIA PARA LA TOMA DE MUESTRA .....	39
6.6.1.1. PRUEBA RÁPIDA DE LA UREASA (PRU) .....	39
6.6.1.2. HISTOLOGÍA.....	41
6.6.1.3. CULTIVO .....	42
6.6.2. MÉTODOS QUE NO REQUIEREN DE LA ENDOSCOPIA PARA LA TOMA DE MUESTRA .....	43
6.6.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	43
6.6.2.2. PRUEBA DEL ALIENTO DE UREA.....	44
6.6.2.3. SEROLOGÍA .....	45
6.6.2.4. DETECCIÓN DEL ANTÍGENO .....	46
6.6.3. DETECCIÓN DE HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN CAVIDAD ORAL.....	47

6.7.	TRATAMIENTO .....	48
7.	PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS .....	50
7.1.	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE IgG, IgM ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> .....	50
7.2.	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO DE HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN HECES .....	51
7.3.	WESTERN BLOT PARA LA DETERMINACIÓN DE IgG ANTI-HELICOBACTER <i>PYLORI</i> .....	51
7.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .....	52
8.	GOLD ESTÁNDAR (PATRON DE ORO).....	53
9.	METODOLOGÍA .....	54
9.1.	FLUJOGRAMA DE ESTUDIO .....	54
9.1.1.	RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN .....	54
9.1.2.	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	55
9.1.3.	DETERMINACIÓN DE IgG E IgM ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> POR EL MÉTODO ELISA .....	56
9.1.4.	DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO DE HELICOBACTER <i>PYLORI</i> POR EL MÉTODO ELISA .....	56
8.1.5.	DETERMINACIÓN DE IgG ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> POR WESTERN BLOT 58	
8.1.6.	EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	58
8.1.7.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	59
8.2.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	60
8.3.	CONTEXTO Y LUGAR.....	60
8.3.1.	TAMAÑO DE MUESTRA .....	60
8.3.2.	MUESTRAS BIOLÓGICAS EN ESTUDIO .....	60
8.3.3.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	61
8.3.4.	ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	61
9.	RESULTADOS.....	62
9.1.	VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, ÍNDICE DE VALIDEZ Y VALORES PREDICTIVOS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA). .....	64
9.1.1.	DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CORTE DEL MÉTODO ELISA IgG ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN SUERO .....	68

9.1.2.	DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CORTE DEL MÉTODO ELISA IgM ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN SUERO.....	70
9.2.	VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL WESTERN BLOT IgG ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN SUERO.....	72
9.3.	VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN HECES .....	73
9.4.	EVALUACIÓN DE DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS Y ANTICUERPOS ANTI HELICOBACTER <i>PYLORI</i> EN MUESTRAS DE SALIVA.....	74
10.	DISCUSIÓN .....	77
11.	CONCLUSIÓN .....	86
12.	BIBLIOGRAFIA.....	89

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cantidad de pacientes y muestras obtenidas en el estudio.....	52
TABLA 2 Resultados obtenidos mediante el método ELISA, el método Western Blot y la técnica PCR, a partir de los 58 pacientes con test de ureasa positivo y 36 con test de ureasa negativo. ....	53
TABLA 3. Valoración de la concordancia entre los métodos ELISA Ac anti <i>H. pylori</i> IgG e IgM en suero, ELISA antígeno en heces, Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i> en suero y PCR en muestra de heces ante el Test de ureasa aplicando el índice kappa.....	54
TABLA 4. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgG anti <i>H. pylori</i> y el test de ureasa.....	55
TABLA 5. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgM anti <i>H. pylori</i> y el test de ureasa.....	56
TABLA 6. Distribución de muestras positivas y negativas mediante la detección de antígeno en heces por el método ELISA y el test de ureasa. ....	57
TABLA 7. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgG anti <i>H. pylori</i> (con el valor de corte de 33 U/ml) y el test de ureasa .....	58
TABLA 8. Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos mediante el método ELISA IgG anti <i>H. pylori</i> (con el valor de corte de 33 U/ml) y el test de ureasa.....	59
TABLA 9. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgM anti <i>H. pylori</i> (con el valor de corte de 30 U/ml) y el test de ureasa .....	60
TABLA 10. Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos mediante el método ELISA IgM anti <i>H. pylori</i> (con el valor de corte de 30 U/ml) y el test de ureasa .....	61
TABLA 11. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i> y el test de ureasa .....	62
TABLA 12. Distribución de muestras positivas y negativas mediante la PCR y el test de ureasa..	63
TABLA 13. Sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del método ELISA, método Western Blot y la técnica PCR. ....	64
TABLA 14. Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i> en saliva y el test de ureasa .....	64
TABLA 15. Distribución de muestras positivas y negativas mediante la detección de antígeno en saliva por el método ELISA y el test de ureasa .....	65
TABLA 16. Sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del método ELISA y Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i> en saliva. ....	66

## **INDICE DE GRAFICAS**

GRAFICA 1. Relación entre la sensibilidad y especificidad de los valores obtenidos mediante el método ELISA IgG anti <i>H. pylori</i> .....	58
GRAFICA 2. Relación entre la sensibilidad y especificidad de los valores obtenidos mediante el método ELISA IgM anti <i>H. pylori</i> .....	60



## RESUMEN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacilo gram negativo; que infecta la mucosa gástrica de más de la mitad de la población mundial; causa gastritis, enfermedad ulceropéptica y se asocia tanto con carcinoma gástrico como con linfoma gástrico de células B del tejido linfoide asociado a mucosa. La prevalencia de infección por *H. pylori* es del 80%, en zonas rurales de Bolivia. En el departamento de La Paz, se reportó una prevalencia de infección por *H. pylori* del 62,9%.

Para diagnosticar la infección por *H. pylori* se emplean diferentes métodos: métodos que requieren de la endoscopia para la toma de muestra y métodos que no requieren de la endoscopia; entre las que se puede mencionar la prueba del aliento, detección de antígenos en heces, serología (detección de anticuerpos específicos), también se puede incluir la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestra de heces.

El presente estudio pretende comparar los métodos de diagnóstico: ELISA, Western Blot y PCR; para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, a partir de muestras de heces, suero y saliva.

La población en estudio estuvo constituida por pacientes sintomáticos con una posible infección de *H. pylori*, se les realizó la endoscopia para el test de ureasa en el Hospital Obrero de la ciudad de La Paz-Bolivia. Se tomó una muestra de sangre y saliva, además de recolectar la muestra de heces, por paciente. Con el suero de los paciente se realizó el método ELISA IgG e IgM anti *H. pylori* y el método Western Blot IgG anti *H. pylori*. Con la muestra de saliva se realizó el método Western Blot IgG anti *H. pylori* y la determinación del antígeno de *H. pylori* mediante el método ELISA. Con la muestra de heces se realizó la detección del antígeno de *H. pylori* mediante el método ELISA y la técnica PCR nested.

De los 94 pacientes en estudio: 58 tuvieron un test de ureasa positivo y 36 tuvieron un test de ureasa negativo. Al comparar el método ELISA IgG e IgM anti *H. pylori* con el test de ureasa se obtuvo una sensibilidad del 93% y 53%, una especificidad del 53% y 64% respectivamente. Al comparar el método ELISA antígeno en heces con el test de ureasa se obtuvo una sensibilidad del 80% y especificidad del 67%. Al comparar el método Western Blot IgG anti *H. pylori* con el test de ureasa se obtuvo una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 17%. Por ultimo al comparar la técnica PCR nested con el test de ureasa se obtuvo una sensibilidad del 75% y una especificidad del 46%.

Este estudio demostró que los métodos: ELISA, Western blot y PCR poseen una alta sensibilidad, son cómodos para el paciente en la toma de muestra, pueden ser aplicados en estudios a población en general. Además demostramos que no es necesario recurrir a la endoscopia para el diagnóstico de *H. pylori*, teniendo otras opciones de métodos de diagnóstico. También este estudio fue un paso inicial para la aplicación de muestras de saliva para el diagnóstico de esta infección, tanto en la detección de antígenos o de anticuerpos anti *H. pylori*.

## SUMMARY

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a gram-negative bacillus; than the gastric mucosa of more than half the world population; causes gastritis, ulcero-peptic disease and yes association with gastric carcinoma as with gastric B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. The prevalence of *H. pylori* infection is 80%, in rural areas of Bolivia. In the department of La Paz, a prevalence of *H. pylori* infection of 62.9% was reported.

Different methods are used to diagnose *H. pylori* infection: methods that require endoscopy for sampling and methods that do not require endoscopy; Between the detection of antibodies, the detection of specific antibodies, the polymerase chain reaction (PCR) can also be included in the stool sample.

The present study aims to compare the diagnostic methods: ELISA, Western Blot and PCR; for the diagnosis of *H. pylori* infection, from stool, serum and saliva samples.

The study population consisted of symptomatic patients with a possible infection of *H. pylori*, the endoscopy was performed for urease examination in the Obrero Hospital of the city of La Paz-Bolivia. A sample of blood and saliva was taken, in addition to collecting the stool sample, per patient. The ELISA IgG and IgM anti-*H. pylori* method and the Western Blot IgG anti *H. pylori* method were performed with the patients serum. The western blot IgG anti *H. pylori* method and the determination of *H. pylori* antigen by ELISA were performed with the saliva sample. The detection of *H. pylori* antigen was carried out with the stool sample using the ELISA method and the nested PCR technique.

Of the 94 patients under study: 58 had a positive urease test and 36 had a negative urease test. When comparing the ELISA method IgG and IgM against *H. pylori* with the urease test, it obtained a sensitivity of 93% and 53%, a specificity of 53% and 64% respectively. When comparing the ELISA method antigen in faeces with the urease test, it obtained a sensitivity of 80% and specificity of 67%. When comparing the Western Blot IgG anti *H. pylori* method with the urease test, it obtained a sensitivity of 96% and a specificity of 17%. Finally, when comparing the nested PCR technique with the urease test, a sensitivity of 75% and a specificity of 46% were obtained.

This study showed that the methods: ELISA, Western blot and PCR have a high sensitivity, are comfortable for the patient in the sample, can be applied in studies to the general population. We also show that it is not necessary to resort to endoscopy for the diagnosis of *H. pylori*, having other options of diagnostic methods. This study was also an initial step for the application of saliva samples for the diagnosis of this infection, both in the detection of antibodies and of *H. pylori*.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacilo gram negativo; que infecta la mucosa gástrica de más de la mitad de la población mundial; causa gastritis, enfermedad ulcero-péptica y se asocia tanto con carcinoma gástrico como con linfoma gástrico de células B del tejido linfoide asociado a mucosa (Stewart G, 1993). Esta fuerte asociación de *H. pylori* con cáncer gástrico ha hecho que sea declarado por la Organización Mundial de la Salud como carcinógeno clase I (Walker NN, 2006).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía ampliamente según la zona geográfica, la edad, la raza y el nivel socioeconómico. La prevalencia llega al 90% en los países en vías de desarrollo y al 50% en los países desarrollados (Ramirez RA, 2003). Trabajos realizados en Bolivia han demostrado prevalencias de infección por *H. pylori* que oscilan entre el 50 y 73% (Catoira MR., 1994; Benach J, 2004; Lozano J, 2006).

En recientes estudios se encontró una prevalencia de *H. pylori* del 80%, en zonas rurales de Bolivia (Sivapalasingam S1, 2014). En el departamento de La Paz, se encontró una prevalencia del 62,9% (Ruiz R, 2013).

Para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* hay varios métodos que se pueden emplear a fin de descubrir la presencia de esta bacteria. Métodos que requieren de la endoscopia para la toma de muestra: como el test de ureasa, el cultivo, la histopatología y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en biopsia. Métodos que no requieren de la endoscopia que incluyen: la prueba del aliento, detección de antígenos en heces, serología (detección de anticuerpos específicos) y también se incluye la PCR en muestra de heces (McNulty CAM, 2011).

Como se mencionó la prueba PCR puede requerir o no de una endoscopia, debido a que mediante esta podemos detectar la presencia de *H. pylori* en diferentes tipos de muestras clínicas, como ser: biopsia, heces y saliva, entre otras.

Las pruebas serológicas se han propuesto como una ayuda en el diagnóstico de las infecciones por *H. pylori*. Estas pruebas son poco invasivas, fáciles de realizar, reproducibles, económicas y ampliamente empleada en estudios epidemiológicos (Gatta L, 2003). Los

inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa, como el Western Blot, son muy útiles para evaluar la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos, como *VacA* y *CagA*, lo que permite establecer relaciones con patologías más severas (Vilaichone R.K., 2003).

La detección de antígeno en heces es otro método no invasivo el cual tiene una alta sensibilidad y especificidad. Este método detecta la presencia de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces mediante: inmunoensayo enzimático (ELISA) o métodos basados en ensayo de inmunocromatografía (Gisbert JP d. l., 2006).

El presente estudio pretende enfocarse en la comparación de métodos de laboratorio: ELISA, Western Blot y PCR; para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, a partir de muestras de heces, suero y saliva.

## 2. ANTECEDENTES

*H. pylori*, que fue aislado por primera vez en 1983; es el principal factor etiológico para el desarrollo de la gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. Infecciones por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población adulta a nivel mundial (Wang Y., 2015 ).

Una variedad de métodos para la detección de *H. pylori* se han descrito poco después de la identificación de este patógeno y que han ido continuamente mejorando y ampliándose con el tiempo.

Numerosas pruebas se basan en la detección de anticuerpos anti *H. pylori*; estas pruebas están ampliamente disponibles para el diagnóstico de *H. pylori*, entre ellas el método ELISA, siendo este el más común.

Ueda J. et al. evaluó la utilidad del método ELISA IgG anti *H. pylori* para la detección de una infección por *H. pylori* entre los niños japoneses. Entre los datos obtenidos en su estudio indica que ni el sexo ni la edad se asocian significativamente con la presencia de *H. pylori*. Entre sus resultados obtenidos cuando se utilizó el punto de corte recomendado por el fabricante del kit, la sensibilidad y especificidad fueron del 91,2% y 97,4%, respectivamente; al utilizar el valor de corte según los resultados obtenidos en su estudio los resultados fueron similares, excepto que la sensibilidad aumento a un 97,0%. Estos valores fueron obtenidos utilizando la detección del antígeno en heces por el método ELISA como gol estándar. (Ueda J, 2014)

Mattana et al. realizo un estudio en el cual determino la relación entre la detección de infección por *H. pylori* mediante el método ELISA IgG anti *H. pylori* y mediante técnicas invasivas (biopsia, test de ureasa y cultivo), en un grupo de individuos asintomáticos seleccionado al azar y de individuos con síntomas gástricos de la población general de la ciudad de San Luis, Argentina. En su estudio utilizaron el valor de corte según los resultados cuantitativos que obtuvieron en el método ELISA IgG anti *H. pylori*, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 98% y 87%, respectivamente, del método ELISA IgG anti *H. pylori* utilizando como gold estándar las técnicas invasivas (biopsia, test de ureasa y

cultivo). Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos permiten concluir que la eficacia diagnóstica de este análisis lo hace apropiado como prueba de cribado de la enfermedad gastroduodenal asociada a *H. pylori*, observándose una buena correlación entre seropositividad e infección activa (Mattana C., 2004).

Ballam L. et al. indica que el diagnóstico salival de la infección por *H. pylori* ofrece posibilidades atractivas para el estudio de la infección en niños. En su estudio investigo el rendimiento del método Western blot en muestras de saliva para la detección de anticuerpos IgG anti *H. pylori*, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 64 y 87% respectivamente, al compararlo con los resultados obtenidos en suero mediante el método Western blot. También utilizo el método ELISA para la detección de anticuerpo anti *H. pylori* en suero y saliva, obteniendo una sensibilidad y especificidad del método ELISA en saliva del 64% y 87%, respectivamente, al compararlo con los resultados obtenidos en suero mediante el método ELISA. En el estudio de Ballam et al. concluyen que la detección de anticuerpos IgG anti *H. pylori* en saliva mediante el método Western blot es útil en el diagnóstico de infección por *H. pylori* y es superior al método ELISA (Ballam L., 2000).

Fallone et al. examino el rendimiento del método ELISA para la detección de IgG anti *H. pylori* a partir de muestras de saliva, encontrando una correlación estadísticamente significativa entre los resultados en sangre y en la saliva. Al comparar los resultados obtenidos de IgG anti *H. pylori* en saliva ante los resultados de IgG anti *H. pylori* en suero obtuvieron una sensibilidad del 84% y una especificidad del 81%. En comparación con la histología gástrica, el rendimiento del ensayo de IgG salival disminuyó a una sensibilidad del 66% y especificidad del 74% (Fallone, y otros, 1996).

El método ELISA también es aplicado para la detección del antígeno de *H. pylori*. Gonzáles et al. evaluó la utilidad diagnóstica de la detección de antígenos de *H. pylori* en heces al compararla con los métodos invasivos: histología, test de ureasa y serología (método ELISA IgG e IgA), en la población pediátrica chilena. Con los valores de corte determinados por el fabricante, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 90% y 93%, respectivamente. Sin embargo, al ajustar los valores de corte del test para su población pediátrica por medio de curvas ROC, los nuevos valores de sensibilidad y especificidad fueron de 90%, 100%, utilizando los métodos invasivos: histología, test de ureasa y

serología (método ELISA IgG e IgA), como gold estándar. Los resultados exhibidos por González et al. posicionan al método ELISA para detección del antígeno en heces como una excelente herramienta clínica y epidemiológica para estudiar a niños con sospecha de infección por *H. pylori* (González CG, 2007 ).

Morales et al. evaluó la sensibilidad y especificidad de la detección del antígeno en heces mediante el método ELISA, en pacientes con síntomas digestivos sugerentes de enfermedad ulcerosa, dispepsia o reflujo. En este estudio obtuvieron una sensibilidad del 97,6% y especificidad del 76,2% al compararlo con el test de ureasa y el frotis teñido de mucosa gástrica. Indicando que esta prueba sería de utilidad para diagnosticar infección activa, pudiendo ser aplicada en estudios a población en general (Morales A., 2002).

Estudios recientes han demostrado que el método Western Blot es más sensible y específico que el método ELISA. Us D. et al. evaluó el valor diagnóstico del método de Western Blot en el diagnóstico serológico de infecciones por *H. pylori*, en una población de 23 pacientes que fueron diagnosticados como infección por *H. pylori* con los resultados positivos de al menos tres de los métodos convencionales (cultivo y reacción en cadena de la polimerasa de muestras de biopsia endoscópica, prueba de aliento con urea 13C, métodos ELISA IgG en suero). Se obtuvo lo siguiente: La sensibilidad del método Western Blot-IgG anti *H. pylori* y Western Blot-IgA anti *H. pylori* se estimó como 100% y 39%, respectivamente; a partir de muestras de suero. Como resultado, el método Western blot – IgG anti *H. pylori* parece ser útil y fiable para la detección de perfiles de anticuerpos frente a antígenos de *H. pylori* y factores de virulencia, en lugar de rutina y de tamizaje, sin embargo el valor diagnóstico del método Western blot –IgA anti *H. pylori* es bajo (Us D, 2002 ).

Tijerina et al. evaluó la utilidad del Western blot para la detección del genotipo de *vacA* y *cagA* de *H. pylori*. El método Western-blot y el método ELISA a partir de muestras de suero, para la detección de anticuerpos anti *H. pylori*, presentaron sensibilidades diagnósticas del 89% y 88% y especificidad diagnóstica del 73% y 71%, respectivamente, comparados con el estudio histológico. La determinación de anticuerpos anti-VacA y anti-CagA con la técnica de Western blot es un método no invasivo, útil para determinar la infección por cepas de *H. pylori* virulentas (Tijerina R., 2002).

En el estudio de Eugenia Ma. et al. se realizó una comparación de la sensibilidad y especificidad del método ELISA y el método Western blot en la detección de la IgG anti *H. pylori*, trabajaron con 83 pacientes referidos al Servicio de Gastroscofia del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia, Costa Rica. Al comparar los resultados obtenidos con las muestras de suero estudiadas serológicamente por el método ELISA y Western blot, se pueden observar resultados semejantes entre ambos métodos. En este estudio obtuvieron resultados semejantes entre ambos métodos, al obtener en el método ELISA y el método Western blot IgG anti *H. pylori* una sensibilidad diagnóstica del 89% y el 88% y especificidad diagnóstica del 73% y el 71%, respectivamente, comparados con el estudio histológico (Eugenia Ma., 2000).

Se realizaron estudios sobre la utilidad diagnóstica de la muestra de saliva en el diagnóstico de infección por *H. pylori* mediante el método Western blot IgG anti *H. pylori*. El estudio realizado por Ballam L. et al. obtuvo una sensibilidad y especificidad del 73% y 92% respectivamente, utilizando el método ELISA en suero como gold estándar, llegando a la conclusión de que el método Western blot en muestras de saliva es potencialmente útil para el diagnóstico pediátrico al ser no invasivo (Ballam L., 2000).

Mounia et al. comparo la presencia de *H. pylori* en muestras de saliva con la presencia de esta bacteria en la mucosa del estómago. Obtenido como resultado mediante el método Western blot una baja sensibilidad (29,79%) y alta especificidad (90,70%) al compararlo con la histología y la PCR en biopsia gástrica. Este estudio demostró una baja detección de *H. pylori* en la saliva en comparación con la mucosa gástrica, pero también obtuvieron una alta especificidad en este tipo de muestra, lo que sugiere que la saliva puede ser considerada como un reservorio para *H. pylori*. Por lo tanto, medir la extensión de *H. pylori* en la saliva aún está en estudio para un diagnóstico preciso de esta bacteria en la población de estudio Morocco (Mounia E., 2008).

La prueba de la PCR se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de *H. pylori* a partir de muestras de biopsia gástrica, saliva, heces, jugo gástrico entre otras. Esta prueba proporciona una excelente sensibilidad y especificidad, mayor al 95%, en comparación con otras pruebas convencionales (Wang Y., 2015 ; Momtaz H, 2012). Momtaz H. et al. comparo el genotipo de *H. pylori* aislado de la saliva, placas dentales, biopsia gástrica y heces de cada



paciente con el fin de evaluar el modo de transmisión de la infección por *H. pylori*. En relación con la alta similitud en el genotipo de *H. pylori* a partir de la saliva, el estómago y las heces, este estudio apoya la idea de que la principal vía de transmisión de *H. pylori* es fecal-oral y la cavidad oral puede servir como reservorio para *H. pylori*, sin embargo, la diversidad notable de genotipos entre el estómago, la saliva y las muestras de heces muestra que más de un genotipo *H. pylori* puede existir en un mismo paciente (Momtaz H., 2012).

Hay muchas modificaciones de la tecnología de PCR para aumentar la sensibilidad de la detección. Se ha sugerido el uso de la PCR anidada utilizando el cebador interno dirigido al gen conservado y aumentando la especificidad y la sensibilidad hasta el 100% (Kumar S., 2014 ).

Pazos A. et al. determino la fiabilidad de la prueba de PCR anidada del gen *ureC* en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*; en un centro de gastroenterología pediátrico de Cali en el cual incluyeron 177 niños sintomáticos menores de 10 años. Obtuvieron una sensibilidad del 78,4% y especificidad del 89,3% frente a la prueba de referencia, la cual fue la histología. Concluyendo que para propósitos diagnósticos puede haber métodos más fiables; pero para genotipificación los métodos moleculares son indispensables (Pazos A., 2002).

En la revisión de Wang Y. et al. en la detección del antígeno en heces mediante el método ELISA que utiliza un anticuerpo monoclonal para comprobar nla presencia de *H. pylori* mostró un 92,4% de sensibilidad y especificidad del 100% en los adultos en comparación con la PCR en tiempo real (Wang Y., 2015 ).

Ismail H. et al. desarrollo una nueva técnica PCR anidada para identificar el ADN de *H. pylori* en placa dental. Cuando los resultados de la técnica PCR anidados se compararon con los resultados de la histología no hubo diferencia significativa entre los 2 métodos. Obteniendo que la técnica PCR anidada dio un índice de detección más alto (40,8%) que la de la histología (36,7%). De esta manera concluye que el ensayo de PCR anidada recientemente desarrollado es al menos tan sensible como la histología y puede ser útil para la detección de *H. pylori* en pacientes no aptos para el examen endoscópico (Ismail H., 2016).

Monteiro et al. realizó una comparación entre métodos invasivos y no invasivos, comparando las pruebas invasivas como ser el cultivo, test de ureasa, histología y PCR en biopsia, ante las pruebas no invasivas como ser la prueba del aliento, método ELISA IgG anti *H. pylori* y la detección del antígeno en heces. Trabajaron con pacientes sintomáticos de una infección por *H. pylori*, sin tratamiento previo. En este estudio indicaron una sensibilidad de las pruebas no invasivas que oscila entre 88,9% y 95,6% y una especificidad que oscila entre 92,6% y 98,1%, en este estudio indican que las pruebas no invasivas son precisas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, además que la detección del antígeno en heces mediante el método ELISA es una prueba directa no invasiva prometedora que puede aplicarse fácilmente para evaluar la infección por *H. pylori* (Monteiro L., 2001).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*H. pylori* es una bacteria que infecta la mucosa gástrica de más del 50 % de la población mundial. Presenta una alta prevalencia en países en vías de desarrollo por sus inadecuadas condiciones de saneamiento ambiental y por la extendida contaminación del agua, y a través de esta, la contaminación de hortalizas y vegetales.

*H. pylori* ha sido reconocido como el factor etiológico más importante en el desarrollo de diversas afecciones gástricas como; gastritis, úlcera, cáncer gástrico y el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (linfoma MALT). La hemorragia digestiva alta es una causa importante de mortalidad, morbilidad y altos costos médicos, siendo la úlcera péptica la causa más frecuente de sangrado. Se estima un riesgo > 10%, de desarrollar enfermedad ulcero péptica en personas infectadas con *H. pylori*.

Por el potencial patogénico de esta bacteria, resulta necesario contar con métodos eficaces para su detección. Las pruebas de apoyo al diagnóstico por *H. pylori* habitualmente se dividen en pruebas basadas en la endoscopia (Histología, test de ureasa, cultivo y PCR) y pruebas que no requieren dicho procedimiento (ELISA, Western Blot, PCR, test del aliento).

La endoscopia es un procedimiento costoso y causa molestias en el paciente; este procedimiento normalmente se realiza en centros de salud de tercer nivel, debido al equipo y condiciones que requiere la endoscopia.

La endoscopia digestiva también puede asociarse a complicaciones, que pueden poner la vida o la integridad física del paciente en peligro. Los riesgos asociados con la endoscopia digestiva incluyen: reacciones adversas al sedante, sangrado causado por biopsia, punción accidental del tracto gastrointestinal superior (Hiyama T., 2009).

La sensibilidad y especificidad del examen histológico en el diagnóstico de *H. pylori*, varía entre 53% a 90% dependiendo de la práctica clínica, la densidad de la colonización, la experiencia del histopatólogo y del consumo de medicamentos anti-secretorios. En el estudio realizado por Martínez L. et al. mediante la histología obtuvo una sensibilidad del 83% y una especificidad del 25%, al compararlo con el cultivo (Martínez L., 2016).

El cultivo de la bacteria tiene una sensibilidad entre 70% y 95% al menos cuando se trata de material gástrico obtenido mediante biopsia. Sin embargo requiere de medios de cultivo especiales, condiciones de incubación microaerófila e incubación de 5 a 7 días y no es apropiado para el estudio de muestras en los que haya otros agentes patógenos en cantidad considerable como sucede con la materia fecal o la saliva.

Si bien el test de ureasa tiene una gran utilidad para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* por ser barato, rápido, fácil de realizar, altamente específico y ampliamente disponible. El test de ureasa puede dar resultados falsos negativos en individuos con sangrado reciente o activo del tracto gastrointestinal superior, también en casos que el paciente tome inhibidores de bomba de protones.

La especificidad del método que se emplee para el diagnóstico de *H. pylori* debe ser muy alta (próximo al 100%), para que se aplique de forma temprana el tratamiento correcto. Por lo cual es necesario comparar los diferentes métodos de diagnóstico que no requieren endoscopia, como ser: El método ELISA para la detección de anticuerpos específicos, detección del antígeno en heces, método Western Blot y la técnica PCR. Para poder optar por la más conveniente, de tal manera que se eviten las molestias para el paciente y los costos asociados en relación a la endoscopia gástrica.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Una de las prioridades en la investigación para el diagnóstico de infecciones por *H. pylori* es contar con técnicas de diagnóstico de bajo costo, baja complejidad en la toma de muestra, con una alta sensibilidad y especificidad, técnicas que puedan generalizarse en laboratorios de diferente nivel, aplicables en niveles de atención primaria y secundaria.

Se debe tener en cuenta que los pacientes con enfermedad ulcerosa gastroduodenal pueden desarrollar complicaciones graves, como hemorragia digestiva o perforación, siendo necesario realizar un diagnóstico preciso de la infección por *H. pylori*, ya que su erradicación reduce considerablemente las recidivas ulcerosas y sus complicaciones. Las pruebas que requieren de la endoscopia, en estas situaciones podrían inducir una disminución de la sensibilidad diagnóstica.

Aunque varias pruebas de diagnóstico están disponibles para la detección de *H. pylori*, todos ellos tienen tanto ventajas como desventajas. Para definir el valor o la utilidad de una prueba diagnóstica, cada prueba tiene que ser comparada con un estándar de oro (Kumar S., 2014 ).

El test de ureasa, en pacientes que se les realiza la endoscopia, se considera el método invasivo de elección por su sencillez, precisión y rapidez del resultado. Ofrece resultados similares a los obtenidos en la histología; mayor velocidad de disponibilidad de los resultados, que pueden estar desde la primera hora hasta las 24 horas, motivo por el cual es aplicada de forma rutinaria en nuestro medio para el diagnóstico de *H. pylori*. Razón por la cual este estudio utilizo como estándar de oro al test de ureasa.

El método ELISA es poco invasivo, en el caso de la determinación de anticuerpos en suero, o puede ser totalmente no invasivo en el caso de la detección del antígeno en heces, fácil de realizar, reproducible, económica y ampliamente empleada en estudios epidemiológicos. En el caso de ser totalmente no invasivo, es muy útil para el diagnóstico de la infección en pacientes de cualquier edad, sobre todo en niños.

La determinación de anticuerpos salivales es una alternativa potencialmente útil en el diagnóstico de *H. pylori*, principalmente en niños, ya que es totalmente no invasivo, no requiere ninguna preparación de la muestra. La respuesta inmune de anticuerpos específicos

contra *H. pylori* se pueden detectar usando una variedad de métodos, como ser el método ELISA o el método Western Blot.

Estudios recientes han demostrado que el método Western Blot es más sensible y específico que el método ELISA para la detección de anticuerpos anti *H. pylori*, y también permite la detección de perfiles de anticuerpos contra diferentes antígenos bacterianos, incluyendo los factores de virulencia. El método Western Blot es útil para evaluar la presencia de anticuerpos frente al antígeno de forma específica, como *VacA* y *CagA*, lo que permite establecer relaciones entre el desarrollo de patologías más severas y la presencia de determinados antígenos de *H. pylori*.

Al conocer que la técnica PCR se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de *H. pylori* a partir de muestras de biopsia gástrica, heces, jugo gástrico y muestras variables; se aplicó esta técnica en el presente estudio, en muestras de heces. Entre las ventajas de la técnica PCR podemos mencionar que; detecta un menor número de bacterias en la muestra, se obtienen resultados en un corto tiempo, además que la sensibilidad y especificidad de este método es alta. Se puede aplicar este método en muestras de heces, de esta manera puede considerarse un método totalmente no invasivo.

Al comparar estos métodos ELISA (en muestras de suero, saliva y heces), Western blot (en muestras de suero y saliva) y PCR (en muestra de heces) ante el test de ureasa se podrá conocer cuan sensibles y específicos son para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en nuestra región. Al obtener estos datos se podrá demostrar que no es necesario recurrir a la endoscopia para el diagnóstico de esta infección, que se puede optar por otros métodos no invasivos para el paciente, de esta manera se beneficiara a la población que presenta una infección por *H. pylori*, dando más opciones en cuanto al tipo de muestra y método de diagnóstico.

Por lo cual se destaca la necesidad de comparar estos métodos de diagnóstico en nuestro medio, con el fin de permitir al médico tomar decisiones más rápidas y precisas sobre el tratamiento del paciente; y así mismo darle al paciente mejores opciones en la obtención de muestras. Brindar a la población métodos de diagnóstico que no requieran de la endoscopia para la toma de muestra, métodos de bajo costo y que ayuden a pronosticar patologías más severas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

- Comparar los métodos de laboratorio: Ensayo inmunoenzimático (ELISA), Western Blot y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); para el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*, a partir de muestras de heces, suero y saliva.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del Ensayo inmunoenzimático (ELISA).
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del Western Blot.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Evaluar la determinación de antígenos específicos y anticuerpos anti *H. pylori* en muestras de saliva.

## **6. MARCO TEORICO**

### **6.1. DEFINICIÓN DE HELICOBACTER PYLORI**

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram negativa en forma de espiral que infecta el epitelio gástrico humano. Causa gastritis, enfermedad ulcero-péptica y se asocia tanto con carcinoma gástrico como con linfoma gástrico de células B del tejido linfoide asociado a mucosa (Stewart G, 1993). En muchos casos, los sujetos infectados nunca llegan a desarrollar ningún tipo de síntoma. Esta bacteria vive exclusivamente en el estómago humano. Debido a la característica morfológica espiral deriva el nombre de la *Helicobacter*, y puede «atornillarse» literalmente por sí misma para colonizar el epitelio estomacal. Existen otras especies del género *Helicobacter* que infectan la mucosa gástrica pero son infrecuentes. (Baron S., 1996).

### **6.2. HISTORIA**

En 1875, científicos alemanes descubrieron bacterias espirales en el epitelio del estómago humano. Estas bacterias no podían ser cultivadas, y por consiguiente este descubrimiento se olvidó en aquel entonces. En 1892, el investigador italiano Giulio Bizzozero describió una serie de bacterias espirales que vivían en el ambiente ácido del estómago de perros, dicho organismo fue nombrado después *Helicobacter bizzozeroni* en 1996 (Konturek SJ, 2005 ).

En 1899 Walery Jaworski en Cracovia estudiando aspirados gástricos de humanos, describió bacterias alargadas de forma espiral, a las que denominó *Vibrio regula*, siendo el primer investigador en informar la posible participación de este microorganismo en las enfermedades gástricas, y aun cuando el estudio fue incluido en un libro de gastroenterología, no tuvo la difusión que merecía por que se publicó en polaco (Konturek SJ, 2005 ).

En 1906 Krienitz ( otras publicaciones lo nombran Karientz ) encuentra bacterias espirales en la mucosa de estómagos de pacientes que tuvieron cáncer.

En 1979 Robin Warren identifica una bacteria, estudiando las biopsias gástricas de un paciente con gastritis crónica activa, iniciándose en dicho año la era del *H. pylori*; las



investigaciones del patólogo Robin Warren continúan estudiando biopsias de pacientes con gastritis, describiendo bacterias en forma de espirales localizadas entre la capa mucosa y la superficie del epitelio, y durante dos años confirma dicho hallazgo; pero su mérito lo representó sin duda el asociar la presencia de la bacteria como posible factor etiológico o causal de alteraciones inflamatorias de grado variable de la mucosa gástrica del hombre (González MJE, 2004).

En 1981 el gastroenterólogo clínico Barry Marshall confirma y apoya los descubrimientos del patólogo, y en 1982 logran el cultivo de la bacteria del moco obtenido de once pacientes con gastritis demostradas también en biopsias, y lo contrario la ausencia de bacterias en biopsias de estómagos de pacientes normales. En 1983 ambos autores comunican sus observaciones, con estudios histopatológicos y tinciones de plata, denominando al germen *Campilobacter pyloridis* y después *Campilobacter pylori* (corrigiendo la gramática latina). Ese mismo año logran identificar al bacilo en el cultivo de moco gástrico, hecho que en múltiples comunicaciones lo denominan como fortuito, por tratarse de un cultivo olvidado por varios días (González MJE, 2004).

En 1989 en la 2ª Reunión del Grupo Europeo para el estudio del *Campilobacter* en Alemania, y por estudios filogenéticos y del ADN bacteriano se concluyó que el género debería ser el de *Helicobacter*, reconociéndose además como la única bacteria relacionada con las gastropatías, y cuya diferencia principal con el *Campilobacter* es la de que el *Helicobacter* es una bacteria que tiene flagelos en uno de los extremos en número variable de cuatro a ocho (Morales EMR C. R., 2016 ).

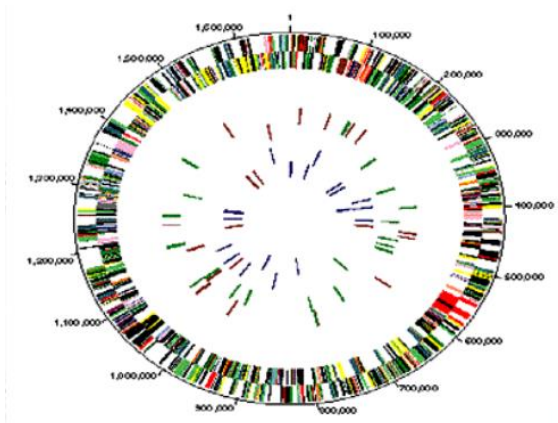
En 1994, los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos informaron que las úlceras gástricas más comunes eran causadas por *H. pylori*, y recomendaron el uso de antibióticos, siendo incluidos en el régimen de tratamiento. (Online NIH., 2004) En 2005, Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus trabajos acerca de *H. pylori* (Warren, 2005).

### 6.3. CARACTERISTICAS GENERALES

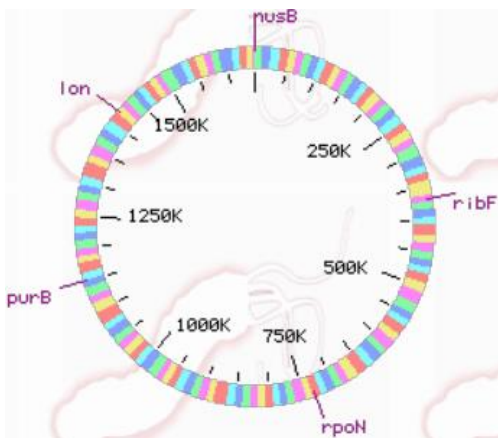
*H. pylori* tiene muchas características en común con los *Campylobacter*. Es una bacteria gram negativa, curva, espiriforme, muy móvil, no fermentadora, no oxidante que mide de 2.5 a 4 micras de longitud por 0.5 a 1 micra de ancho, con un mechón de flagelos en uno de sus extremos en número de 4 a 8 envainados y que le dan gran movilidad; la forma espiral es más evidente cuando se le identifica en las biopsias, pero cuando se le identifica en los cultivos la morfología es más recta y se aprecian bacterias que han perdido sus flagelos; además de que se han descrito formas redondas como cocos, habiéndose postulado tres posibilidades: una de que son formas de resistencia implicadas en la transmisión, que son formas viables pero no cultivables, o de que son formas de bacterias muertas (Morales EMR C. R., 2016).

Como bacteria gram negativa, comparte características estructurales de ellas, como son la presencia de una membrana plasmática y una membrana externa; su composición interna se caracteriza por un complejo constituido por elementos fibrilares nucleares y ribosomas, que se entremezclan entre sí, pudiendo mostrar en ocasiones bacteriófagos; como hecho importante es de que la vaina de sus flagelos tiene una estructura lipídica exactamente igual a la de la membrana externa, con la misión de proteger a los flagelos de la degradación del ácido (Morales EMR C. R., 2016).

Se ha definido la secuencia del genoma de *H. pylori* (1.65 millones de pares de bases) y codifica alrededor de 1 500 proteínas. En agosto de 1997 se publicó la secuencia completa del genoma de *H. pylori* 26695 (Figura 1), solo 15 años después de que se cultivara por primera vez. Posteriormente en enero de 1999, se ha secuenciado el genoma completo de J99 (Figura 2), otra cepa de *H. pylori*, permitiendo la comparación de los genomas.



**FIGURA 1.** Representación gráfica del primer genoma secuenciado de *H. pylori* 26695. Se puede observar el tamaño del genoma y los colores corresponden a regiones que codifican para proteínas con funciones diversas. Fuente: Tomb et al. Nature 1997; 388: 539-547.

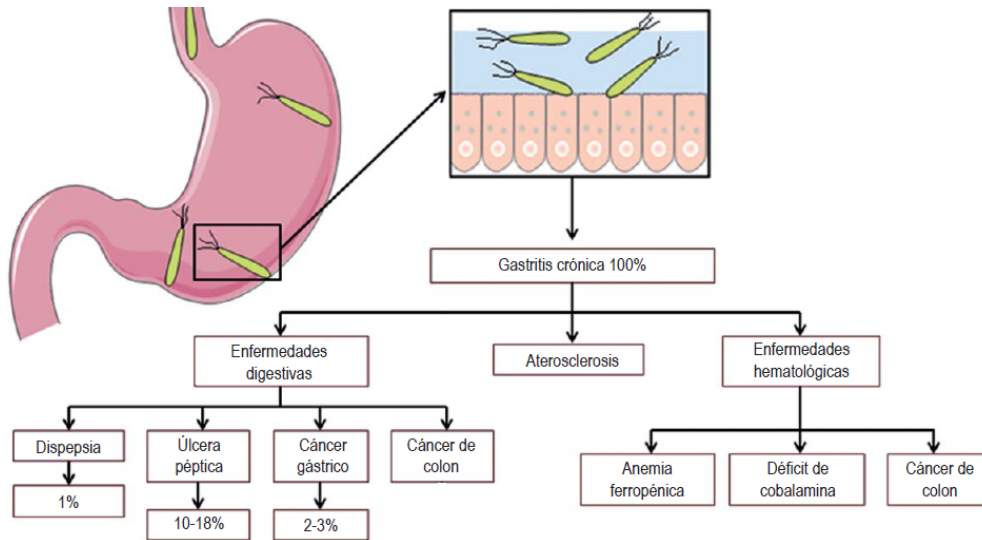


**FIGURA 2.** Representación gráfica del segundo genoma de *H. pylori* J99 secuenciado. Se puede observar el tamaño del genoma. Fuente: Alm et al. Nature 1999; 397:176-180.

#### 6.4. INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI

La infección por *H. pylori* puede ser sintomática o asintomática (sin efectos visibles en el enfermo); se estima que más del 70 % de las infecciones son asintomáticas. Esta infección que afecta a más de la mitad de la población mundial, se presenta con mayor prevalencia en países en desarrollo que en países industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población (Logan, 1996).

En ausencia de un tratamiento basado en antibióticos, una infección por *H. pylori* persiste aparentemente durante toda la vida. El sistema inmunitario humano es incapaz de erradicarla. Una infección por esta bacteria puede desarrollar diferentes afecciones como se observa en la figura 3 (Díaz U., 2013).



**FIGURA 3.** Enfermedades producidas por *H. pylori*. Esquema realizado usando imágenes individuales de servir medical art bajo sus condiciones de uso.

Fuente: Urrego J., Otero W., Gómez M. “*Helicobacter pylori* y enfermedades hematológicas”. 2013

#### 6.4.1. TRANSMISIÓN

Mediante estudios de laboratorio esta bacteria ha sido aislada de las heces, de la saliva y de la placa dental de los pacientes infectados, lo cual sugiere una ruta gastro-oral o fecal-oral como posible vía de transmisión, pero no se ha llegado a un consenso. Otros medios de infección son la ingesta de agua y alimentos contaminados o incluso el traspase de fluidos de forma oral con una persona contaminada (Morales EMR C. R., 2016).

En la actualidad, el área principal de la investigación en reservorios naturales de *H. pylori* ha incluido la cavidad oral; con la infección gástrica y la presencia de *H. pylori* en el estómago. Muchos estudios han sugerido que el depósito principal para *H. pylori* es la cavidad oral, pero en general, los resultados han sido muy inconsistente (Marques S., 2016), por lo cual hasta el momento no ha sido aclarada la forma de transmisión de esta bacteria.

#### 6.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Una vez que un individuo haya adquirido la infección por *H. pylori*, en la mayoría de los casos suelen no presentarse síntomas, lo que se traduce en que esta bacteria no causa ningún problema. Existen cepas de la bacteria más agresivas y cepas más indolentes, lo cual explica, en parte, la ocurrencia de síntomas apenas en pocas personas contaminadas (Morales EMR C. R., 2016).

Los pacientes contaminados con *H. pylori* que presentan quejas lo hacen por la presencia de gastritis o úlceras pépticas provocadas por la bacteria. En estos casos, los síntomas más comunes son (Pinheiro, 2015):

Dolor o incomodidad, generalmente como quemazón en la parte superior del abdomen.

- Sensación de hinchazón del estómago.
- Saciedad rápida del hambre, generalmente después de comer tan sólo una pequeña cantidad de alimento. (Pinheiro, 2015)

Estos síntomas reciben el nombre de dispepsia.

En el caso de úlceras, las siguientes señales y síntomas también son comunes:

- Náuseas o vómitos.
- Heces oscuras.
- Anemia.

Si el paciente no presenta gastritis ni úlceras, la simple presencia de *H. pylori* no puede ser responsabilizada por síntomas como dolores estomacales. A manera de ejemplo, varios estudios muestran que sólo 1 de cada 14 pacientes con quejas de quemazón estomacal, sin gastritis o úlcera documentadas en la endoscopia, presentan mejoría con el tratamiento para *H. pylori* (Pinheiro, 2015).

### **6.4.3. FISIOPATOLOGÍA E INMUNIDAD**

En el estómago humano, la región anatómica denominada antro es donde se lleva a cabo la mayor colonización por parte del *H. pylori* (Ricaurte Guerrero, 1997).

*H. pylori* produce diversas sustancias que le permite adaptarse al ambiente ácido del estómago, para anidar y vivir en la superficie de las células epiteliales gástricas. Debido a la presencia de los flagelos en sus polos, puede desplazarse hasta entrar en contacto con el epitelio gástrico, al que se puede unírsele gracias a la presencia de adhesinas como la

hialuronidasa que le permite interactuar con receptores epiteliales como los TLR (Toll Like Receptors) (Hold, 2011), así como al glucocálix ubicado cerca de la zónula ocludens del epitelio gástrico; de esta forma no solo asegura su unión, sino que evita ser desplazado a zonas del tracto digestivo en donde no puede colonizar (Ricaurte Guerrero, 1997; Sierra Arango, 2001). Todo este proceso de colonización puede tardar hasta una semana, ya que entre otras cosas debe activar la ureasa para convertir la urea en amoníaco para evitar la acción del ácido clorhídrico, así como escapar a la respuesta inmune (Sierra Arango, 2001).

Muchas veces este éxito en la unión no solo despierta una respuesta inflamatoria leve o “benigna” y el desarrollo de cambios en el ambiente estomacal que protege al organismo de otros patógenos. También favorece la aparición de diferentes patologías, iniciando con lesiones leves del epitelio como disminución en la producción de moco o atrofia de las microvellosidades, hasta el desarrollo del adenocarcinoma gástrico. Estas últimas ocurren, especialmente ante la presencia de cepas con islas de patogenicidad, así como ante personas que desarrollan una respuesta inmunitaria inadecuada (Ricaurte Guerrero, 1997).

#### **6.4.3.1. GENES ASOCIADOS A LA PATOGENIA**

La capacidad de patogenicidad gastroduodenal por parte del *H. pylori* se debe en gran parte a su capacidad de sintetizar los productos procedentes de los genes *vacA*, *cagA*, *babA* y *sabA* (Tomb, 1997; Antonio-Rincon, 2011; Atherton, 2009; Yamaoka, 2008).

En cuanto al gen *vacA* (Citotoxina Activa Vacuolizante), genera una proteína que induce la formación de vacuolas en el hospedero. Esta proteína presenta variantes en la región de señalización del péptido (s1, s2), así como en la región media (m1, m2) y dependiendo de la combinación de ellos se van a producir efectos tóxicos en mayor o menor medida, así por ejemplo el genotipo con s1/m1 produce más toxina vacuolizante que las cepas con el genotipo s2/m2, explicando hasta cierto punto porque en promedio solo el 50% de las cepas *vacA* positivas desarrollan vacuolas en el epitelio (Antonio-Rincon, 2011; Saxena, 2011; Park, 2001).

Por su parte el gen *cagA* (Citotoxina Asociada al gen A) cuya presencia se relaciona con la expresión del gen *vacA*, se ubica dentro de la isla de patogenicidad *cag*. La función

del gen es modulada mediante fosforilación de receptores tirosin-cinasa, exactamente en las proteínas src, que a su vez afecta la cascada de señalización de la de la PI3K, PLC, NF- $\kappa$ B y Ras (Fuentes Pananá, 2009; Boonyanugomol, 2010; Rosebeck, 2011). En otras palabras, codifica la proteína que altera las vías de señalización intracelular de los linfocitos B, facilitando así la sobreexpresión de genes antiapoptosis *Bcl-2* y *Bcl-x*, favoreciendo la aparición de linfomas tipo MALT (Toller, 2011; Rosebeck, 2011; Munari, 2011). Además de ello, favorece la producción de IL-8, que estimula la respuesta inflamatoria en el epitelio gástrico. Algunos estudio asocian la posible presencia del gen *cagA* con el desarrollo de cáncer de las vías biliares, debido la acción de las células inflamatorias, así como la alteración de la proliferación y la apoptosis de las células biliares (Boonyanugomol, 2010).

También se ha indicado un posible daño del ADN celular, como consecuencia de la acción de los productos del gen *vacA*, y del *cagA*, debido a la alteración de los mecanismos de reparación del ADN del hospedero (Toller, 2011). La presencia de ambos genes y sus productos son factores de riesgo importantes para el desarrollo de patologías gastrointestinales severas (Perri, 2002).

El gen *babA* (Adhesina de Unión al Antígeno del Grupo Sanguíneo) sintetiza una proteína que permite la unión del microorganismo al antígeno de Lewis (Pride, 2001; Yamaoka, 2008). Las cepas de *H. pylori*, pueden tener dos grupos del alelos del gen *bab*, uno denominado *babA* y *sabA*. Solo la proteína de membrana sintetizada por el gen *babA*, tienen la capacidad de unirse al antígeno de Lewis B, permitiendo la colonización de la mucosa gástrica indemne, al facilitar la unión de la bacteria con el epitelio del hospedero (Pride, 2001; Yamaoka, 2008). Además se ha relacionado *babA*, con la presencia de los genes *vacA* y *cagA* (Yamaoka Y., 2010; Yamaoka, 2008).

El gen *sabA* (Adhesina de Unión al Ácido Siálico) tiene función similar al *babA* al sintetizar una proteína de unión, el gen produce una proteína de membrana que le permite a *H. pylori* unirse a el antígeno Siálico de Lewis, el cual está presente en grandes cantidades cuando se desencadena una respuesta inflamatoria (Yamaoka Y, 2008; Mahdavi, 2002). El gen *sabA* y su producto se han encontrado en cepas relacionadas con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia gástrica y adenocarcinoma (Yamaoka Y, 2008).

#### **6.4.3.2. EFECTOS PATOLÓGICOS EN EL ORGANISMO HUMANO**

La bacteria, puede actuar como patógeno, cuando daña directamente el epitelio gástrico o cuando desarrolla procesos de inflamación crónica, que pueden complicarse, es decir hay un daño irreversible del epitelio gástrico. Si bien la infección está presente en más de la mitad de la población, la mayoría de las personas infectadas desarrollan gastritis asintomáticas más que patologías severas (Sierra Arango, 2001). Sin embargo la gastritis asintomática coincide con daños más notorios que pueden favorecer el desarrollo de adenocarcinoma (Fuentes Pananá, 2009; Cho, 2009) y de linfomas tipo MALT (Zalewska-Ziob, 2009). La erradicación exitosa de la bacteria, favorece la desaparición de los procesos inflamatorios, la regeneración y reparación del tejido afectado (McColl, 2010).

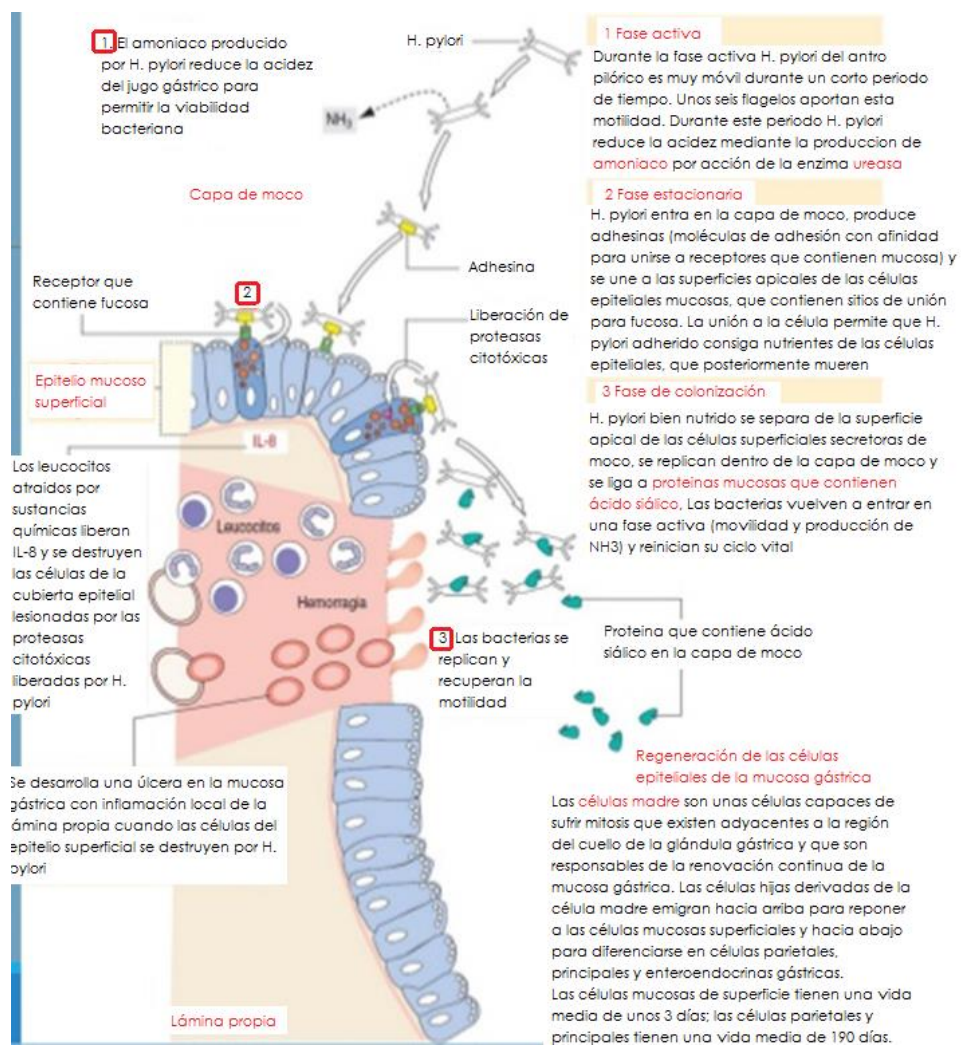
Una vez que se inicia la colonización, se puede observar cambios del epitelio gástrico en cortes microscópicos, los cambios estructurales que sufren se les denomina fositas o foveolas conformadas de epitelio cilíndrico. La bacteria evita el desarrollo de la respuesta inmune gracias a la presencia de lipopolisacaridos similares a los del epitelio, brindándole una especie de camuflaje por su bajo poder antigénico, haciendo referencia concreta al antígeno de Lewis; sin embargo este puede ocasionar respuesta inmune cruzada. También favorece el aumento de la secreción de grelina (Osawa, 2008) y la reducción en la secreción de leptina, lo cual podría suponer una alteración del apetito favoreciendo la obesidad, aunque la relación causa efecto no está bien dilucidada (Atherton, 2009).

Infección e inflamación; la producción de ácido gástrico se ve alterada en grados variables debido a las alteraciones en el equilibrio de la gastrina y somatostatina (Gutierrez C, 2001). Esto se traduce en un aumento del pH hasta valores casi neutros sobre la superficie de los enterocitos, lo que favorece el desarrollo de la respuesta inflamatoria, así como la disminución de la secreción gástrica, que bajo ciertas condiciones es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías (Gutierrez C, 2001). Otro de los factores claves es la presencia de antígenos, como el de Lewis, que pese a permitir ocultarse de la respuesta inmune, puede favorecer una respuesta inmune cruzada, que atacaría no solo al microorganismo, sino a las células epiteliales. Por otro lado, el daño a la mucosa también se puede dar de forma indirecta al combinarse el amonio liberado por la bacteria con el ion cloruro de los polimorfonucleares



formando monocloramina, un compuesto citotóxico para el epitelio que de igual manera favorece la respuesta inflamatoria en el tejido (Ricaurte Guerrero, 1997).

En los primeros estadios, el daño estimula la presencia de polimorfonucleares neutrófilos que desencadenan la reacción inflamatoria aguda, la cual debería contener el daño generado por el microorganismo (Ricaurte Guerrero, 1997). A su vez la interacción del microorganismo con el CD74 de las células epiteliales gástricas, induce la activación del NFkB y con ello la producción de IL-8 (Figura 4) (Fuentes Pananá, 2009; Beswick, 2009), así como la producción de IL-12 la cual favorece la respuesta inmune celular específica. Otra de las características es la presencia de linfocitos T, quienes son reclutados por la interacción entre el ligando CCR6 y la quimioquina CCL20, favoreciendo así la inflamación y la apoptosis celular (Takeshima, 2009).



**FIGURA 4.** *Helicobacter pylori*, la inflamación gástrica crónica y las úlceras.

FUENTE: Sipponen P., *Helicobacter pylori*, chronic gastritis and peptic ulcer. Mater Med Pol. 1992

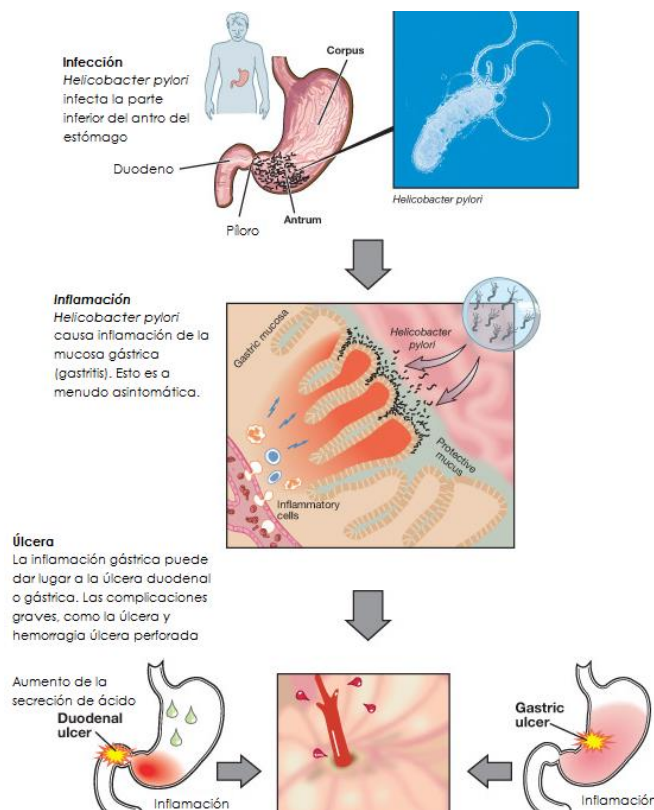
Estos procesos inflamatorios, favorecen la infiltración al epitelio estomacal acompañados de la liberación de citotoxinas, enzimas y radicales libres, causando un daño al ADN de las células de la mucosa, que conllevan hacia la apoptosis celular, ocasionando así daños generalizados en el epitelio gástrico. Otro de los factores que interviene en estos procesos inflamatorios es el Factor de Necrosis Tumoral alfa, FNT- $\alpha$  (Zalewska-Ziob, 2009). Además de estas interleucinas se ha relacionado la activación de genes proinflamatorios, como el COX-2 (Ciclooxigenasa-2), y el iNOS (Oxido nítrico Sintasa Inducible), los cuales se relacionan con la vía de señalización del Ras y el factor de activación AP-1, que involucra a su vez la activación de c-fos y c-jun, dentro de las células epiteliales. La importancia de estos factores no es solo su estimulación por parte del epitelio cuando hay infección por el microorganismo, sino que además su activación se ha relacionado con el desarrollo de adenocarcinomas gástricos (Cho, 2009).

Cuando el microorganismo no es debidamente erradicado o la respuesta aguda llega a ser tan severa que continua lesionando el epitelio, se desencadena un proceso inflamatorio crónico, que conlleva al desarrollo de las patologías relacionadas (Ricaurte Guerrero, 1997). En cuanto a la respuesta inmune, se ha relacionado la ausencia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad HLADQA1 con el desarrollo de atrofia gástrica, así como el desarrollo del adenocarcinoma tipo intestinal (Azuma, 1998), mientras que la presencia del HLA-DQB1 se relaciona con una mayor posibilidad de desarrollar adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (Perri, 2002; Watanabe, 2006).

Gastritis crónica; es una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa estomacal, que puede generar desde la atrofia leve de la mucosa hasta el desarrollo de adenocarcinomas (Kumar, 2005; Rubin, 2006). Las causas de esta atrofia son múltiples, sin embargo la mayoría son debidas a la presencia del *H. pylori*, pues la respuesta inflamatoria desarrollada induce la apoptosis del epitelio gástrico (Beswick, 2009; Takeshima, 2009). Otras causas de gastritis crónica son las de origen inmunológico como anticuerpos citotóxicos o contra el factor intrínseco, el consumo recurrente de alcohol, el tabaquismo, y la radiación (Kumar, 2005; Rubin, 2006). Si bien la gastritis crónica se caracteriza por estar eritematosa con pliegues aumentados de tamaño en un comienzo, estos suelen volverse aplanados y finos por el mencionado daño epitelial. Morfológicamente la gastritis crónica, tiene varios patrones de

presentación sin embargo con la infección por la bacteria la tendencia es encontrar la lesión limitada a la zona del antro (Kumar, 2005; Rubin, 2006).

Úlcera péptica; en términos generales, la úlcera se considera una pérdida de la continuidad del epitelio (Figura 5). La ubicación más frecuente es la primera porción del duodeno. Esta lesión se ha asociado a diferentes patologías, pero la principal relación es con la presencia del bacilo bien sea en el antro o en el duodeno. La presencia en el antro favorece el aumento en la cantidad de ácido que llega al duodeno lo cual daña el epitelio (McColl, 2010), mientras que la presencia en el duodeno, favorece la formación de úlceras mediante la acción de las células dendríticas y la subsiguiente activación de la respuesta inmune (Andres, 2010). La severidad de la úlcera va a depender en gran medida de la presencia de cepas *cagA* positivas así como con la carga bacteriana, y la edad del paciente, presentando un curso clínico diferente en adultos mayores, caracterizado por epigastralgia así como complicaciones de las úlceras (Ahmad, 2009). Esta es una de las patologías que se ve favorecida con la erradicación del microorganismo, entre otras cosas por la disminución de la respuesta inmune inflamatoria y el daño generado al epitelio gástrico (Zhernakova, 2009).



**FIGURA 5.** Mecanismo de producción de la lesión por la bacteria *H. pylori*.

FUENTE: Comité del Premio Alfred Nobel para Fisiología o Medicina, Estocolmo, Suecia.

[http://nobelprize.org/nobel\\_prize/medicine/laureles/2005/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prize/medicine/laureles/2005/press.html)

Cáncer gástrico; se considera que las personas infectadas con *H. pylori* presentan un riesgo seis veces mayor de desarrollar cáncer gástrico, debido a que el microorganismo tiene capacidad de causar dicha patología oncológica, por lo cual ha sido clasificados como un carcinógeno tipo 1 (Romo González, 2010; McColl, 2010). No es solo la infección por cepas del microorganismo *vacA* y *cagA*, sino que además la susceptibilidad del huésped es lo que determina el desarrollo de cáncer por lo que no todos los infectados desarrollan tal patología (Yin, 2009).

El Tejido Linfático Asociado a Mucosas o MALT, es un cúmulo no encapsulado pero delimitado de linfocitos, sobretodo linfocitos B. Adicionalmente estas agrupaciones se localizan en la mucosa del sistema digestivo, aunque también se hallan presentes en el sistema respiratorio y urinario (Gartner, 2001). Cuando está presente la infección por el *H. pylori*, se inicia la activación de la respuesta inmune secundaria a diferentes antígenos (Lin, 2010), por lo que dentro de los factores de riesgo relacionados tanto con el adenocarcinoma como el linfoma tipo MALT, está la presencia de cepas positivas para el gen *cagA*. Los estudios han demostrado que este gen interactúa con los linfocitos B, uniéndose con receptores de tirosin-kinasa estimulando su activación (Lin, 2010; Zalewska-Ziob, 2009), a la vez que frena la apoptosis y favorece la conversión linfocítica así como el desarrollo de linfoma tipo MALT, el cual puede variar su grado de malignidad (Zalewska-Ziob, 2009). El tratamiento de la infección de la bacteria, ha demostrado ser efectivo para la regresión de linfoma tipo MALT en estadios iniciales (Lin, 2010).

Deficiencia de hierro; si bien no hay estudios que confirmen totalmente esta hipótesis, se cree que el *H. pylori* puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de anemia ferropénica (McColl, 2010). Las manifestaciones clínicas pueden ir desde cansancio generalizado, piel pálida, hasta la pérdida crítica de peso. Una de las principales hipótesis que justifican esta relación es la pérdida de sangre, secundaria a úlceras duodenales que puedan o no sangrar; otra teoría es la captación del hierro por parte de la bacteria, ya que este es un micronutriente esencial; sin embargo esto parece estar más relacionado con cepas que tienen una sobreexpresión del producto del gen *pfr*, es decir, tienen una alta producción de ferritina con lo cual captaría y almacenaría más hierro para su supervivencia (Choe, 2001; Waidner, 2002).

También han relacionado el producto del gen *feoB* que se ha identificado como un transportador de hierro en estado ferroso (Jeon, 2004), pese a que en las cepas estudiadas existe un alto polimorfismo de los genes implicados estudiados (*pfr* y *feoB*), la población ha sido muy poca y muy heterogénea, así como también que la anemia por deficiencia de hierro puede ser multifactorial (Choe, 2001; Jeon, 2004; Fernandez-Banares, 2009).

## 6.5. EPIDEMIOLOGÍA

*H. pylori* es una bacteria de distribución mundial, se estima que más de dos tercios de la población mundial se encuentra infectada por esta bacteria (Ramirez RA, 2003).

Desde el punto de vista epidemiológico se ha observado una mayor prevalencia de infección en individuos de edad avanzada, pudiendo señalarse que en mayores de 60 años aproximadamente el 50% presenta colonización. Sin embargo la prevalencia se hallaría condicionada también por otros factores además de la edad, así el factor socioeconómico, como demuestra el hecho de una mayor prevalencia y una más temprana colonización por el germen en países no desarrollados con relación a aquellos industrializados. (Ramirez RA, 2003).

Son muchos los factores que intervienen en la prevalencia general de la infección, como la falta de una adecuada higiene, agua potable segura, higiene básica, dietas pobres y superpoblación. La prevalencia de *H. pylori* puede variar significativamente entre países y dentro de un país. En general, las tasas de seropositividad de *H. pylori* aumentan progresivamente con la edad. En los países en desarrollo, la infección por esta bacteria es marcadamente más prevalente en edades más jóvenes que en los países desarrollados (R.H. Hunt, 2010).

El riesgo de desarrollar enfermedad ulcero-péptica en personas infectadas por *H. pylori* se estima mayor a 10%. La prevalencia de la infección es alta en países en vía de desarrollo si se compara con los países desarrollados. Entre adultos jóvenes en los países en vía de desarrollo está por encima de 80% (Graham DY, 1999).

La incidencia de infección aumenta con la posibilidad a exposición y, por lo tanto, con la edad. En México, Torres y cols., encontraron una seroprevalencia de 70% para *H.*

*pylori* en 11605 muestras sanguíneas de personas de diversas edades (1 a 90 años de edad). En esta misma serie, a la edad de un año, 20% de niños fueron positivos (Belkind J., 2001).

En Bolivia se reportó una prevalencia del 80% en zonas rurales del país, en una población de niños y adultos, en el cual evaluaron la recurrencia de la infección por *H. pylori*, concluyendo que los niños menores de 10 años tenían altas tasas de recurrencia de *H. pylori* después de un programa de tratamiento (Sivapalasingam S., 2014).

En un estudio se encontró una prevalencia de infección por *H. pylori* del 62.9%, predominante en el sexo masculino (65%) en relación al sexo femenino (62.7%) y en el grupo etario de 19 a 24 años (67.9%). En La Paz-Bolivia, se encontró una prevalencia del 62,9% (Ruiz R, 2013).

Se reportó una incidencia de infección por *H. pylori* del 56% en universitarios de la carrera de medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UTO (Universidad Técnica de Oruro) en Oruro, en la gestión 2006 (Corrales HJ., 2006).

El cáncer gástrico es la cuarta neoplasia maligna más común en el mundo y la segunda causa de muerte por cáncer anualmente, totalizando más de un millón de defunciones por año, siendo el adenocarcinoma del estómago el tumor más frecuente (95%) (Talley NJ., 2008).

La incidencia del cáncer gástrico varía entre países y también varía en diferentes regiones de un país. Se considera como población de riesgo a aquella población en la que la incidencia de cáncer gástrico sea mayor a 20/100 mil habitantes (Talley NJ., 2008).

Se considera que la presencia de esta bacteria es un factor necesario en la cadena de la carcinogénesis en la mayoría de pacientes que desarrollan adenocarcinoma gástrico intestinal o diferenciado (Talley NJ., 2008). La revisión sistemática de estudios de casos y controles revela que aproximadamente 65 a 80% de casos de adenocarcinoma gástrico no cardial (del estómago distal) son atribuidos a la infección por *H. pylori* (Talley NJ., 2008).

## **6.6. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO**

Para el diagnóstico de la infección hay varios métodos que se pueden emplear a fin de descubrir la presencia de *H. pylori*, estos métodos están continuamente mejorado y se van ampliado con el tiempo.

La infección por *H. pylori* puede ser diagnosticada por métodos que requieren de la endoscopia para la toma de muestra y métodos que no requieren de la endoscopia (Dzierzanowska-Fangrat K, 2006).

Aunque varias pruebas de diagnóstico están disponibles para la detección de *H. pylori*, todos ellos tienen tanto ventajas como desventajas. Para definir el valor o la utilidad de una prueba diagnóstica, cada prueba tiene que ser comparado con un estándar de oro (Guarner J, 2010).

### **6.6.1. MÉTODOS QUE REQUIEREN DE LA ENDOSCOPIA PARA LA TOMA DE MUESTRA**

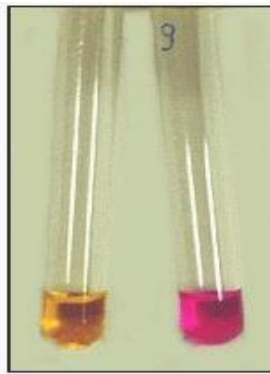
Entre estos métodos podemos mencionar: prueba rápida de la ureasa (PRU), examen histológico (EH), cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos requieren endoscopia y muestras de biopsia de mucosa gástrica.

#### **6.6.1.1. PRUEBA RÁPIDA DE LA UREASA (PRU)**

*H. pylori* es conocida por la producción de abundante ureasa. Enzima ureasa hidroliza la urea para liberar CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub>. La detección de la producción de ureasa se ha utilizado como un marcador sustituto para la detección de la bacteria en biopsias antrales (Kumar S., 2014).

La PRU es una técnica cualitativa que determina la actividad de la enzima ureasa en una pequeña muestra de mucosa gástrica, dicha prueba es universalmente empleada para detectar la presencia de este microorganismo. Se realiza colocando la pieza de biopsia en un tubo con urea que además contiene un indicador de cambio de pH. Si la muestra presenta actividad ureásica, se hidroliza la urea y se forman iones de amonio, los cuales aumentan el pH de la solución, produciendo el cambio de color (Figura 6). Entre los primeros juegos comerciales que se desarrollaron basados en esta técnica se encuentran CLO test y PyloriTek,

con los que se han obtenido muy buenos resultados en el diagnóstico de la infección (Megraud F L. P., 2007).



**FIGURA 6.** Test rápido de la ureasa: amarillo - ureasa negativa; rosa - ureasa positiva. Reacción de la urea.  
FUENTE: Paredes W. Características del origen de *Helicobacter pylori*  
<http://www.monografias.com/trabajos60/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori2.shtml>

En la actualidad existen otros juegos comerciales como GUT test y el MIU test (motility indole urease test). Para el GUT test se ha reportado 100 % de especificidad y una sensibilidad del 95,3 % a los 60 min de incubación de la muestra (Van KN, 2006). Por otra parte, con el juego comercial MIU se reportó mayor sensibilidad que con el juego CLO, cuando se evaluó una sola muestra gástrica (Kumala W., 2006). Sin embargo, recientemente se demostró que al aumentar el número de muestras gástricas a 4, el juego CLO test incrementa notablemente su sensibilidad (Siddique I, 2008).

Para la prueba comercial “Pronto Dry” (Medical Instruments Corporation), el cual necesita dos o más biopsias para la identificación de *H. pylori*, se reportó una sensibilidad del 83% y una especificidad del 56,14% (Bilbao P. E., 2006).

La especificidad de esta prueba de la ureasa es alta por las siguientes razones fundamentales: el número de bacterias diferentes de *H. pylori* en la cavidad gástrica es muy escaso y los análisis se realizan a temperatura ambiente, lo cual limita la posible proliferación de otras bacterias durante la realización de la prueba (Laine L, 1997). Por su sencillez, rapidez y bajo costo, se considera como una técnica de elección para el diagnóstico inicial de la



infección por *H. pylori* en aquellos pacientes que se someten a endoscopia (Megraud F., 2005). Sin embargo, la sensibilidad de la prueba se ve afectada en los pacientes que han recibido tratamiento con antibióticos (tratamiento no erradicador) y en los pacientes tratados con fármacos inhibidores de la bomba de protones (Habibullah CM, 2005). Esta prueba ha sido muy empleada para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en nuestra red asistencial de salud y en los estudios realizados nacionalmente sobre la infección con esta bacteria (Brizuela RA, 1999; Valmaseda T, 2002).

#### **6.6.1.2. HISTOLOGÍA**

La observación de microorganismos de forma espiral en cortes histológicos con diferentes tinciones es un método sencillo para diagnosticar la infección por *H. pylori*, así como para determinar la densidad de la colonización. Entre los métodos de tinción utilizados, unos son simples y fáciles de realizar y otros son más complejos.

En la actualidad se emplean las tinciones con hematoxilina-eosina (Fawcett PT, 2004) que ayuda en la evaluación de la gravedad de la inflamación a lo largo con la detección de las bacterias; la de Warthin-Starry con nitrato de plata (Raica M, 1996) y la tinción con azul de metileno (Misra V, 2007), aunque esta última ha sido sustituida por la tinción con Giemsa (Trakarnvanich V., 2007), probablemente una de las más populares, por ser fácil de realizar, económica y con buenos resultados en el diagnóstico (Kolts BE, 1993).

El diagnóstico más temprano por métodos histológicos toma 2-3 días y la tasa de detección sin duda varía con la experiencia de los examinadores. Este método es importante fundamentalmente para determinar el nivel de daño hístico. Estos estudios brindan información sobre la presencia de polimorfonucleares y diagnostican la gravedad de la gastritis, metaplasia y/o de atrofia en el tejido analizado (Faigel DO, 1996).

Existen algunos factores específicos que disminuyen su sensibilidad, como son: la baja densidad de microorganismos y la desigual distribución de la bacteria en el estómago (Fawcett PT, 2004), esto último afecta por igual a todos los métodos directos de detección y, por tanto, se recomienda tomar varias biopsias para aumentar la sensibilidad de la técnica en cuestión que se esté empleando.

Aunque se cree que presenta una alta especificidad debido a peculiar morfología de *H. pylori* y su estrecha relación con la mucosa gástrica, esta puede bajar debido a la presencia de otras especies de bacterias *H. heilmanii*, *H. bizzozeroni*, *Pseudomonas fluorescencia* que tiene una morfología similar (Patel SK, 2013).

### **6.6.1.3. CULTIVO**

*H. pylori* puede ser aislado de manera rutinaria mediante cultivo a partir de muestras de biopsias gástricas humanas. Se han utilizado varios medios de cultivo, entre los que se encuentran diferentes formulaciones que contienen agar, como caldo cerebro-corazón, Columbia, Brucella, Wilkins-Chalgren y Mueller-Hinton. Todos estos medios son suplementados con 5-10 % de sangre de caballo, carnero o humana u otros aditivos, como la hemina, isovitalex, ciclodextrina y almidón; además de una combinación de al menos 4 antibióticos selectivos (Mandado S, 2003).

Por lo general crecen mejor en medios húmedos recién preparados incubados en un ambiente cálido (37 ° C) con un 5%-10% de CO<sub>2</sub>, 80% -90% de N<sub>2</sub> y el 5% -10% de O<sub>2</sub>. El aislamiento primario del organismo a partir de muestras de biopsia gástrica requiere 5-7 días en una atmósfera microaeróbica (Wang Y., 2015 ).

*H. pylori* se identifica sobre la base de su morfología colonial (colonias pequeñas, grisáceas y brillantes de aproximadamente 1 mm de diámetro), la tinción de Gram (organismos espiralados o esféricos, gramnegativos), y su positividad en las pruebas de actividad de la ureasa, la catalasa y la oxidasa (Alarcón T., 1994).

El cultivo microbiológico es necesario para la identificación definitiva del microorganismo y para determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos. (Testerman TL, 2006) Además, esta técnica es la única que permite obtener y conservar cepas para la purificación de antígenos específicos y para realizar estudios posteriores de genómica y proteómica. La principal desventaja de esta técnica en el diagnóstico es su baja sensibilidad en condiciones no óptimas, por los exigentes requerimientos de cultivo de *H. pylori* (Alarcón T., 1994; Chomvarin C, 2006). Lo anterior, en muchos casos, está influenciado por la

experiencia del personal y la necesidad de tomar más de una muestra, esto debido a que esta bacteria tiene una distribución irregular en el estómago (Wang Y., 2015 ).

El cultivo bacteriológico es un procedimiento tedioso, lento, e innecesaria para el diagnóstico de rutina de infección por *H. pylori* porque otras pruebas no invasivas evidencian la presencia del microorganismo en la mayoría de los pacientes (Glupczynski Y., 1998).

### **6.6.2. MÉTODOS QUE NO REQUIEREN DE LA ENDOSCOPIA PARA LA TOMA DE MUESTRA**

Estos métodos incluyen la prueba de aliento con urea, la serología y prueba de antígeno de heces. La técnica PCR está dentro de las pruebas que requieren de la endoscopia, cuando se trabaja con biopsias; también está entre las pruebas que no requieren de la endoscopia, cuando se trabaja con otro tipo de muestras.

#### **6.6.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Mediante la técnica de PCR es posible detectar el ácido desoxiribonucleico (ADN) de *H. pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas como también en distintas muestras clínicas, como ser; heces, saliva, entre otros (Godon J., 1997).

Los genes conservados utilizados para la detección de *H. pylori* son: *ureA* que codifica para la subunidad A de la enzima ureasa, el gen *glmM* que codifica para una fosfoglucosamina mutasa (Fawcett PT, 2004), también conocido como *ureC*, o el 16S rRNA, 23S rRNA y el gen *Hsp60* (Clayton C, 1991; Rimbara E, 2013).

Desde la introducción de la prueba de la cuerda para la recolección del jugo gástrico, el gen *ureA* ha sido blanco en este espécimen fácilmente disponible con una buena sensibilidad y especificidad (Córdova M., 2011 ).

Los genes de virulencia definen el grado de patogenicidad de la bacteria de acuerdo al tipo de cepa presente, el gen A asociado a la citotoxina (*cagA*) es el más estudiado como factor de virulencia de *H. pylori* (Rodicio Mdel R, 2004).

La tecnología de PCR también se puede utilizar para apuntar a genes patogénicos de *H. pylori*. Hay dos segmentos principales implicados en la patogénesis: *cagPAI* y genes *vacA* polimórfica, aparte de otros genes de virulencia implicados en la adhesión (*babA2*, *Saba*) o en la patogénesis (*oipA*, *dupA*, *iceA*) (Group., 2002).

Hay varios informes que indican que las cepas que poseen *cagPAI* causan úlcera péptica más grave y enfermedades extra digestivas (Kumar S., 2014 ).

Su principal inconveniente lo constituye la presencia en la muestra de restos de tejido gástrico, lípidos u otros componentes que inhiben la reacción de la PCR y que por tanto favorecen la obtención de falsos negativos (Díaz L., 2009).

PCR también se utiliza para la cuantificación del ADN genómico de *H. pylori*. PCR en tiempo real se utiliza convencionalmente para cuantificar el ADN de *H. pylori* en muestras de biopsia. Pero la PCR en tiempo real puede no ser tan sensible como la PCR anidada y como usualmente se basa en los kits comerciales, puede ser más cara, especialmente cuando se buscan dos genes (Kumar S., 2014 ).

#### **6.6.2.2. PRUEBA DEL ALIENTO DE UREA**

El uso de la prueba de aliento de urea es a menudo considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de infección por *H. pylori*. La prueba de aliento de urea produce consistentemente mejores resultados en comparación con muchas de las otras pruebas disponibles (Parente F, 2001).

La prueba del aliento se basa también en la actividad de la ureasa de *H. pylori*, pero en este caso con urea marcada. Como resultado de la ingestión de una suspensión de urea marcada con  $C^{13}$  o  $C^{14}$ , ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento (Logan R., 1995). La cantidad de  $CO_2$  marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *H. pylori* (Schuman R, 1995).

UBT se utiliza para evaluar erradicación después de dar el tratamiento contra esta bacteria. Los resultados falsos positivos debido a la presencia de otros microorganismos productores de ureasa a veces son esperados ya que se ha establecido que *H. pylori* no es la única bacteria colonizadora del estómago. Sin embargo, los medicamentos inhibidores de la bomba de protones (IBP y antibióticos) pueden producir resultados falsos negativos. Una ventaja es que UBT podría también ser utilizado en pacientes pediátricos (Koletzko S., 2005).

En contraste con otros métodos indirectos, como la serología, cuando su resultado es positivo indica infección actual. Esta técnica es costosa y en su realización existen aspectos que pueden afectar el resultado, como son: las variaciones en cuanto al punto de corte utilizado para la positividad, la ingestión previa de algunos alimentos y el intervalo de tiempo para la toma de la muestra (Gatta L, 2003).

### **6.6.2.3. SEROLOGÍA**

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos contra antígenos específicos de este microorganismo (Sabbi T, 2005).

Las técnicas serológicas son generalmente simples, reproducibles y económicas, pero además, nos permiten realizar estudios epidemiológicos (esto debido a la presencia de los anticuerpos de memoria) y determinar la prevalencia y la edad de adquisición de la infección por *H. pylori* en diferentes poblaciones (Megraud F L. P., 2007). La detección de anticuerpos se puede hacer en muestras de suero, jugo gástrico, orina, saliva, u otros fluidos (Paul Harris D., 2005).

Las personas infectadas presentan altos niveles de IgG e IgA en la sangre, así como un aumento en la secreción de IgA e IgM en el estómago. Niveles de IgM pueden ser detectados al poco tiempo después de ocurrida la infección, sin embargo, los niveles de IgA e IgG indican el carácter crónico de la misma (Kindermann A, 2001).

Las técnicas más empleadas para la detección de anticuerpos son: ensayo inmunoenzimático de enzima ligada (ELISA), aglutinación en látex, inmunoensayos sobre

papel de nitrocelulosa (immunoblotting) e inmunocromatografías (ICM), entre otras (Gatta L, 2003).

Es bastante claro que la selección de las diferentes cepas de *H. pylori* es un paso crítico en el momento de obtener una buena fuente de antígeno, y que por lo tanto la utilidad de cualquier test serológico será dependiente de la preparación antigénica utilizada (Paul Harris D., 2005).

En la actualidad, las técnicas de mayor utilización son las de ELISA por ser más sencillas y rápidas de realizar y por poseer aceptables niveles de sensibilidad y especificidad. Estas técnicas han posibilitado la realización de estudios epidemiológicos en amplios grupos de población y permiten obtener resultados cuantitativos y establecer distintos umbrales de positividad para diferentes grupos de población (Mattana C., 2004).

Los inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting), como el Western Blot, son muy útiles para evaluar la respuesta inmune contra antígenos específicos, como VacA y CagA (Park CY, 2002), lo que permite establecer relaciones entre el desarrollo de patologías más severas y la presencia de determinados antígenos de *H. pylori* (Vilaichone R.K., 2003).

#### **6.6.2.4. Detección del antígeno**

El antígeno de *H. pylori* en muestras de heces se ha detectado con éxito por primera vez en 1997. La detección de antígenos mediante técnicas inmunoenzimáticas, se ha empleado para el diagnóstico inicial de la bacteria y para confirmar la erradicación de la misma después del tratamiento (Kumar S., 2014 ).

Entre sus ventajas cabe destacar que es más barato y también supone un menor consumo de tiempo que realizar el test del aliento. En pediatría constituye una magnífica alternativa como método no invasivo al simplificar la preparación de la prueba diagnóstica. En menores de 6 años el test del aliento puede ser de difícil realización y los resultados con frecuencia no son fiables (Marin J., 2013).

El primero de los juegos comerciales desarrollados fue el Premier Platinum HpSATM (Meridian Diagnostics), que constaba de una mezcla de anticuerpos policlonales para el

reconocimiento de los antígenos y aunque su sensibilidad era buena, la especificidad no era suficiente. (Vaira D, 1999) Estos juegos han sido sustituidos por otros que contienen anticuerpos monoclonales, los cuales muestran una muy buena especificidad (Gisbert JP d. l., 2006).

Recientemente, un juego inmunocromatográfico que detecta a la enzima catalasa, en su estado nativo en heces fecales, fue desarrollado y empleado en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en niños asintomáticos y personas de edad avanzada. Aunque con este juego se obtuvieron muy buenos resultados, es necesario realizar otros estudios para corroborar su eficacia en el diagnóstico (Cardenas VM, 2008).

Los juegos comerciales basados en la detección de antígenos en heces fecales se ven afectados por varios factores, entre los que se destacan: la excreción de los antígenos muy diluidos o degradados, cuando hay problemas de diarreas u obstrucciones intestinales, respectivamente; lo que compromete la sensibilidad de estos juegos (Megraud F L. P., 2007).

### **6.6.3. DETECCIÓN DE HELICOBACTER *PYLORI* EN CAVIDAD ORAL**

Varios estudios han evaluado la saliva y la placa dental como posibles muestras no invasivas para el diagnóstico de *H. pylori* empleando diversas técnicas. Juegos comerciales basados en la detección de anticuerpos anti-*H. pylori* en saliva se han empleado, pero los valores de sensibilidad y especificidad han sido inferiores al 90 % (Ballam L., 2000).

Hay una gran variabilidad en las tasas de frecuencia de *H. pylori* en cavidad oral descritas en la literatura. Estas diferencias podrían explicarse por variaciones en los datos demográficos de la muestra, el uso de diferentes procedimientos de muestreo y métodos de detección, estados de salud oral de los pacientes, las diferencias en los estados de *H. pylori* infección, el tipo y número de muestras clínicas utilizadas, y diferentes complejidades entre la microbiota oral de las muestras utilizadas en los estudios (Marques S., 2016).

Por otra parte, el cultivo de la bacteria a partir de la cavidad oral pocas veces ha sido positivo. (Parsonnet J, 1999) Sin embargo, con la PCR se han reportado buenos resultados cuando se han empleado la saliva y la placa dental como muestras (Kignel S, 2005). No obstante, dado el número de especies bacterianas que habitan en la cavidad oral, muchas de

ellas no identificadas aún, no se consideran confiables los resultados que se obtengan al emplear un solo juego de cebadores en el diagnóstico por la PCR (Megraud F L. P., 2007).

## **6.7. TRATAMIENTO**

Como en todos los procesos infecciosos, la meta del tratamiento es la eliminación de la bacteria a través de la antibioticoterapia. Sin embargo, debido a mutaciones genéticas y otras modificaciones en la estructura bacteriana la resistencia a los antibióticos es considerada actualmente como la principal causa de fracaso terapéutico (Megraud F .. , 1998).

En poblaciones con resistencia a claritromicina menor al 20% se recomienda el uso de la Triple Terapia Estándar (TTE) como tratamiento de primera línea, consistente en un inhibidor de la bomba de protones (IBP) + dos antibióticos (claritromicina más amoxicilina o metronidazol). Mientras que si la resistencia a claritromicina es mayor puede iniciarse el tratamiento con terapia cuádruple (con bismuto), secuencial, concomitante o una terapia híbrida (Malfertheiner P, 2012).

En la enfermedad ulcerosa; entre los agentes farmacológicos que disponemos actualmente como son los estimulantes de los factores defensivos de la mucosa (sucralfato, prostaglandinas, carbenoxolona, subnitrito de bismuto), los neutralizantes de la secreción ácida (antiácidos), y los inhibidores de la secreción gástrica ácida que incluyen los anti-H<sub>2</sub> (cimetidina, ranitidina y famotidina), anticolinérgicos y los inhibidores de la bomba de protones (omeprazol) no existe ninguno que detenga la hemorragia activa o evite el resangrado (Alba RS., 2006).

El objetivo del tratamiento médico, en la enfermedad ulcerosa, será promover la cicatrización de la úlcera para prevenir la recurrencia de la hemorragia. Así, la ranitidina puede prevenir la úlcera duodenal en pacientes tomadores de AINES, pero es ineficaz en la prevención de la úlcera gástrica. Por el contrario, la famotidina protege la mucosa gástrica contra tratamientos cortos de aspirina o naproxeno. Si se demuestra que existe infección por *H. pylori* estará indicada su erradicación para evitar recurrencias (Alba RS., 2006).



El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* es el siguiente (Samitier RS, 2000; Arozamena C J., 2002):

- Omeprazol 40 mg diarios + Claritromicina 500 mg tres veces por día por 2 semanas, luego Omeprazol 20 mg diarios por 2 semanas.
- Omeprazol 40 mg diarios + Claritromicina 500 mg tres veces por día por 2 semanas + amoxicilina 1 g 2 veces por día por 10 días.
- Lansoprazol 30 mg 2 veces por día + Claritromicina 500 mg 2 veces por día + amoxicilina 1 g 2 veces por día por 10 días.
- Lansoprazol 30 mg 2 veces por día + amoxicilina 1 g 3 veces por día por 2 semanas \*
- Esomeprazol 40 mg diarios + Claritromicina 500 mg 2 veces por día + amoxicilina 1 g 2 veces por día por 10 días.
- Ranitidina Citrato de Bismuto 400 mg 2 veces por día + Claritromicina 500 mg 3 veces por día por 2 semanas, luego Ranitidina Citrato de Bismuto 400 mg 2 veces por día por 2 semanas.
- Ranitidina Citrato de Bismuto 400 mg 2 veces por día + Claritromicina 500 mg 2 veces por día por 2 semanas, luego Ranitidina Citrato de Bismuto 400 mg 2 veces por día por 2 semanas.
- Subsalicilato de Bismuto 525 mg 4 veces por día + Metronidazol 250 mg 4 veces por día + Tetraciclina 500 mg 4 veces por día \*\* por 2 semanas + Antagonistas H2 por 4 semanas.

\* Terapia para pacientes alérgicos o con resistencia a la Claritromicina

\*\* Aunque no está aprobado por la FDA, la Amoxicilina ha sido reemplazada por la Tetraciclina, en pacientes en quienes no estaba recomendada (Division of Bacterial and Mycotic Diseases. , 2006).

La terapia erradicadora debería ser considerada en (Alba RS., 2006):

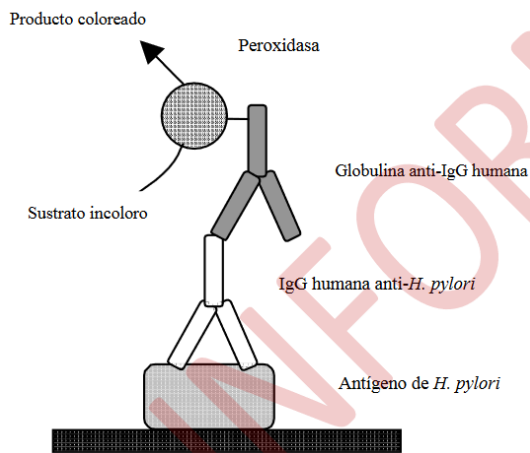
- Pacientes con dispepsia recurrente.
- Pacientes con diagnóstico reciente de úlcera péptica.

- Pacientes con diagnóstico previo de enfermedad ulcerosa cuya sintomatología se ha reactivado o que requieran terapia continua de supresión de ácido (Alba RS., 2006).

## 7. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS

### 7.1. ENSAYO INMUNOENZIMATICO PARA LA DETERMINACIÓN DE IgG, IgM ANTI *HELICOBACTER PYLORI*

Los reactivos esenciales requeridos para el análisis secuencial del método ELISA incluyen el antígeno inmovilizado, el anticuerpo circulante y el anticuerpo de enzima-ligada especies-específicos. (Figura 7)



**FIGURA 7.** Principio del método ELISA en la detección de la IgG anti *H. pylori*

FUENTE: Chen, T. S., F. Y. Li, F. Y. Chang, and S. D. Lee. 2002. Immunoglobulin G antibody against *Helicobacter pylori*: clinical implications of levels found in se rum. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1044-8.

En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo de la superficie del pozo en el microplato a través de la interacción de la streptavidina cubierta sobre el pozo y el antígeno de *H. pylori* biotinilado exógeno es agregado. Una vez mezclado el antígeno biotinilado y un suero que contiene el anticuerpo, resulta una reacción entre el antígeno y el anticuerpo para formar un complejo inmune (Strickland, 1973).

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidina y el antígeno biotinilado. Después del periodo de incubación, el pozo se lava para separar los componentes no unidos por la aspiración o la decantación. La

enzima ligada al anticuerpo específico de la especie-(anti-IgG o IgM) se agrega entonces al pozo. Este conjugado se une al complejo inmune que se formó (Strickland, 1973).

La enzima conjugada de anti-IgG o IgM humana que se une al complejo inmune en una segunda incubación es separada del material sin reacción por un paso de lavado. La actividad de la enzima en esta reacción es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos en el espécimen. Al utilizar diferentes sueros de referencia de actividad de anticuerpos conocida, puede ser generada una curva de referencia en la cual la actividad del anticuerpo para una muestra con concentración desconocida se puede comprobar (Strickland, 1973).

## **7.2. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO DE *HELICOBACTER PYLORI* EN HECES**

Las muestras para la determinación del antígeno de *H. pylori*, provienen de las muestras de heces de los pacientes. Las microplacas están recubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón, purificados por cromatografía de afinidad y dirigidos contra los antígenos principales de *H. pylori*. Durante la primera incubación, la fase sólida se trata con la muestra, extraída previamente de las heces fecales, y simultáneamente con una mezcla de anticuerpos monoclonales de *H. pylori* conjugados con peroxidasa (HPR). Después del lavado quedan eliminados los restos de los componentes de la muestra, en la segunda incubación, la enzima combinada con la fase sólida genera una señal óptica proporcional a la cantidad del antígeno de *H. pylori* presente en la muestra (Braden B., 2001).

## **7.3. WESTERN BLOT PARA LA DETERMINACIÓN DE IgG ANTI-*HELICOBACTER PYLORI***

En este método se utilizan antígenos recombinantes de *H. pylori* altamente purificados, los cuales se fijan en tiras de membrana de nitrocelulosa. Las tiras se incuban con el suero o plasma diluido, y los anticuerpos específicos se unen a los antígenos del patógeno en estudio. Los anticuerpos no ligados se extraen mediante lavados. En un segundo paso, las tiras se incuban con anticuerpos anti-inmunoglobulina humana (IgG e IgA), que están acoplados a peroxidasa de rábano picante. Los anticuerpos conjugados no ligados se extraen mediante lavados. Los anticuerpos unidos específicamente se detectaron con una

reacción de tinción catalizada por la peroxidasa. Si una reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar, una banda oscura aparecerá en la tira en el punto correspondiente (Yunoki N., 2000).

Hay bandas de control en el extremo superior de las tiras de prueba; esta banda de control de reacción bajo el número de la tira, que debe mostrar una reacción para cada muestra de suero / plasma. Las bandas de control del conjugado (IgG, IgA) se utilizan para comprobar la clase de anticuerpos detectados. Si por ejemplo, se utiliza la tira de ensayo para la detección de anticuerpos IgG, el conjugado mostrará una banda clara (Yunoki N., 2000).

Control Cut-off; la intensidad de esta banda permite la evaluación de la reactividad de las bandas de antígeno individuales (Yunoki N., 2000).

#### **7.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica biotecnológica que tiene como fin el amplificar o reproducir in vitro un número de copias de una región específica de ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación.

La PCR es una reacción llevada completamente in vitro y requiere para su desarrollo de los elementos siguientes: 2 oligonucleótidos sintéticos o cebadores (primers), que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, lo que proporciona la alta especificidad; una enzima termoestable, Taq polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* y 4 desoxyribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Este procedimiento permite obtener una duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico; es decir, cada ciclo consta de un proceso de desnaturalización (95 °C) que permite la apertura de las dobles cadenas; luego viene seguido por un proceso de anillamiento (40-65 °C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o cebadores que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia específica del ADN, formando una unión ayudada por enlaces iónicos (primers y hebra de ADN); en donde la enzima Taq polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72 °C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniendo

por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de ADN de interés. (Mullis K., 1987).

La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica (Kumar S., 2014 ).

## **8. GOLD ESTÁNDAR (PATRON DE ORO)**

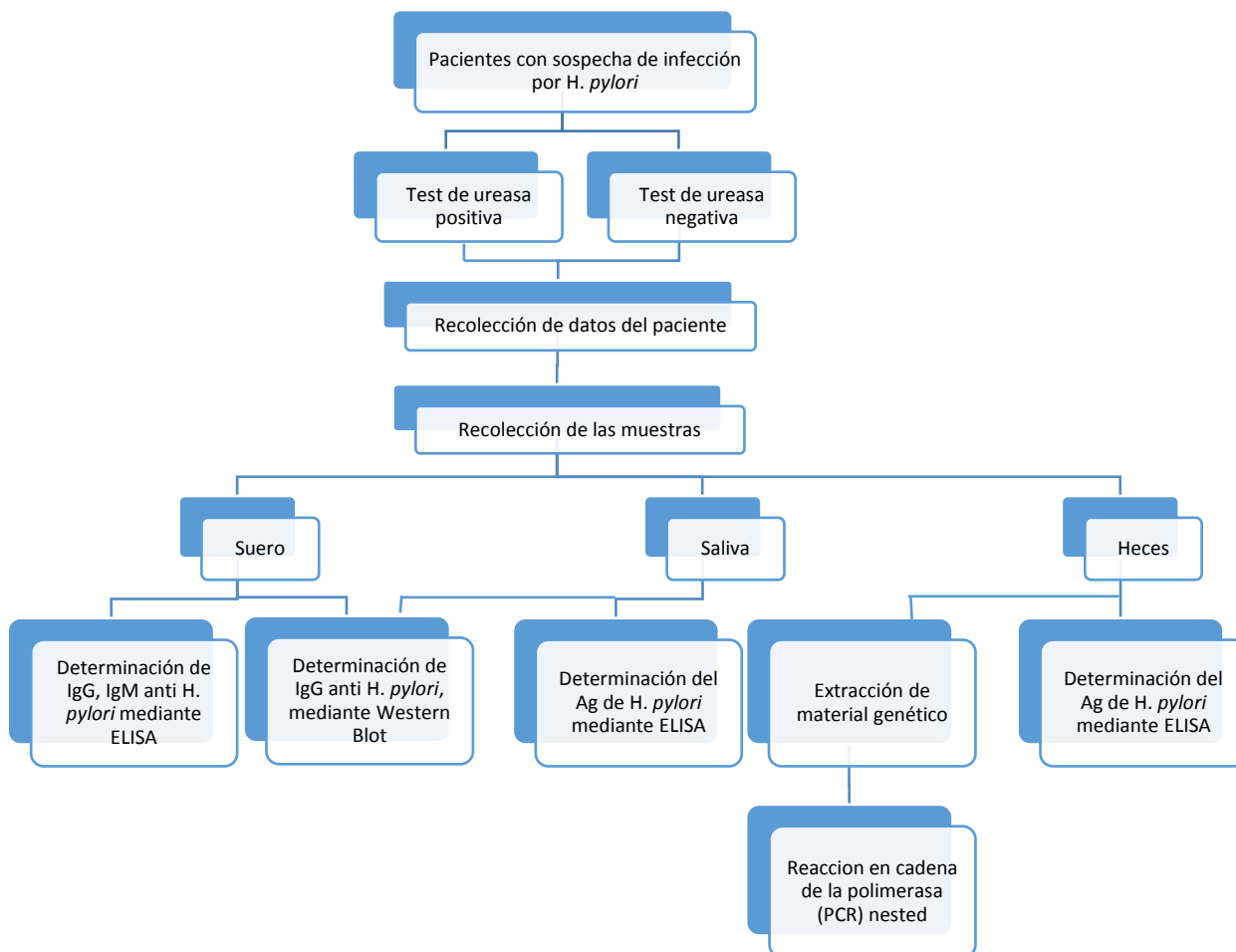
Se define como patrón de oro también conocido como gold standar a la prueba o criterio utilizado para definir inequívocamente una enfermedad. Se construye sobre el supuesto de que aplicando esta prueba es posible de tener el 100% de probabilidad de realizar un diagnóstico correcto (Diaz C., 2012).

El rendimiento de todo test diagnóstico se basa en su comparación con un gold standar (estándar de oro, patrón de oro, patrón de referencia). El gold standar es la técnica diagnóstica que define la presencia de la condición con la máxima certeza conocida. Debido a la falta de consenso en la forma de traducir este concepto, utilizaremos su denominación en inglés (Salech F., 2008).

Este patrón de oro se utiliza para referirse a la prueba más precisa posible, para realizar estudios complementarios de acuerdo a los valores reales que se estiman obtener (CICB, 2012).

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. FLUJOGRAMA DE ESTUDIO



#### 9.1.1. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Los pacientes que participaron en este estudio son pacientes con sospecha de infección por *H. pylori* por lo cual presentan una orden médica para el servicio de endoscopia, en el Hospital Obrero de la ciudad de La Paz, con solicitud del test de ureasa.

De forma inicial se procedió a la firma, por parte del paciente, del consentimiento informado (ANEXO 1). La recolección de los datos del paciente como nombre, edad y presunto diagnóstico fueron obtenidos a partir de la orden médica del Hospital Obrero. Posterior a la endoscopia realizada por el gastroenterólogo, se anotaron los resultados obtenidos en el test de ureasa. Se consultó al paciente si estaba con algún tratamiento.

Este estudio se realizó con 94 pacientes. Para almacenar los datos sobre la edad de los pacientes y los resultados del test de ureasa se creó una planilla con el programa Microsoft Excel 2013 y también se almacenaron los datos en el programa Epi Info.

### **9.1.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Se recolectaron tres tipos de muestras: sangre, saliva y heces. Los pacientes se encontraban en ayunas para la toma de muestra de sangre y saliva, además los pacientes recolectaron una muestra de heces, el mismo día que se realizó la endoscopia, en un envase otorgado previamente. Las muestras obtenidas fueron procesadas en el Instituto SELADIS, la extracción del DNA y la técnica PCR se procesaron en el IITCUP (Instituto de Investigaciones Técnico Científicas).

Se procedió a registrar los datos del paciente y los resultados obtenidos en el test de ureasa. Se continuó con la toma de muestra de sangre, unos 3ml de sangre sin anticoagulante, se separó el suero y se congelo hasta su procesamiento; las muestras fueron congeladas un máximo de 6 días.

Se realizó la toma de muestra de saliva, con un bulbo estéril, directamente en un eppendorf de 2ml, y se congelaron estas muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento; estas muestras fueron congeladas un máximo de 7 días.

La muestra de heces fue recolectada por el paciente en un recipiente nuevo de boca ancha, con previa indicación de que la muestra no sea almacenada más de 2 horas. Al recoger las muestras se verificó que cada muestra este correctamente identificada con el nombre del paciente. Para la detección del antígeno se realizó un previo tratamiento el mismo día de recolección de la muestra, este tratamiento se explicara más adelante. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se congelo la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento. La muestra de heces fue recolectada el mismo día que el paciente se realizó la endoscopia, o unos días después de la misma.

### **9.1.3. DETERMINACIÓN DE IgG E IgM ANTI HELICOBACTER *PYLORI* POR EL MÉTODO ELISA**

Se trabajó con las muestras de suero, atemperadas. Se utilizó el método ELISA (Accubind™) para determinar anticuerpos IgG e IgM anti *H. pylori*. El procedimiento se realizó según el prospecto del kit:

- Se añadieron las muestras, previamente diluidas (dilución 1/100 con el tampón de dilución), a los pocillos junto con solución de conjugado biotinilado.
- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, se realizó 3 lavados. Se adicionó el conjugado (peroxidasa) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se realizó 3 lavados y se adicionó el sustrato.
- Se añadió la solución de parada y los resultados fueron interpretados por el espectrofotómetro.
- Para el control de calidad se utilizaron los calibradores 25 U/ml y 50 U/ml para la IgG anti *H. pylori* e IgM anti *H. pylori* respectivamente. Se utilizaron estos calibradores porque los mismos son los calibradores más próximos al valor de corte.
- Se consideró positivo a todo valor mayor a 20 U/ml para IgG anti *H. pylori* y todo valor mayor a 40U/ml para IgM anti *H. pylori*

### **9.1.4. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO DE HELICOBACTER *PYLORI* POR EL MÉTODO ELISA**

Para la detección del antígeno de *H. pylori* en las muestras de heces y saliva se utilizó el enzimoimmunoanálisis comercialmente disponible (Diagnostic Bioprobes Srl).

Las muestras de heces pasaron por un pre tratamiento, para lo cual se utilizó el kit de extracción de heces (que viene incluido en el kit Diagnostic Bioprobes Srl). A continuación se describe la técnica empleada (ANEXO 2):

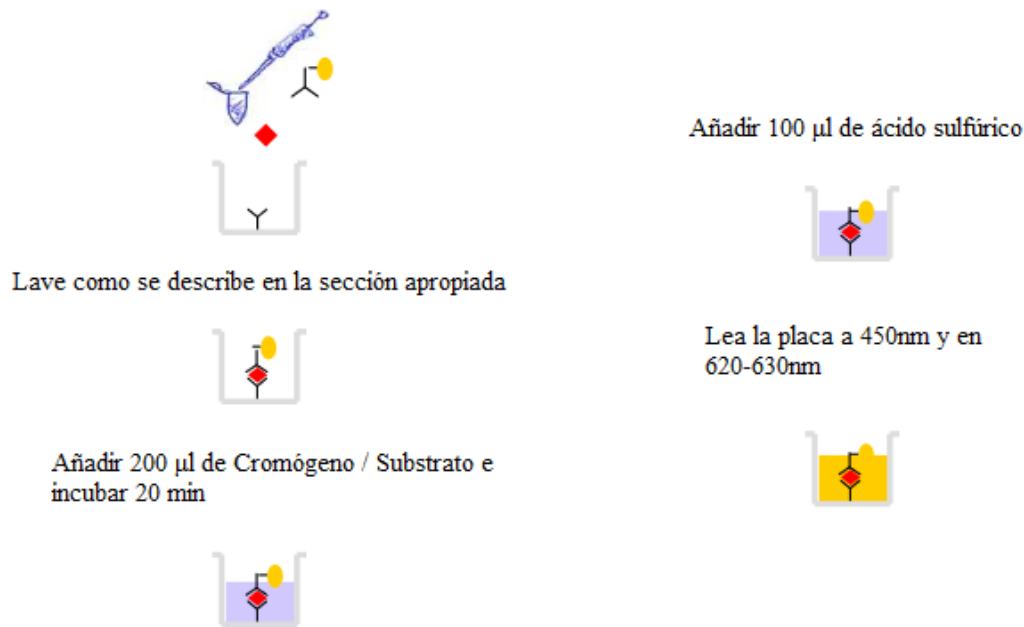
- Se abrió el contenedor de las heces y se introdujo el pincel en la profundidad de la muestra, girando el pincel en modo de recoger la cantidad necesaria (aproximadamente 0,2gr).



- Se transfirió el pincel a 1ml de tampón de extracción (que viene incluido en el kit) (buffer 10mMTris-HCl pH 7,4+/-0,1, Bovine Serum Albumin (BSA) 2%).
- Luego de agitar por 1 minuto se filtró el contenido, la solución filtrada se congelo hasta su procesamiento (las muestras estuvieron congeladas hasta 7 días).

Se procesaron las muestras según el prospecto del kit (Figura 8), en la cual la solución filtrada de la muestra de heces y el conjugado se añadieron a los pocillos, se incubaron por 2 horas a 37°C. Se realizó 4 a 5 lavados para eliminar el material no unido. Se añadió el sustrato y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió solución de parada y los resultados fueron interpretados por el espectrofotómetro. El control de calidad se realizó utilizando el calibrador 0,1 ug/ml, se utilizó este calibrador porque es el que está más próximo al valor de corte. Las muestras con una concentración de antígeno *H. pylori* superior a 0,05 ug/ml se consideraron positivos.

Añadir 100 µl de calibradores, muestras y conjugado a la placa y luego incubar durante 120 minutos a 37°C



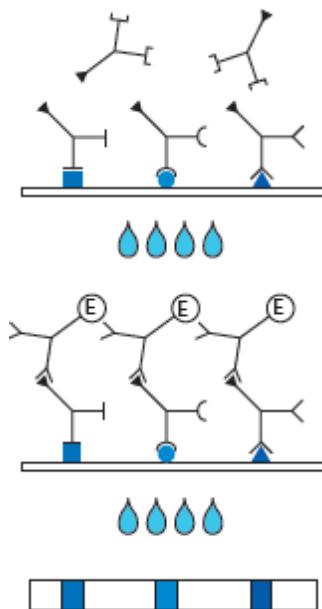
**FIGURA 8.** Procedimiento del método ELISA para la detección del antígeno de *H. pylori* en heces.  
FUENTE: DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl. INS HPAG. CE/eng. pag 8

En el caso de la muestras de saliva, se utilizó el mismo kit (Diagostic Bioprobes Srl), con la diferencia de que se añadió a los pocillos la muestra de saliva sin ninguna dilución.

Todo el procedimiento restante fue el mismo que en la muestra de heces, utilizando el mismo calibrador. La interpretación de los resultados fue la misma que en las muestras de heces.

### 8.1.5. DETERMINACIÓN DE IgG ANTI *HELICOBACTER PYLORI* POR WESTERN BLOT

La determinación de IgG anti *H. pylori* se realizó mediante el método de Western Blot. A partir de muestras de suero y saliva; siguiendo el protocolo establecido por el kit (Mikrogen Diagnostik). En el caso de las muestras de saliva se utilizó una cantidad de 500 ul de muestra, el procedimiento restante fue el mismo que con las muestras de suero (Figura 9).



- 1ª incubación: Una tira de prueba cargado con antígenos de *Helicobacter pylori* se incuba con suero diluido o saliva en un plato para 1 hora.

Lavar 3 veces.

- 2º La incubación: se añaden conjugado con peroxidasa de anticuerpos anti-humanos (IgG específica). Incubar durante 45 minutos.

Lavar 3 veces.

- La reacción da color 8 minutos después de la adición de la solución de colorante, en soluble en bandas de colores se desarrolla en los sitios en las tiras de prueba ocupadas por anticuerpos.

**FIGURA 9.** Procedimiento del Western Blot IgG anti *H. pylori*

**FUENTE:** MIKROGEN molekularbiologische Entwicklungs-GmbH

<https://www.qedbio.com/v/pdf/PIREHPE.pdf>

### 8.1.6. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENETICO

Se realizó la purificación del ADN por el método MetaHIT (Meta genómica del consorcio Tracto Intestinal Humano) utilizado por Agata Wesolowska y colaboradores (Wesolowska A., 2014,). También utilizada por Jean Jacques Godon y colaboradores (Godon J., 1997).

- Se utilizó 0,2 g de muestra de heces, a esta muestra se agregó tiocianato de guanidina y sarcosil.
- Luego de una incubación a 70 °C se añadió zirconio/silica deads.
- Se mezcló y se agregó PVP (polyvinylpolypyrrolidona).
- Luego de mezclar se realizó tres lavados del sedimento con solución TENP (Tris, EDTA, NaCl y PVP), acumulando el sobrenadante de los tres lavados en un solo eppendorf.
- Al sobrenadante reunido se le agregó Isopropanol, luego de dejar reposar y centrifugar se agregó tampón fosfato y acetato de sodio al sedimento.
- Después de dejar incubar a -20°C y centrifugar se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
- Se agregó al sobrenadante RNasa y se incubó a 37°C, se agregó acetato de sodio y etanol absoluto.
- Luego de dejar reposar y centrifugar se agregó al sedimento etanol al 70%. Se dejó secar el sedimento y se resuspendió el DNA obtenido en 100ul de H<sub>2</sub>O free.

### **8.1.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Se realizó la técnica de PCR para la detección de ADN de *H. pylori* de forma inicial se realizó la PCR FD1, para lo cual se realizó una dilución de las muestras de DNA obtenidas (dilución 1/100), empleando los cebadores específicos: FD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y RP2 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. Estos cebadores permiten la amplificación de una región de 1500 pb del gen 16rRNA. Las condiciones de reacción fueron: SYBR Green (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), agua free y cebadores 5mM.

Para el PCR FD1 se utilizó los siguientes ciclos: Pre desnaturalización a 95°C por 5 minutos, desnaturalización a 94°C por 50 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto 15 segundos, 30 ciclos y elongación final a 72°C por 10 minutos. Se revelaron los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, dejando correr por 15 minutos a 100V.

Con los amplicones obtenidos en la PCR FD1, se realizó la PCR anidada. Para lo cual se empleó los cebadores específicos: 16S1 5'CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3' y 16S2 5'-AGGATGAAGGTTTAAGGATT-3'. Estos cebadores permiten la amplificación de una región de 446 pb del gen 16rRNA de *H. pylori*. Las condiciones de reacción fueron: SYBR Green (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), agua free y cebadores 10mM. Realizando las respectivas diluciones de los amplicones obtenidos. (Anexo 4)

## **8.2. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Test diagnostico (Estudio analítico de prueba diagnóstica)

## **8.3. CONTEXTO Y LUGAR**

Las muestras de este estudio se obtuvieron de pacientes con sospecha de infección por *H. pylori* en el servicio de Endoscopia del Hospital Obrero de la ciudad de la Paz Bolivia. Las muestras obtenidas correspondieron a la demanda natural de pacientes en el área de Endoscopia. Se les solicitó a los pacientes que trajeran una muestra de heces, en un recipiente nuevo, que se les otorgó el día que vinieron a que les programen la endoscopia.

### **8.3.1. TAMAÑO DE MUESTRA**

El tamaño de muestra para el presente estudio fue de 94 pacientes, este tamaño de muestra fue calculado mediante el programa estadístico Epi Info<sup>TM</sup>7. Este programa realizó el cálculo del tamaño de muestra utilizando la prevalencia, para lo cual se utilizó una prevalencia del 62,9%, que fue determinada en el departamento de La Paz por Ruiz R., el año 2013 (Ruiz R, 2013).

### **8.3.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS EN ESTUDIO**

Se utilizaron muestras de sangre, saliva y heces por cada paciente que se realizó la endoscopia para el test de ureasa en el Hospital Obrero durante el mes de agosto a octubre de la gestión 2016.

### **8.3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Criterios de inclusión: Pacientes con sintomatología de una infección por *H. pylori* (evaluado por el médico tratante), que se hayan realizado la endoscopia para la realización del test de ureasa, que asistieron al Hospital Obrero. Y que aceptaron voluntariamente por escrito participar en el estudio, en el caso de pacientes menores de edad el consentimiento tendría que ser firmado por los tutores. Pacientes con una edad entre 6 a 70 años, pacientes varones y mujeres. En el estudio se tuvieron pacientes.

Criterios de exclusión: Pacientes que hayan recibido durante las últimas cuatro semanas: antibióticos, bismuto, quimioterapia, bloqueadores de hidrogeno e inhibidores de la bomba de protones. Pacientes inmunosuprimidos o con infecciones causadas por bacterias del genero *Helicobacter* (excepto *H. pylori*), como ser *H. bilis*, esto se aplicó al tomar en cuenta el diagnostico que tenían cada paciente en su orden médica. Pacientes que no estén en ayunas.

### **8.3.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Se describieron los resultados obtenidos en cada una de las técnicas diagnósticas mediante el número de casos observados y sus porcentajes. La estimación de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de los test, se determinaron utilizando como gold estándar al test de ureasa, realizado a partir de la endoscopia.

Para estimar la concordancia entre los diferentes métodos de diagnóstico de infección por *H. pylori* se utilizó el coeficiente de concordancia kappa.

Se analizaron los datos cualitativos del valor diagnóstico a través de tablas 2 x 2. El análisis de concordancia se realizó con el programa Minitab 15. Los datos de las tablas 2x2 se introdujeron en el programa estadístico EPIDAT 3.0 y se realizó la determinación de los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, también con la ayuda de este programa se determinó la concordancia entre las técnicas de diagnóstico (con un nivel de confianza del 95%). Un valor p inferior a 0,05 se utiliza para indicar la significancia estadística.

## 9. RESULTADOS

Se trabajó con 94 pacientes, de los cuales se recolecto sangre, saliva y heces de 76 pacientes; se recolecto sangre y saliva de 17 pacientes y se recolecto sangre de un paciente; dando un total de 94 muestras de sangre, 93 muestras de saliva y 76 muestras de heces (Tabla 1) (ANEXO 3).

	N° de pacientes	N° de muestras de sangre	N° de muestras Saliva	N° de muestras Heces
	76	76	76	76
	17	17	17	-
	1	1	-	-
<b>TOTAL</b>	94	94	93	76

**TABLA 1.** Cantidad de pacientes y muestras obtenidas en el estudio.

De los 94 pacientes: 58 tuvieron un test de ureasa positivos y 36 tuvieron un test de ureasa negativo.

De los 58 pacientes con test de ureasa positivo se obtuvo lo siguiente: método ELISA IgG anti *H. pylori* en suero 54 positivos y 4 negativos, ELISA IgM anti *H. pylori* en suero 30 positivos y 28 negativos, Western blot IgG anti *H. pylori* en suero 53 positivo y 2 negativos, ELISA antígeno en heces 25 positivo y 32 negativos, PCR en heces 35 positivo y 12 negativos, Western blot IgG anti *H. pylori* en saliva 8 positivo y 16 negativos, ELISA antígeno en saliva 25 positivos y 32 negativos (Tabla 2).

De los 36 pacientes con test de ureasa negativo se obtuvo lo siguiente: método ELISA IgG anti *H. pylori* en suero 17 positivos y 19 negativos, ELISA IgM anti *H. pylori* en suero 13 positivos y 23 negativos, Western blot IgG anti *H. pylori* en suero 29 positivo y 6 negativos, ELISA antígeno en heces 9 positivo y 18 negativos, PCR en heces 15 positivo y 13 negativos, Western blot IgG anti *H. pylori* en saliva 5 positivo y 2 negativos, ELISA antígeno en saliva 31 positivos y 5 negativos (Tabla 2).

Método		ELISA IgG anti <i>H. pylori</i>	ELISA IgM anti <i>H. pylori</i>	Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i>	ELISA Detección del antígeno	PCR	Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i>	ELISA Detección del antígeno
Tipo de muestra		suero	suero	suero	heces	heces	saliva	saliva
58 pacientes con test de ureasa positivo	Positivo	54	30	53	39	35	8	25
	Negativo	4	28	2	10	12	16	32
36 pacientes con test de ureasa negativo	Positivo	17	13	29	9	15	5	31
	Negativo	19	23	6	18	13	2	5
Total		94	94	90	76	75	31	93

**TABLA 2.** Resultados obtenidos mediante el método ELISA, el método Western Blot y la técnica PCR, a partir de los 58 pacientes con test de ureasa positivo y 36 pacientes con test de ureasa negativo.

A partir de los resultados obtenidos de tipo cualitativo, nominal dicotómica, se calculó el valor que expresa el grado en que estos métodos de diagnóstico (método ELISA Ac anti *H. pylori* IgG e IgM en suero, ELISA antígeno en heces, Western Blot IgG anti *H. pylori* en suero, la técnica PCR en muestra de heces) coincidan con el test de ureasa, aplicando el índice de concordancia kappa mediante el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Al determinar la concordancia del método ELISA IgG e IgM anti *H. pylori* en suero ante el test de ureasa, se obtuvo una concordancia observada del 0,7766 y 0,5638, una concordancia esperada del 0,5598 y 0,4900, un valor kappa de 0,5744 y 0,2671, respectivamente. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia moderada y mediana entre el método ELISA IgG e IgM anti *H. pylori* en suero y el test de ureasa, respectivamente (Tabla 3).

Al determinar la concordancia del método ELISA antígeno en heces ante el test de ureasa, se obtuvo una concordancia observada del 0,7500, una concordancia esperada del 0,5381 y un valor kappa de 0,5294. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia moderada entre el método ELISA antígeno en heces y el test de ureasa (Tabla 3).

	<b>ELISA IgG anti H. pylori en suero</b>	<b>ELISA IgM anti H. pylori en suero</b>	<b>ELISA antígeno en heces</b>	<b>Western Blot IgG anti H. pylori en suero</b>	<b>PCR en heces</b>
<i>Concordancia observada</i>	0,7766	0,5638	0,7500	0,6556	0,6400
<i>Concordancia esperada</i>	0,5598	0,4900	0,5381	0,5914	0,5422
<i>Valor de Kappa</i>	0,5744	0,2671	0,5294	0,3842	0,3626
<i>Fuerza de concordancia</i>	Moderada	Mediana	Moderada	Mediana	Mediana

**TABLA 3.** Valoración de la concordancia entre los métodos ELISA Ac anti H. pylori IgG e IgM en suero , ELISA antígeno en heces, Western Blot IgG anti H. *pylori* en suero y PCR en muestra de heces ante el Test de ureasa aplicando el índice kappa.

Al determinar la concordancia del método Western blot IgG anti H. *pylori* en suero ante el test de ureasa, se obtuvo una concordancia observada del 0,6556, una concordancia esperada del 0,5914 y un valor kappa de 0,3842. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia mediana entre el método Western blot IgG anti H. *pylori* en suero y el test de ureasa (Tabla 3).

Al determinar la concordancia de la técnica PCR en heces ante el test de ureasa, se obtuvo una concordancia observada del 0,6400, una concordancia esperada del 0,5422 y un valor kappa de 0,3626. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia mediana entre la técnica PCR en heces y el test de ureasa (Tabla 3).

### **9.1. VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, ÍNDICE DE VALIDEZ Y VALORES PREDICTIVOS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).**

#### **Método ELISA IgG anti H. *pylori* en suero**

Para determinar los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del método ELISA IgG anti H. *pylori* se realizó una tabla de contingencia, utilizando como gold estándar al test de ureasa (Tabla 4).



		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
<b>ELISA IgG anti H. pylori en suero</b>	<b>Positivo</b>	54	17	71
	<b>Negativo</b>	4	19	23
<b>Total</b>		58	36	94

**TABLA 4.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgG anti H. *pylori* y el test de ureasa

El método ELISA IgG anti H. *pylori* obtuvo una sensibilidad del 93%, una especificidad de 53%, con un valor predictivo positivo del 76% y un valor predictivo negativo del 83% (tabla 13).

El método ELISA IgG anti H. *pylori* con una sensibilidad de 93% identificará correctamente al 93% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 53% identificará correctamente al 53% de los casos verdaderamente negativos.

El índice de validez obtenido fue del 78% lo cual nos indica que el 78% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido de 76% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método ELISA IgG anti H. *pylori*, existe un 76% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 83% significa que ante un resultado negativo del método ELISA IgG anti H. *pylori* existe una probabilidad del 83% de que la enfermedad esté ausente.

### Método ELISA IgM anti *H. pylori* en suero

Para determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método ELISA IgM anti *H. pylori* se realizó una tabla de contingencia ante el test de ureasa (Tabla 5).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA IgM anti <i>H. pylori</i>	Positivo	30	13	43
	Negativo	28	23	51
Total		58	36	94

**TABLA 5.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori* y el test de ureasa

El método ELISA IgM anti *H. pylori* obtuvo una sensibilidad del 52%, una especificidad de 64%, con un valor predictivo positivo del 70% y un valor predictivo negativo del 45% (Tabla 13).

El método ELISA IgM anti *H. pylori* con una sensibilidad de 52% identificará correctamente al 52% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 64% identificará correctamente al 64% de los casos verdaderamente negativos.

El índice de validez obtenido fue del 56% lo cual nos indica que el 56% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido de 70% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método ELISA IgM anti *H. pylori*, existe un 70% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 45% significa que ante un resultado negativo del método ELISA IgM anti *H. pylori* existe una probabilidad del 45% de que la enfermedad esté ausente.

### Método ELISA antígeno en heces

De igual manera se realizó una tabla de contingencia entre el método ELISA antígeno en heces y el test de ureasa, para determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método ELISA antígeno en heces (Tabla 6).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
método ELISA antígeno en heces	Positivo	39	9	48
	Negativo	10	18	28
Total		49	27	76

**TABLA 6.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante la detección de antígeno en heces por el método ELISA y el test de ureasa.

El método ELISA antígeno en heces obtuvo una sensibilidad de 80%, una especificidad de 67%, con un valor predictivo positivo del 81% y un valor predictivo negativo del 64% (Tabla 13).

El método ELISA antígeno en heces con una sensibilidad de 80% identificará correctamente al 80% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 67% identificará correctamente al 67% de los casos verdaderamente negativos.

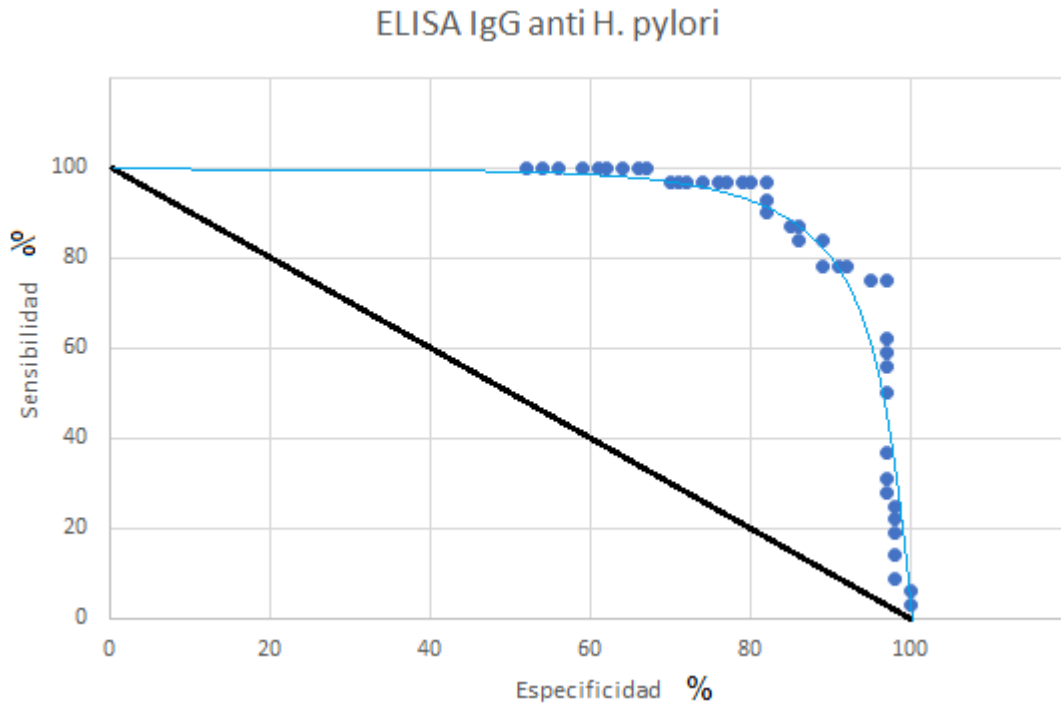
El índice de validez obtenido fue del 75% lo cual nos indica que el 75% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido de 81% significa que si se obtiene un resultado positivo en el método ELISA antígeno en heces, existe un 81% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 64% significa que ante un resultado negativo en el método ELISA antígeno en heces existe una probabilidad del 64% de que la enfermedad esté ausente.

### 9.1.1. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CORTE DEL MÉTODO ELISA IgG ANTI HELICOBACTER *PYLORI* EN SUERO

Utilizando los valores obtenidos por el método ELISA IgG anti *H. pylori* en suero se elaboró la curva ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic curves) (Grafica 1).



**Grafica 1.** Relación entre la sensibilidad y especificidad de los valores obtenidos mediante el método ELISA IgG anti *H. pylori*.

A partir de la curva ROC se obtuvo un valor de corte de 33 U/ml para el método ELISA IgG anti *H. pylori*. Aplicando este valor de corte en los datos obtenidos se realizó una tabla de contingencia ante el test de ureasa (Tabla 7).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA IgG anti <i>H. pylori</i>	Positivo	50	10	60
	Negativo	8	26	34
Total		58	36	94

**TABLA 7.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgG anti *H. pylori* (con el valor de corte de 33 U/ml) y el test de ureasa

El método ELISA IgG anti *H. pylori* con el valor de corte de 33U/ml obtuvo una sensibilidad del 86%, una especificidad de 72%, con un valor predictivo positivo del 83% y un valor predictivo negativo del 76% (Tabla 8).

<b>METODO ELISA IgG ANTI H. PYLORI EN SUERO</b>	<b>Valor en %</b>
<b>Sensibilidad</b>	86
<b>Especificidad</b>	72
<b>Índice de validez</b>	81
<b>Valor predictivo +</b>	83
<b>Valor predictivo –</b>	74

**TABLA 8.** Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos mediante el método ELISA IgG anti *H. pylori* (con el valor de corte de 33 U/ml) y el test de ureasa

El método ELISA IgG anti *H. pylori* con una sensibilidad de 86% identificará correctamente al 86% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 72% identificará correctamente al 72% de los casos verdaderamente negativos.

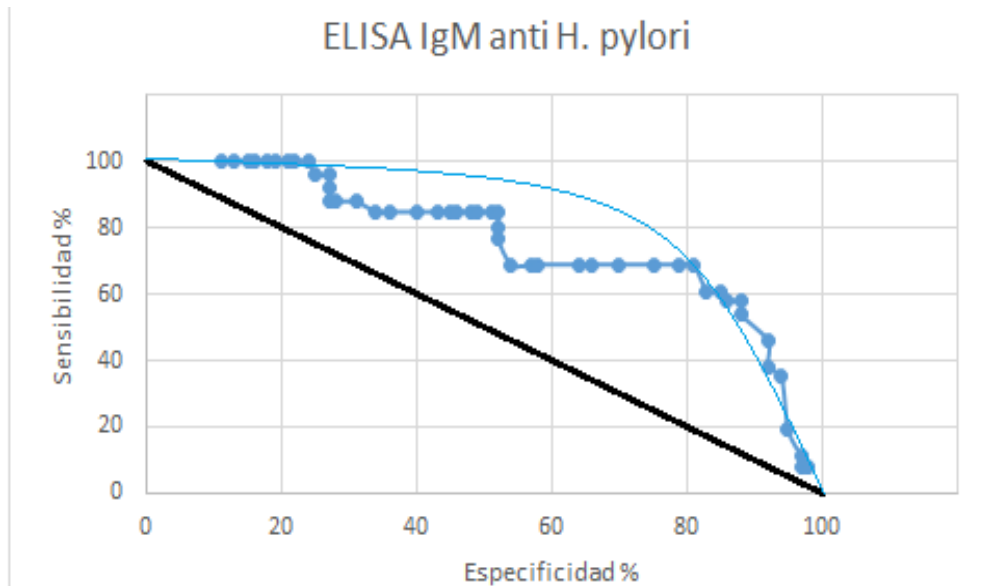
El índice de validez obtenido fue del 81% lo cual nos indica que el 81% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido del 83% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método ELISA IgG anti *H. pylori*, existe un 83% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido del 72% significa que ante un resultado negativo del método ELISA IgG anti *H. pylori* existe una probabilidad del 72% de que la enfermedad esté ausente.

### 9.1.2. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CORTE DEL MÉTODO ELISA IgM ANTI HELICOBACTER *PYLORI* EN SUERO

Utilizando los valores obtenidos por el método ELISA IgM anti *H. pylori* se elaboró la curva ROC (Grafica 2).



**GRAFICA 2.** Relación entre la sensibilidad y especificidad de los valores obtenidos mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori*

A partir de la curva ROC se obtuvo un valor de corte de 30 U/ml para el método ELISA IgM anti *H. pylori*. Aplicando este valor de corte en los datos obtenidos se realizó una tabla de contingencia ante el test de ureasa (Tabla 9).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA IgG anti <i>H. pylori</i>	Positivo	45	18	63
	Negativo	18	13	31
Total		63	31	94

**TABLA 9.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori* (con el valor de corte de 30 U/ml) y el test de ureasa.

El método ELISA IgM anti *H. pylori* con el valor de corte de 30 U/ml, obtuvo una sensibilidad del 71%, una especificidad de 42%, con un valor predictivo positivo del 71% y un valor predictivo negativo del 42% (Tabla 10).

<b>METODO ELISA IgM ANTI H. PYLORI EN SUERO</b>	<b>Valor en %</b>
<b>Sensibilidad</b>	71
<b>Especificidad</b>	42
<b>Índice de validez</b>	62
<b>Valor predictivo +</b>	71
<b>Valor predictivo –</b>	42

**TABLA 10.** Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori* (con el valor de corte de 30 U/ml) y el test de ureasa.

El método ELISA IgM anti *H. pylori* con una sensibilidad de 71% identificará correctamente al 71% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 42% identificará correctamente al 42% de los casos verdaderamente negativos.

El índice de validez obtenido fue del 61% lo cual nos indica que el 61% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido del 71% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método ELISA IgM anti *H. pylori*, existe un 71% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido del 42% significa que ante un resultado negativo del método ELISA IgM anti *H. pylori* existe una probabilidad del 42% de que la enfermedad esté ausente.

## 9.2. VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL WESTERN BLOT IgG ANTI HELICOBACTER PYLORI EN SUERO

Se realizó una tabla de contingencia entre el método Western Blot IgG anti *H. pylori* y el Test de ureasa para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método Western Blot IgG anti *H. pylori* (Tabla 11).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
Western Blot	Positivo	53	29	82
	Negativo	2	6	8
Total		55	35	90

**TABLA 11.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método Western Blot IgG anti *H. pylori* y el test de ureasa.

El método Western Blot obtuvo una sensibilidad de 96%, una especificidad de 17%, con un valor predictivo positivo del 65% y un valor predictivo negativo del 75% (Tabla 13).

El método Western Blot IgG anti *H. pylori* con una sensibilidad de 96% identificará correctamente al 96% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 17% identificará correctamente al 17% de los casos verdaderamente negativos.

El índice de validez obtenido fue del 65% lo cual nos indica que el 65% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido de 65% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método Western Blot IgG anti *H. pylori*, existe un 65% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 75% significa que ante un resultado negativo del método Western Blot IgG anti *H. pylori* existe una probabilidad del 75% de que la enfermedad esté ausente.



### 9.3. VALORES DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN HECES

Se realizó una tabla de contingencia entre la técnica PCR y el Test de ureasa para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la técnica PCR (Tabla 12).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	35	15	50
	Negativo	12	13	25
Total		47	28	75

**TABLA 12.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante la técnica PCR y el test de ureasa.

La PCR obtuvo una sensibilidad de 75%, una especificidad de 46%, con un valor predictivo positivo del 70% y un valor predictivo negativo del 52% (Tabla 13).

La PCR con una sensibilidad de 75% identificará correctamente al 75% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 46% identificará correctamente al 46% de los casos verdaderamente negativos.

El índice de validez obtenido fue del 64% lo cual nos indica que el 64% de los individuos fue clasificado correctamente.

El valor predictivo positivo obtenido de 70% significa que si se obtiene un resultado positivo con la técnica PCR, existe un 70% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 52% significa que ante un resultado negativo en la técnica PCR existe una probabilidad del 52% de que la enfermedad esté ausente.

	ELISA IgG anti <i>H. pylori</i> en suero	ELISA IgM anti <i>H. pylori</i> en suero	ELISA antígeno en heces	Western Blot IgG anti <i>H. pylori</i> en suero	PCR en heces
Sensibilidad (%)	93	52	80	96	75
Especificidad (%)	53	64	67	17	46
Valor predictivo positivo (%)	76	70	81	65	70
Valor predictivo negativo (%)	83	45	64	75	52
Índice de validez (%)	78	56	75	65	64

**TABLA 13.** Sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del método ELISA, método Western Blot y la técnica PCR.

#### 9.4. EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS Y ANTICUERPOS ANTI *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE SALIVA

Se procesaron 31 muestras de saliva mediante el método Western Blot IgG anti *H. pylori*, de las cuales 24 eran test de ureasa positivos y 7 test de ureasa negativos. Para la determinación del antígeno, se procesaron 93 muestras de saliva por el método ELISA, de las cuales 57 eran test de ureasa positivos y 36 eran test de ureasa negativos.

En la determinación de anticuerpos anti *H. pylori* mediante el método Western Blot IgG anti *H. pylori* se realizó una tabla de contingencia ante el test de ureasa para determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (Tabla 14).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
Western blot IgG anti <i>H. pylori</i> en saliva	Positivo	8	2	10
	Negativo	16	5	21
Total		24	7	31

**TABLA 14.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante el método Western Blot IgG anti *H. pylori* en saliva y el test de ureasa.

El método Western Blot IgG anti *H. pylori* se obtuvo una sensibilidad de 33%, una especificidad de 71%, con un valor predictivo positivo del 80% y un valor predictivo negativo del 23% (Tabla 16).

El método Western Blot IgG anti *H. pylori* en saliva con una sensibilidad de 33% identificará correctamente al 33% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 71% identificará correctamente al 71% de los casos verdaderamente negativos.

El valor predictivo positivo obtenido de 80% significa que si se obtiene un resultado positivo con el método Western Blot IgG anti *H. pylori* en saliva, existe un 80% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 24% significa que ante un resultado negativo en el método Western Blot IgG anti *H. pylori* en saliva existe una probabilidad del 24% de que la enfermedad esté ausente.

En la detección de antígeno en saliva mediante el método ELISA se realizó una tabla de contingencia ante el test de ureasa, para determinar los valores de sensibilidad y especificidad y valores predictivos (Tabla 15).

		Test de ureasa		Total
		Positivo	Negativo	
Detección de antígeno en saliva por el método ELISA	Positivo	25	5	30
	Negativo	32	31	63
Total		57	36	93

**TABLA 15.** Distribución de muestras positivas y negativas mediante la detección de antígeno en saliva por el método ELISA y el test de ureasa.

En la detección de antígeno en saliva por el método ELISA se obtuvo una sensibilidad de 44%, una especificidad de 86%, con un valor predictivo positivo del 83% y un valor predictivo negativo del 49% (Tabla 16).

La detección de antígeno en saliva por el método ELISA con una sensibilidad de 44% identificará correctamente al 44% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 86% identificará correctamente al 86% de los casos verdaderamente negativos.

El valor predictivo positivo obtenido de 83% significa que si se obtiene un resultado positivo con la detección de antígeno en saliva por el método ELISA, existe un 83% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 49% significa que ante un resultado negativo en la detección de antígeno en saliva por el método ELISA existe una probabilidad del 49% de que la enfermedad esté ausente.

	<b>IgG anti <i>H. pylori</i> en saliva mediante el método Western Blot</b>	<b>Detección del antígeno en saliva por el método ELISA</b>
<b>Sensibilidad %</b>	33	44
<b>Especificidad %</b>	71	86
<b>Índice de validez %</b>	42	86
<b>Valor predictivo positivo %</b>	80	83
<b>Valor predictivo negativo %</b>	24	49

**TABLA 16.** Sensibilidad, especificidad, índice de validez y valores predictivos del método ELISA y Western Blot IgG anti *H. pylori* en saliva.

## 10. DISCUSIÓN

Dada la gran incidencia a nivel mundial de la infección por *H. pylori*, numerosos grupos de investigación han enfocado sus estudios en el desarrollo de técnicas de diagnóstico eficaces para la detección de este microorganismo. Como resultado de esto se cuenta con diferentes métodos para el diagnóstico de infección por *H. pylori*.

El diagnóstico de una infección por *H. pylori* está basado en un gran número de datos: la historia clínica, endoscópicos y análisis de laboratorio.

Este estudio se enfocó en la parte de análisis de laboratorio, comparando diferentes métodos de diagnóstico para la infección por *H. pylori*, utilizando como gold estándar al test de ureasa.

Se utilizó el test de ureasa como gold estándar debido a que en otros estudios se han obtenido en el test de ureasa una sensibilidad y especificidad de 89.6% y 73.3% respectivamente (Bravo E., 2011). En otro estudio reportaron una sensibilidad del 92% y una especificidad del 95% (Sato T, 1999). La sensibilidad y especificidad del test de ureasa en comparación con la histología eran 89% y 88%, respectivamente (Chou CH, 1997). Por estos datos obtenidos y considerando que esta prueba es aplicada de forma rutinaria en el diagnóstico de una infección por *H. pylori*, se optó por utilizar esta prueba como gold estándar.

El test de ureasa es una prueba rápida y barata, pero su sensibilidad es menor después del tratamiento. Motivo por el cual en este estudio uno de los criterios de exclusión fue que el paciente no haya recibido durante las últimas cuatro semanas tratamiento con antibióticos, lo cual se basó en la palabra del paciente; debido a que varios pacientes optan por la automedicación no se puede garantizar que todos los pacientes hayan estado sin tratamiento.

El método ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti *H. pylori*, posee la ventaja de ser no invasiva, fácil de realizar además, este método no está influenciado por el error asociado a la toma de muestra, lo que sí sucede con las técnicas directas basadas en la toma de biopsias gástricas (Mégraud F., 2005), ya que se debe considerar que la sensibilidad

y especificidad del test de ureasa varía según el área del cual se tome la muestra, como ser antro o cuerpo gástrico.

La sensibilidad (93%) del método ELISA IgG anti *H. pylori*, obtenida en este estudio se asemeja a los obtenidos por Mattana C. et. al., en el cual obtuvieron una sensibilidad del 98%. Mattana et al. obtuvo una especificidad del 87%, el cual es mayor al obtenido en este estudio (53%), esto se puede deber a la diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en nuestra población en estudio (80% (Sivapalasingam S1, 2014) ) ante la población en estudio de Mattana (oscila entre 35% a 56% (Olmos JA, 2000) ), ya que al tener una mayor prevalencia en nuestra población es una razón por la cual la mayoría de los pacientes presento positividad de IgG anti *H. pylori*, obteniendo de esta manera falsos positivos, lo cual disminuyo la especificidad del método.

Mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori* se obtuvo una menor sensibilidad (52%) y especificidad (64%), a comparación con los resultados de otros estudios en los cuales el método ELISA presento una sensibilidad y especificidad entre un 80% a 90%. (Kumar S., 2014 ) Estos resultados pueden deberse a que la IgM anti *H. pylori* puede ser detectada al poco tiempo después de ocurrida la infección y la respuesta mediada por IgM tiene una duración corta. Es difícil hallarla por su corta permanencia en circulación, posible causa de falsos negativos, teniendo como resultado una baja sensibilidad.

Niveles de IgM pueden ser detectados al poco tiempo después de ocurrida la infección, sin embargo, los niveles de IgG indican el carácter crónico de la misma (Kindermann A, 2001). En este estudio se tubo pacientes que dieron positivo en el test de ureasa y en el método ELISA IgG anti *H. pylori*, dando un resultado negativo mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori*; esto se puede deber a que en estos pacientes se sospechaba de una infección crónica, razón por la cual se obtuvieron resultados negativos mediante el método ELISA IgM anti *H. pylori*, lo cual influyó en los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad en este estudio (Kindermann A, 2001).

También se debe tener en cuenta el hecho de que la respuesta inmune del huésped varía de individuo a individuo y también la duración de la exposición, el estado nutricional, la antigenicidad cruzada con otras bacterias antigénicas prevalentes, por ejemplo,

*Campylobacter* etc. en áreas endémicas; pueden influenciar en los resultados obtenidos en diferentes estudios sobre la sensibilidad y especificidad de métodos de diagnóstico que determinen la presencia de anticuerpos. (Quintana E., 2000).

El método ELISA posibilita la realización de estudios epidemiológicos permitiendo obtener resultados cuantitativos, establecido distintos valores de corte para diferentes grupos poblacionales. Razón por la cual varios estudios sugieren la conveniencia de revalidar los valores de corte de los kits comerciales para ser utilizados en diferentes poblaciones (Lopez M., 1993).

En este estudio se utilizó la curva ROC para determinar el valor de corte para el método ELISA IgG anti *H. pylori* e IgM anti *H. pylori*. El valor de corte según el kit es de 20U/ml para el método ELISA IgG anti *H. pylori* a partir de la curva ROC con los valores obtenidos en este estudio se determinó un valor de corte de 33U/ml, con este nuevo valor se obtuvo una sensibilidad del 86% y una especificidad del 72% para el método ELISA IgG anti *H. pylori*, a partir de estos resultados podemos ver que la sensibilidad bajo un poco, del 93% al 86%, pero la especificidad aumento su valor del 52% al 72%.

El valor de corte según el kit es de 40U/ml para el método ELISA IgM anti *H. pylori*, a partir de la curva ROC con los valores obtenidos en este estudio se obtuvo un valor de corte de 30U/ml, con este valor se obtuvo una sensibilidad del 71% y una especificidad del 42% para el método ELISA IgM anti *H. pylori*, a partir de estos resultados podemos ver que la sensibilidad aumento del 52% al 71%, pero la especificidad bajo su valor del 64% al 42%.

Con estos resultados podemos notar que existe una diferencia entre la sensibilidad y especificidad obtenida con el valor de corte del kit y el valor de corte a partir de los resultados obtenidos en nuestra población. Esto confirma que es importante evaluar el valor de corte de los kits comerciales para que puedan ser utilizados en nuestra población.

La determinación serológica de anticuerpos anti *H. pylori* se puede utilizar como un rápido screening para grandes poblaciones de pacientes y es un gran indicador de diagnóstico temprano de infección por *H. pylori* ya que la respuesta inmune puede generalmente preceder

a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. También se destaca su utilidad en el screening de pacientes dispépsicos.

El test de ureasa aunque sencillo, barato y rápido, tiene el inconveniente de precisar endoscopia, siendo por tanto un método invasivo. Además, las muestras obtenidas a partir de biopsias ofrecen un estudio parcial de la mucosa, siendo la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica parcelar. Es un test indirecto, pues mide la capacidad de la bacteria para hidrolizar la urea, a diferencia de la detección de antígeno en heces por el método ELISA que la detecta directamente.

Numerosos estudios validan la utilidad de la detección de antígeno en heces por el método ELISA, como método para diagnosticar la infección y monitorizar la eficacia del tratamiento. En el presente estudio se obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 80 y 67% respectivamente. La sensibilidad y especificidad obtenidas se asemejan a los datos obtenidos por Morales (Morales A., 2002) el cual reporto una sensibilidad del 97,6% y especificidad del 76,2%, trabajo con 104 pacientes con un rango de edad de 6 a 78 años, utilizo como gold estándar a la histología y el test de ureasa.

La sensibilidad de la detección de antígeno en heces por el método ELISA obtenida en este estudio también se asemeja al obtenido por Monteiro et al, (Monteiro L., 2001) el cual, trabajo con 104 pacientes con un rango de edad de 17 a 87 años, utilizo como gold estándar el cultivo, la histología y el test de ureasa, obteniendo una sensibilidad del 88,9 %.

En el presente estudio a comparación con el estudio de Monteiro et al (especificidad del 94,4%), se obtuvo una baja especificidad mediante el método ELISA antígeno en heces, esto puede deberse en parte al gold estándar utilizado; en el estudio de Monteiro et al utilizo un gold estándar compuesto, lo cual favoreció en los datos obtenidos en su estudio, ya que al tomar en cuenta solo al test de ureasa puede afectar el hecho de que entre los falsos negativos del test de la ureasa se puede destacar la existencia de formas cocoides del bacilo que aunque parecen ser una manifestación morfológica de la muerte del germen (Kusters JG, 1997), hay evidencias de que puedan ser viables e incluso infectantes (Benaissa M, 1996). Estas formas de *H. pylori* poseen escasa o nula actividad ureasa, inhabilitando para su diagnóstico toda técnica basada en dicha propiedad del germen.



Por lo mencionado en el anterior párrafo, el test de ureasa puede presentar falsos negativos, esto en nuestro estudio puede generar falsos positivos por parte del método ELISA antígeno en heces al compararlo con el test de ureasa, generando una disminución en la especificidad del método ELISA antígeno en heces. Se pueden obtener resultados negativos en el test de ureasa y positivos mediante el método ELISA antígeno en heces ya que, al realizar la detección de antígeno de *H. pylori* en heces se detectan todas las cepas de *H. pylori*, incluso las formas cocoides, ya que está basado en una reacción entre antígenos de *H. pylori* del paciente frente a los anticuerpos policlonales del test (M. Luján Sanchís, 2000.). Lo mencionado anteriormente puede ser uno de los factores por los cuales se obtuvieron falsos positivos, disminuyendo de esta manera la especificidad de la detección del antígeno de *H. pylori* en heces por el método ELISA.

Mediante el método Western blot IgG anti *H. pylori* se obtuvo una sensibilidad del 96%, valor semejante a otros estudios, como ser el de Us D, Engin D y Hasçelik G. (Us D, 2002 ) que obtuvieron una sensibilidad del 100%, trabajaron con una población con un rango de edad de 6 a 70 años, consideraron como positivo para *H. pylori* con los resultados positivos de al menos tres de los métodos convencionales (cultura y la reacción en cadena de la polimerasa de especímenes de biopsias endoscópicas, prueba de aliento de urea <sup>13</sup>C, IgG anti *H. pylori* en suero por el método ELISA). En otro estudio obtuvieron una sensibilidad del 89% y una especificidad del 73% al comparar el método Western blot IgG anti *H. pylori* con la histología (Eugenia Ma., 2000).

Se obtuvo una baja especificidad mediante el método Western Blot IgG anti *H. pylori*, esto se puede deber a que como se mencionó anteriormente no se puede garantizar que el paciente haya estado sin tratamiento, y que existe un porcentaje de pacientes que tenían como presunto diagnóstico úlcera péptica, lo cual indica que existe la posibilidad de sangrado, causas que pueden ocasionar falsos negativos mediante el test de ureasa (Añez M., 2006). Obteniendo de esta manera falsos positivos mediante el método Western blot IgG anti *H. pylori*, dando como resultado una baja especificidad.

También se debe considerar que la principal limitación de las técnicas serológicas (método ELISA IgG anti *H. pylori*, método Western Blot IgG) es que no discriminan entre

una infección pasada y una activa, por lo que no pueden ser empleadas para comprobar la erradicación de la infección a corto plazo (Treepongkaruna S., 2006).

El método Western Blot como técnica de diagnóstico serológico, tiene la gran ventaja de permitir establecer asociaciones entre la presencia de determinados factores de patogenia y el desarrollo de patologías más severas (Vilaichone R.K., 2003), así como determinar la inmunorreacción de proteínas con mayor valor diagnóstico, que tienen mayor capacidad para indicar la erradicación de la infección (Volland P., 2002.).

En el presente estudio la PCR anidada obtuvo una sensibilidad del 75% y especificidad del 46%. En otro estudio la PCR anidada en fragmentos de mucosa gástrica, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 78.4% y 89.3% respectivamente (Pazos A., 2002). Se obtuvo una sensibilidad semejante al obtenido por Pazos A., et al. La especificidad fue baja, esto se puede deber a que en este estudio se utilizó un método de extracción de bacterias en heces, el cual no es un método específico para *H. pylori*. Se debe considerar que las muestras de heces son muestras altamente contaminadas, por lo cual se aplicó el método utilizado por MetaHIT (Meta genómica del consorcio Tracto Intestinal Humano) para la extracción de material genético. Para poder obtener óptimos resultados se aplicó la PCR anidada, con la finalidad de amplificar el material genético de bacterias obtenidas en la extracción de DNA y posteriormente amplificar el gen específico de *H. pylori*.

Debido al costo y condiciones para procesar la PCR, no se aplica de forma rutinaria para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, en este estudio se aplicó este método para compararlo con la detección del antígeno en heces por el método ELISA, esto debido a que las técnicas moleculares son las más aplicadas en laboratorios de investigación y clínica, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a su alta sensibilidad y especificidad.

Al comparar los métodos de ELISA, Western blot y PCR ante el test de ureasa se obtuvo una baja especificidad; cabe mencionar que la positividad del test de ureasa depende directamente del lugar de la biopsia, este factor entre otros es una causa importante en la obtención de falsos negativos por parte del test de ureasa, debido a la distribución desigual de *H. pylori* en la mucosa gástrica. (Van der Hulst R., 1996) Lo cual dio como resultado la

obtención de falsos positivos en los métodos: ELISA, Western blot y PCR; al compararlos con este test. Disminuyendo de esta manera la especificidad de los métodos comparados en este estudio.

Anteriores estudios reportan la presencia de anticuerpos anti *H. pylori* y antígenos de *H. pylori* en muestras de saliva. La presencia de la bacteria en la cavidad oral se informó en 1989 (Krajden, 1989 ). Sin embargo, no está claro si la cavidad oral es un depósito permanente o transitorio. Varias publicaciones recientes han demostrado que la cavidad oral humana es un excelente ambiente microaerofílico, y por lo tanto un reservorio potencial de *H. pylori* (Marques S., 2016).

En la determinación de anticuerpos IgG anti *H. pylori* mediante el método Western Blot a partir de muestras de saliva, se obtuvo una sensibilidad del 33% y especificidad del 71%. En el estudio de Mounia et al. mediante el método Western Blot en muestras de saliva obtuvieron una sensibilidad muy baja (29,79%) y una alta especificidad (90,70%) (Mounia E., 2008), resultados semejantes a los del presente estudio.

Fallone et al., (Fallone, y otros, 1996) obtuvo una sensibilidad del 66% y especificidad del 74% en 106 pacientes. La especificidad obtenida en el presente estudio fue semejante a la obtenida por Fallone et al.; pero la sensibilidad obtenida en nuestro estudio fue más baja.; cabe resaltar que en el estudio de Fallone et al. utilizaron como gold estándar al método ELISA, ya que mediante su estudio determinaron una correlación de los resultados obtenidos entre la determinación de la IgG anti *H. pylori* en suero y en saliva, destacando que la infección por *H. pylori* evoca tanto las respuestas de anticuerpos locales y sistémicos (Herbrink P., 2000; ). Una causa de la baja sensibilidad obtenida puede ser la cantidad de muestra utilizada; ya que en el estudio de Fallone et al. no mencionan la cantidad de muestra con la que trabajan, y en otros estudios tampoco se encontró la cantidad de muestra con la que trabajan.

Un solo estudio menciona que trabajan con 1 ml de muestra (Ballam L., 2000), pero no indican como manipularon la misma, si la procesaron directamente o si centrifugaron la muestra para separar la mucina. En el presente estudio se trabajó con 500ul de muestra de saliva, esto debido a que les costaba acumular la saliva a varios pacientes, y también que la

muestra fue utilizada para el método Western Blot y para la detección del antígeno mediante el método ELISA, razón por la cual se trabajó con esa cantidad de muestra sin centrifugar. En el estudio de Ballam et al. obtuvieron una sensibilidad del 81% y una especificidad del 91%, estos resultados fueron obtenidos al compararlos con la detección de anticuerpos en suero mediante Western Blot.

La obtención de una baja sensibilidad, se puede relacionar con la posible baja afinidad de los anticuerpos monoclonales utilizados hacia el antígeno *H. pylori*.

La baja concentración de inóculo de *H. pylori* en la boca, lo que puede explicarse por las hipótesis reportadas en otros estudios (Momtaz H., 2012; Wong WM., 2002):

- La capacidad de la microbiota oral para afectar el desarrollo de *H. pylori* mediante la producción de proteínas inhibidoras similares a bactericidas contra cepas de *H. pylori*.
- Efecto de la levadura que protege *H. pylori* de las condiciones de estrés en la boca llevándola al tracto gastrointestinal humano.
- La corta vida de *H. pylori* en la cavidad oral después de la alta concentración de oxígeno en esta ubicación.

En la determinación del antígeno en saliva mediante el método ELISA en el presente estudio se obtuvo una sensibilidad del 86% y especificidad del 44%, se debe considerar que la detección del antígeno en saliva aún está en estudio, ya que no existe un estándar de oro aplicable en este tipo de muestras. Tampoco se encontraron otros estudios en los cuales hayan determinado la presencia del antígeno de *H. pylori* mediante el método ELISA. Muchos estudios han sugerido que el depósito principal para *H. pylori* es la cavidad oral, pero en general, los resultados han sido poco consistentes.

Se encontraron estudios en los cuales detectan la presencia de *H. pylori* en vía oral, mediante técnicas moleculares. Como ser Ismail et al (Ismail H., 2016) que desarrolló un nuevo ensayo de PCR anidada que se puede utilizar para identificar el ADN de *H. pylori* en muestras de placa dental. Estos autores informan de que esta nueva PCR anidada es tan sensible como las pruebas que se basan en la histología, y también puede ser útil cuando los

pacientes deben ser probados para *H. pylori*, pero no son capaces de someterse a exámenes endoscópicos. En el estudio de Ismail et al determinan el índice de validez que fue del 40,8% de la técnica de PCR anidada (Ismail H., 2016).

La detección de *H. pylori* en saliva aún no está claro, ya que en otros estudios al evaluar la presencia de esta bacteria en la saliva o la cavidad bucal mostraron datos contradictorios. (Veiga N, 2015; Ogaya Y, 2015; Zaric S, 2015) Además, no existe un estándar de oro aplicable en este tipo de muestras, y a pesar del uso de PCR o PCR anidada en algunos estudios la detección de esta bacteria es raro y varía de 0% a 1,9%.

Hay una gran variabilidad en las tasas de frecuencia de *H. pylori* en cavidad oral descritas en la literatura. Estas diferencias podrían explicarse por variaciones en los datos demográficos de la muestra, el uso de diferentes procedimientos de muestreo y métodos de detección, estados de salud oral de los pacientes, las diferencias en los estados de infección de *H. pylori*, el tipo y número de muestras clínicas utilizadas, y diferentes complejidades entre la microbiota de las muestras orales utilizados en los estudios.

También se debe tener en cuenta que el flujo de saliva disminuye a la edad de 50 años y más (Billings RJ, 1996), esto puede influir en el desarrollo de *H. pylori* en cavidad oral, obteniendo falsos negativos en los pacientes mayores de 50 años.

## 11. CONCLUSIÓN

- Se determinó la concordancia entre los métodos de diagnóstico: ELISA Ac anti *H. pylori* IgG e IgM, ELISA detección del antígeno en heces, Western Blot IgG anti *H. pylori*, la técnica PCR en muestra de heces; ante el test de ureasa, obteniendo una fuerza de concordancia moderada y mediana. Siendo significativa la concordancia entre los métodos ELISA, Western blot y PCR ante el test de ureasa.

- Se determinaron los valores de sensibilidad (93%, 52% y 80% del método ELISA IgG, IgM anti *H. pylori* y antígeno en heces, respectivamente), especificidad (53%, 64% y 67% del método ELISA IgG, IgM anti *H. pylori* y antígeno en heces, respectivamente) y valores predictivos del Ensayo inmunoenzimático (ELISA) a partir de los resultados obtenidos mediante el test de ureasa.

- Se determinaron los valores de sensibilidad (96%), especificidad (17%) y valores predictivos del Western Blot IgG anti *H. pylori*, a partir de los resultados obtenidos mediante el test de ureasa.

- Se determinaron los valores de sensibilidad (75%), especificidad (46%) y valores predictivos de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de heces, utilizando los resultados obtenidos en el test de ureasa.

- Se evaluó la detección de antígeno específico de *H. pylori* en saliva mediante el método ELISA, obteniendo los valores de sensibilidad (44%) y especificidad (86%) ante el test de ureasa. Se evaluó la detección de anticuerpos anti *H. pylori* en muestras de saliva mediante el método de Western Blot IgG anti *H. pylori*, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 33% y 71% respectivamente ante el test de ureasa.

Este estudio demostró que los métodos: ELISA, Western blot y PCR poseen una alta sensibilidad, siendo de fácil manejo para el paciente en la toma de muestra, pueden ser aplicados en estudios a población en general. También mencionar que el método ELISA y Western blot son de fácil manejo en el laboratorio.

Se concluye que estos métodos son de gran utilidad para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. El diagnóstico de la infección por *H. pylori* no debe basarse en una solo método de diagnóstico, siempre debe ir acompañado de la clínica y estudios que el medico vea conveniente solicitar. Con los datos obtenidos se demuestra que no es necesario recurrir a la endoscopia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

## **RECOMENACIONES**

La técnica de PCR para la detección de *H. pylori* es conveniente en estudios de investigación. Debido a los costos y el requerimiento de ambientes especiales, no es posible aplicarla como método de diagnóstico la técnica de PCR en niveles de atención primaria y secundaria.

Los métodos para la detección del antígeno de *H. pylori* o del anticuerpo anti *H. pylori* en muestras de saliva aún está en estudio, los datos obtenidos en este estudio son un paso inicial en la aplicación de este tipo de muestra para el diagnóstico de *H. pylori* en nuestro medio.

El test de ureasa es una técnica utilizada de forma rutinaria para el diagnóstico de esta infección, con los datos obtenidos en este estudio, se puede reemplazar este test de ureasa por métodos de laboratorio, para el apoyo del diagnóstico de infección por esta bacteria.



## 12. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, T. e. (2009). Prevalence of *Helicobacter pylori* pathogenicity-associated *cagA* and *vacA* genotypes among Pakistani dyspeptic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* , 55(1):34-8.
- Alarcón T. (1994). Diagnóstico microbiológico de la infección producida por *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol.*, 6:37-41.
- Alba RS., T. R. (2006). HELICOBACTER PYLORI: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* , N° 158 – Junio .
- Andres, S. E. (2010). *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* , 61(2):168-78.
- Antonio-Rincon, F. E. (2011). Pathogenicity island *cag*, *vacA* and IS605 genotypes in Mexican strains of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcers. . *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 10:18.
- Añez M., R. G. (2006). SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE UREASA (CLOTEST), HISTOLOGÍA DE MUCOSAGÁSTRICA, SEROLOGÍA, CULTIVO Y PCR EN LA IDENTIFICACIÓN DEL HELICOBACTER PYLORI. *Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología*, 96-104.
- Armstrong JA, C. M. (1991). Influence of soluble haemagglutinins on adherence of *Helicobacter pylori* to Hep-2 cells. *J Med Microbiol* , 34:181-7.
- Arozamena C J., G. L. (2002). Estómago y Duodeno. En: Ferráina P, Oría A. . *Cirugía de Michans. 5a ed. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo* , 705-759.
- Atherton, J. a. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* , 119(9):2475-87.
- Azuma, T. e. (1998). The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer.* , 82(6):1013-8.
- Ballam L., M. M. (2000). Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, 53:314–317.
- Baron S. (1996). *Medical Microbiology "Campylobacter and Helicobacter"*. Samuel Baron.
- Belkind J., B. G. (2001). “Incidencia de infección por *Helicobacter pylori* en una cohorte de lactantes en el estado de Morelos”. *salud pública de méxico* 43, no. 2 , 122-126.

- Benaissa M, B. P. (1996). Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure, and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. . *Infect Immun* , 64:2331-25.
- Benitez V., A. C. (2002 ). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* asociada a gastritis en niños. . *Gastroenterol. Perú, Lima* , v. 22, n.2.
- Beswick, E. a. (2009). CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* , 15(23):2855-61.
- Bilbao P. E. (2006). *Estudio de la infección por Helicobacter pylori y evaluación de los métodos de diagnóstico laboratorial, en pacientes que acuden a consultas de gastroenterología en la clínica "Caja Petrolera de Salud" y el hospital "Arco Iris" de junio 2005 a abril 2006.* La Paz Bolivia.
- Billings RJ, P. H. (1996). Xerostomia and associated factors in a community-dwelling adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*, 24:312e6.
- Boonyanugomol, W. e. (2010). Role of cagA-Positive *Helicobacter pylori* on Cell Proliferation, Apoptosis, and Inflammation in Biliary Cells. . *Dig Dis Sci.* , 56(6):1682-92.
- Braden B., e. a. (2001). *Ann Med.* 2001 Mar; 33(2):91. Obtenido de DIA.PRO: <http://npt.ir/uploads/HPAG.CE.pdf>
- Bravo E., e. a. (2011). Utilidad del Test Rápido de Ureasa para la Detección de *Helicobacter pylori* en la Hemorragia Digestiva Alta por Úlcera Péptica. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 31-1: 17-20.
- Brizuela RA, F. C. (1999). *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa. . *Rev Cubana Med Milit.*, 28:5-8.
- Brooks G., C. K. (2010). *Microbiología Médica; Jawet, Melnick y Adelberg.* Mexico : McGraw-Hill.
- Cardenas VM, D. D. (2008). Evaluation of a novel stool native catalase antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic North American children. . *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* , 46:399-402.
- Chattopadhyay S., P. R. (2004). Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* , 2821–2824.
- Cho, S. e. (2009). Involvement of Ras and AP-1 in *Helicobacter pylori*-induced expression of COX-2 and iNOS in gastric epithelial AGS cells. *Dig Dis Sci.* , 55(4):988-96.

- Choe, Y. e. (2001). A possible relation of the Helicobacter pylori pfr gene to iron deficiency anemia? . *Helicobacter.*, 6(1):55-9.
- Chomvarin C, K. P. (2006). Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsies. . *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* , 37:1163-1169.
- Chou CH, S. B. (1997). Clinical assessment of the bacterial load of Helicobacter pylori on gastric mucosa by a new multi-scaled rapid urease test. *J. Gastroenterol Hepatol.* , 12 :1-6.
- CICB, P. (2012). *Epidemiología, herramientas y Gold Standard*. Obtenido de PORTAFOLIO CICB: <http://odontomoya.webnode.cl/desarrollo-caso-clinico-n%C2%B02/desarrollo-de-temas-y-conceptos/epidemiologia/>
- Clayton C, K. K. (1991). Detection and identification of Helicobacter pylori by the polymerase chain reaction. . *J Clin Pathol* , 44: 515-516.
- Córdova M., G. R. (2011 ). Detection of the glmM Gene in Helicobacter pylori Isolates with a Novel Primer by PCR. *J Clin Microbiol.* , Apr; 49(4): 1650-1652.
- Corrales HJ. (2006). Incidencia de infección por Helicobacter Pylori en universitarios de 3ro y 4to año de la Carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UTO gestión 2006 Oruro. *Revista medcis.*
- Diaz C. (21 de Enero de 2012). *Pruebas diagnosticas Medidas de asociación*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/cristiandiazv/pruebas-diagnosticas-11196171>.
- Díaz L., T. L. (2009). Techniques used for the Helicobacter pylori infection detection. *Revista Cubana de Medicina* , Vol.48 No.1 pp.unpaginated ref.69 .
- Díaz U., O. W. (2013). Helicobacter pylori y enfermedades hematológicas. *Rev Col Gastroenterol* , vol.28 no.4 Bogotá Oct./Dec.
- Division of Bacterial and Mycotic Diseases.* . (27 de marzo de 2006). Obtenido de Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. Center for disease control and prevention [en línea] : <http://www.cdc.gov/ulcer/>
- Dzierzanowska-Fangrat K, P. L. (2006). El diagnóstico de la infección por Helicobacter pylori Helicobacter . 11: 6-13.
- Eugenia Ma., Q. G. (2000). Inmunoglobulina G Anti Helicobacter Pylori por Elisa y Western-blot en pacientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital San Vicente de Paúl Heredia. *Acta méd. costarric*, 42.

- Faigel DO, F. E. (1996). Histological predictors of active *Helicobacter pylori* infection. . *Dig Dis Sci.*, 41:937-43.
- Fallone, C. A., Cleland, P., Thompson, J. A., Wild, G. E., Lough, J., Faria, J., & Barkun, A. N. (1996). Detección de la infección por *Helicobacter pylori* por prueba de IgG de Saliva. *American Journal of Gastroenterology.* , 91:1145-1149.
- Fawcett PT, V. K. (2004). Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiol.* , 4:5-10.
- Fernandez-Banares, F. H. (2009). A short review of malabsorption and anemia. . *World J Gastroenterol.* 2009;15(37):4644-52, 15(37):4644-52.
- Fuentes Pananá, E. M. (2009). Infección, inflamación y cáncer gástrico. . *Salud pública de México.* , 51(5):427-433.
- Gartner, L. a. (2001). *Texto atlas de histología.* México: McGraw Hill.
- Gatta L, R. C. (2003). Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect*, 9:489-96.
- Gisbert JP, d. I. (2006). Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. . *Am J Gastroenterol.* , 101:1921-30.
- Glupczynski Y. (1998). Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. *Br Med Bull.*, 54 :175–186.
- Godon J., Z. E. (1997). Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2802–2813.
- González CG, S. C. (2007 ). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. . *Rev Med Chile* , 135:182-188.
- González MJE, L. V. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedad. *Revista Alergia México* , 51 ( 6): 218 – 25.
- Graham DY, R. R. (1999). Scope and consequences of peptic ulcer disease. How important is asymptomatic *Helicobacter pylori* infection? *Postgrad Med* , 105: 100-110.
- Group., E. S. (2002). Risk factors for atrophic chronic gastritis in a European population: results of the Eurohepygast study. *Gut* , 50: 779-785.

- Guarner J, N. K. (2010). Helicobacter pylori pruebas de diagnóstico en los niños: Revisión de la literatura desde 1999 hasta 2009. . *Eur J Pediatr* , 169: 15-25.
- Gutierrez C, O. (2001). La infección gástrica por helicobacter pylori modifica la secreción gástrica de ácido . *Rev Fac Med UN Col.*, 49(2):76-80.
- Habibullah CM, H. M. (2005). The endangered gastric pathogen Helicobacter pylori: to eradicate or not? . *Indian J Med Res.*, 122:93-5.
- Herbrink P., v. D. (2000; ). Los métodos serológicos para el diagnóstico de la infección por Helicobacter pylori y el seguimiento de la terapia de erradicación . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , 19:... 164-173 .
- Hiyama T., Y. M. (2009). Trend in Japanese malpractice litigation involving gastrointestinal endoscopy. *Am J Gastroenterol.* , 104:251—2.
- Hold, G. I. (2011). Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. . *Clin Dev Immunol.* , 2011:1-11.
- Hu HM, K. C. (2007). Evaluation of the two immunochromatographic methods for detecting urine and serum IgG antibodies to Helicobacter pylori and comparison of accuracy and clinical utility. . *Hepatogastroenterology.* , 54:119-23.
- Ismail H., M. C. (2016). A Newly Developed Nested PCR Assay for the Detection of Helicobacter pylori in the Oral Cavity. *J Clin Gastroenterol* , 50: 17-22.
- Jeon, B. e. (2004). Polymorphism of the Helicobacter pylori feoB gene in Korea: a possible relation with iron deficiency anemia? . *Helicobacter.* , 9(4):330-4.
- Kato S, T. T. (2001). Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Helicobacter pylori infection in children. . *Pediatrics.*, 107:E87.
- Kignel S, d. A. (2005). Occurrence of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. . *Oral Dis.*, 11:17-21.
- Kindermann A, K. N. (2001). Evaluation of two commercial enzyme immunoassays, testing immunoglobulin G/IgG) and IgA responses, for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. . *J Clin Microbiol* , 39: 3591-6.
- Koletzko S. (2005). Noninvasive diagnostic tests for Helicobacter pylori infection in children. . *Can J Gastroenterol.*, 19 :433—439.
- Kolts BE, J. B. (1993). Helicobacter pylori detection: a quality and cost analysis. . *Am J Gastroenterol.* , 88:650-5.

- Konturek SJ, K. P. (2005 ). From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Novel prize for achievements in gastroenterology. *Physiol Pharmacol* , 56 ( 4 ): 507 – 30.
- Krajden, S. F. (1989 ). El examen de las Biopsias de estómago humano, la saliva y la placa dental por *Campylobacter pylori* . . *J Clin Microbiol* . , 27 : 1397-98.
- Kumar S., B. C. (2014 ). Diagnosis of *Helicobacter pylori* What should be the gold standar . *Mundial J Gastroenterol.* , 20 (36): 12.847-12.859.
- Kumar, V. A. (2005). *Estómago, in Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional.* Madrid: Elsevier.
- Kusters JG, G. M.-G. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. . *Infect Immun* , 65:3672-3.
- Laine L, E. R. (1997). Randomized comparison of ranitidine bismuth citrate-based triple therapies for *Helicobacter pylori*. . *Am J Gastroenterol.* , 92:2213-5.
- Lin, W. e. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. . *Cancer Res.* , 70(14):5740-8.
- Logan R. (1995). Urea breath test for detection of *helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 5:S46-S49.
- Logan, R. (1996). Logan RPH. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 10 (suppl):3-15.
- Lopez M., M. E. (1993). Seguimiento de la respuesta serológica cuantitativa al tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Enf Infecc Microbiol Clin*, 11 (1):33-35.
- M. Luján Sanchís, S. P. (2000.). Detección del antígeno de *H. pylori* en muestras fecales en pacientes con úlcera péptica para el diagnóstico y seguimiento de la infección. *Rev Sdad Valenciana Patol Dig* , 19(1):9-14.
- Madinier I, F. T. (1997). Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. . *J Periodontol* , 68:2-6.
- Mahdavi, J. e. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. . *Science.* , 297(5581):573-8.
- Malfertheiner P, M. F. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection: the-Maastricht IV/ Florence Consensus Report. . *Gut*, 61:646-664.

- Mandado S, G. B.-C. (2003). Diagnóstico morfológico de *Helicobacter pylori* mediante citología gástrica por cepillado. . *Rev Cubana Med.* , 42:27-33.
- Marin J. (23 de Septiembre de 2013). *Sociedad Madrileña de Medicina de Familia*. Obtenido de <https://grupoinfeccsomamfyc.wordpress.com/2013/09/23/deteccion-antigeno-helicobacter-pylori-heces/>
- Marques S., T. L. (2016). *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* , 6; 7(1): 126-132.
- Martínez L., G. B. (2016). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante serología, histología y cultivo. *Revista Cubana de Medicina Militar.* , 45(3).
- Mattana C., V. A. (2004). Perfil serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en la población de San Luis (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4):227-9.
- McColl, K. (2010). Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. . *N Engl J Med.* , 362(17):1597-604.
- McNulty CAM, L. P. (2011). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. . *Helicobacter; 16 (Suppl.1)* , 10-18.
- Megraud F., (1998). Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. . *Br Med Bull*, 54(1): 207-216.
- Megraud F, L. P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. . *Clin Microbiol Rev.* , 20:280-322.
- Megraud F. (2005). Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. *J Pediatr.*, 146:198-203.
- Misra V, M. S. (2007). Prevalence of *H. pylori* in patients with gastric cancer. . *Indian J Pathol Microbiol* , 50: 702-707.
- Momtaz H, S. N. (2012). Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol*, 18 (2105-2111 ), 18: 2105-2111.
- Monteiro L., D. M. (2001). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol*, 96: 353-8.
- Morales A., H. C. (2002). Prueba de Elisa en deposición para detectar la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Méd Chile* , 130: 61-5.

- Morales EMR, C. R. (07 de Enero de 2016). *Facultad de Medicina UNAM*. Obtenido de Helicobacter pylori Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana: [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/capitulo\\_15/capitulo.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/capitulo_15/capitulo.pdf)
- Mounia E., S. A.-A. (2008). Detección de Helicobacter pylori antígeno ureasa en la saliva en pacientes con diferentes gástrico H. estado pylori. *J Med Microbiol.* , 57:1553-9.
- Mullis K., F. F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. . *Methods Enzymol*, 155:335-50.
- Munari, F. e. (2011). Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. . *Blood.* , 117(24):6612-6.
- Ogaya Y, N. R. (2015). Detection of Helicobacter pylori DNA in inflamed dental pulp specimens from Japanese children and adolescents. . *J Med Microbiol* , 64:117e23.
- Olmos JA, R. H. (2000). Prevalence of Helicobacter pylori infection in Argentina results of a nation wide epidemiologic study. Argentinean H. pylori epidemiologic study. . *J Clin Gastroenterol* , 31:33-7.
- Online NIH., C. S. (2004). Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. *NIH Consensus Statement Online*, 7–9;12(1):1-23.
- Osawa, H. (2008). Ghrelin and Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol.* , 14(41):6327-33.
- Parente F, B. P. (2001). The (13)C-urea breath test for non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection: which procedure and which measuring equipment? . *Eur J Gastroenterol Hepatol.* , 13 :803–806.
- Park CY, C. Y. (2002). New serological assay for detection of putative Helicobacter pylori virulence factors. . *J Clin Microbiol.* , 40:4753-6.
- Park, S. e. (2001). Relevance of vacA genotypes of Helicobacter pylori to cagA status and its clinical outcome. . *Korean J Intern Med.* , 16(1):8-13.
- Parsonnet J, S. H. (1999). Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults. . *JAMA.* , 282:2240-5.
- Patel SK, P. C. (2013). Pseudomonas fluorescens-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. *World J Gastroenterol.* , 19 :1056–1067.
- Paul Harris D., C. S. (2005). Serological diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. *Rev Chil Pediatr* , 76 (3); 241-251.



- Pazos A., O. N. (2002). FIABILIDAD DEL PCR ANIDADO DEL GENE ureC PARA DIAGNOSTICO DE Helicobacter pylori EN MUCOSA GÁSTRICA DE NIÑOS MENORES DE 10 AÑOS. *Universidad del Valle y COLCIENCIAS, Colombia*, 1106-04-11986.
- Perri, F. e. (2002). HLA-DQA1 and -DQB1 genes and Helicobacter pylori infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. . *Tissue Antigens.*, 59(1):55-7.
- Pinheiro, P. (30 de Octubre de 2015). *MD. Saúde*. Obtenido de HELICOBACTER PYLORI – Síntomas y Tratamiento: <http://www.mdsaude.com/es/2015/10/helicobacter-pylori.html>
- Pride, D. R. (2001). Allelic Variation within Helicobacter pylori babA and babB. . *Infect Immun.* , 69(2):1160-71.
- Quintana E., S. K. (2000). Inmunoglobulina G Anti Helicobacter pylori en ELISA y Western Blot en pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia . *Acta Medica Costarricense*, vol 42 n1.
- R.H. Hunt, S. X.-B. (2010). *Helicobacter pylori en los países en desarrollo*. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología.
- Raica M, G. A. (1996). Clinical value of Helicobacter pylori identification by histochemical methods in patients with chronic gastritis. . *Rom J Morphol Embryol.*, 42:117-21.
- Ramirez RA, C. A. (2003). Variación de la prevalencia del H. pyori en el Perú periodo 1985-2002, en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Rev. Gartroenterol. Perú* , 23 (2): 92-98.
- Ricaurte Guerrero, O. (1997). Patología de la infección por Helicobacter pylori. . *Rev Fac Med UN Col.* , 45(1):32-39.
- Rimbara E, S. M. (2013). PCR detection of Helicobacter pylori in clinical samples. *Methods Mol Biol* , 943: 279-287.
- Rodicio Mdel R, M. M. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 22:238-245.
- Romo González, C. a. (2010). Helicobacter pylori, un modelo de bacteria carcinogénica. . *Rev Esp Med Quir.* , 15(4):242-51.
- Rosebeck, S. P.-L. (2011). Protease activity of the API2-MALT1 fusion oncoprotein in MALT lymphoma development and treatment. *Future Oncol.* , 7(5):613-7.

- Rubin, E. e. (2006). *El aparato digestivo., in Patología estructural: fundamentos clinicopatológicos en medicina.* Barcelona: McGraw Hill.
- Ruiz R, H. A. (2013). Prevalencia de infección por H. pylori en una población de nivel socioeconómico medio y alto . *Rev Med La Paz*, 19(1): 35-39.
- Sabbi T, D. A. (2005). Efficacy of noninvasive tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection in pediatric patients. . *Arch Pediatr Adolesc Med.* , 159:238-41.
- Salech F., M. V. (2008). Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados. *Rev. méd. Chile v.136 n.9 Santiago* , 136: 1203-1208.
- Samitier RS, M. M. (2000). Enfermedades del estómago y del duodeno. En Farreras Valentí P y Rozman C. *Medicina Interna. 14a ed. Madrid, España: Harcourt*, vol 1: 132 – 180.
- Sato T, F. M. (1999). Endoscopic urease sensor system for detecting Helicobacter pylori on gastric mucosa. . *Gastrointest Endosc.* , 49 :32–38.
- Saxena, A. e. (2011). Virulence attributes of Helicobacter pylori isolates & their association with gastroduodenal disease. . *Indian J Med Res.* , 133(5):514-20.
- Schuman R, R. B. (1995). Diagnosis of Helicobacter pylori infection by the Lara system towards a simplified breath test. *Gastroenterology.* , 108:A921.
- Sharma SA, T. M. (1994). Characterization of gastric epithelial cell IL-8 induction by Helicobacter pylori. . *Am J Gastroenterol* , 89:A244.
- Siddique I, A.-M. K. ( 2008). Diagnosis of Helicobacter pylori: improving the sensitivity of CLOtest by increasing the number of gastric antral biopsies. . *J Clin Gastroenterol.*, 42:56-360.
- Sidebotham RL, B. J. (1995). Influence of blood group and secretor status on carbohydrate structures in human gastric mucins: implications for peptic ulcer. . *Clin Sci* , 89:405-15.
- Sierra Arango, F. a. (2001). *Helicobacter pylori: El holocausto revolucionario.* . Ediciones médicas Latinoamericanas.
- Sivapalasingam S., R. A. (2014). Recurrencia de la infección por Helicobacter pylori en niños y adultos bolivianos después de una estrategia basada en la población de "tratar y tratar". *Helicobacter. Epub*, 19 (5): 343-8.
- Stewart G, W. B. (1993). Helicobacter pylori infection: Microbiology of Helicobacter pylori. *Gastroenterol Clin North Am*, 22: 5-19.

- Strickland, R. a. (1973). *Monobind Inc.* Obtenido de 18:426,1973:  
[http://www.iqnea.pe/insertos/B4-6%20Anti-H%20Pylori%20AccuBind%20ELISA%20\(14-16\)%20Rev%204-Spanish.pdf](http://www.iqnea.pe/insertos/B4-6%20Anti-H%20Pylori%20AccuBind%20ELISA%20(14-16)%20Rev%204-Spanish.pdf)
- Takehima, E. e. (2009). Helicobacter pylori-induced interleukin-12 p40 expression. . *Infect Immun.* , 77(4):1337-48.
- Talley NJ., F. K. (2008). Gastric Cancer Consensus conference recommends Helicobacter pylori screening and treatment in asymptomatic persons from high-risk populations to prevent gastric cancer. . *Am J Gastroenterology*, 103 (3):510-4.
- Testerman TL, C. P. (2006). Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of Helicobacter species in chemically defined media. *J Clin Microbiol.* , 44:1650-1658.
- Tijerina R., B. F. (2002). Validación del Western Blot para la detección del genotipo de Helicobacter pylori. *Medicina Universitaria*, 4 (17):212-6.
- Toller, I. e. (2011). Carcinogenic bacterial pathogen Helicobacter pylori triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. . *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 108(36):14944-9.
- Tomb, J. e. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. . *Nature.* , 388(6642):539-47.
- Treepongkaruna S., N. S. (2006). A Rapid Serologic Test and Immunoblotting for the Detection of Helicobacter pylori Infection in Children. . *J. Trop. Pediatr.*
- Ueda J, O. M. (2014). Diagnostic accuracy of the E-plate serum antibody test kit in detecting Helicobacter pylori infection among Japanese children. *J. Epidemiol* , 24( 47-51 ), 24: 47-51.
- Us D, E. D. (2002 ). Evaluation of western blot methods for serologic diagnosis of Helicobacter pylori infections. *Mikrobiyol Bul.* , 36(2):153-60.
- V., T. (2007). Methylene blue staining of gastric tissue for the identification of Helicobacter pylori. . *South Asian J Trop Med Public Health.*, 38:78-81.
- Vaira D, M. P. (1999). Diagnosis of Helicobacter pylori infection by HpSA test. European Helicobacter pylori HpSA Study. *Group. Lancet.* , 354:1732.
- Valmaseda T, G. J. (2002). Helicobacter pylori CagA antibodies in various gastroduodenal diseases from 2 different populations. . *Med Clin (Barc.)*, 118:90-3.

- Van der Hulst R., V. S. (1996). Effect of specimen collection techniques, transport media and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15:211-215.
- Van KN, V. H. (2006). Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies. *Neth J Med.* , 64:329-33.
- Veiga N, P. C. ( 2015). Oral and gastric *Helicobacter pylori*: effects and associations. *PLoS One*, 10:e0126923.
- Vilaichone R.K., M. V. (2003). Relation between seroreactivity to low-molecular-weight *Helicobacter pylori*-specific antigens and disease presentation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 10:1025-1028.
- Voland P., W. D. (2002.). Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 533-544.
- W., K. (2006). Evaluation of the motility indole urease (MIU) test to detect *Helicobacter pylori* infection. *South Asian J Trop Med Public Health.*, 37:966-9.
- Waidner, B. e. (2002). Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun.* , 70(7):3923-9.
- Walker NN, C. J. (2006). *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of duodenal ulceration. *Annals New York academy of sciences*, 859: 96-111.
- Wang SW, Y. F. (2003). The clinical utility of string-PCR test in diagnosing *Helicobacter pylori* infection. *Hepatogastroenterology*, 50: 1208-1213.
- Wang Y. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* , 28; 21(40): 11221-11235.
- Warren, B. J. (2005). for their discovery of the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 awarded.*
- Watanabe, Y. e. (2006). HLA-DQB1 locus and gastric cancer in *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol.*, 21(2):420-4.
- Wesolowska A., B. M. (2014,). Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome* , 2:19.

- Wong WM., W. B. (2002). An evaluation of a rapid urine test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the Chinese population. . *Aliment Pharmacol Ther* , 16:813e7.
- Yamaoka Y, .. (2008). Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J Infect Dev Ctries.*, 2(3):174-81.
- Yamaoka Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol. J Infect Dev Ctries.*, 7(11):629-41.
- Yamaoka, Y. (2008). Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. . *World J Gastroenterol.* , 14(27):4265-72.
- Yin, M. e. (2009). Molecular epidemiology of genetic susceptibility to gastric cancer: focus on single nucleotide polymorphisms in gastric carcinogenesis. . *Am J Transl Res.* , 1(1):44-54.
- Yunoki N., Y. K. (2000). Antibody to Heat Shock Protein Can Be Used for Early Serological Monitoring of *Helicobacter pylori* Eradication Treatment. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 574-577.
- Zalewska-Ziob, M. e. (2009). TNF-alpha expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent *Helicobacter pylori* strains. . *Med Sci Monit.* , 15(6):BR166-71.
- Zaric S, B. B. (2015). Eradication of gastric *Helicobacter pylori* ameliorates halitosis and tongue coating. *J Contemp Dent Pract* , 16:205e9.
- Zhernakova, N. (2009). Clinical manifestations of *Helicobacter pylori*-induced ulcer disease in elderly patients. . *Klin Med (Mosk).* , 87(4):44-6.

## **ANEXO 1. Consentimiento informado**

**Título del protocolo:** ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE LABORATORIO: PCR, SEROLOGÍA, WESTERN BLOT Y DETECCIÓN DEL ANTÍGENO; PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*, A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES, SUERO Y SALIVA.

**Investigador principal:** Sandra Parisaca Mamani

**Sede donde se realizará el estudio:** Instituto SELADIS

**Nombre del paciente:** \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

### **1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.**

Una de las prioridades en la investigación para el diagnóstico de infecciones por *H. pylori* es contar con técnicas de diagnóstico de bajo costo, baja complejidad en la toma de muestra, con una alta sensibilidad y especificidad, técnicas universalizables y aplicables en niveles de atención primaria y secundaria.

Existen diferentes tipos de pruebas de laboratorio, podemos mencionar: Serología es una técnica poco invasiva, fácil de realizar, reproducible, económica y ampliamente empleada en estudios epidemiológicos.

La detección del antígeno de *H. pylori* en heces, tiene la ventaja de ser no invasiva, por lo cual muy útil para el diagnóstico en pacientes de cualquier edad, sobre todo en niños.

El método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); presenta una gran especificidad y sensibilidad, además nos permite detectar directamente al microorganismo en diferentes muestras clínicas, como ser muestra de heces o de saliva. El Western Blot es útil para evaluar la presencia de anticuerpos frente al antígeno de forma específica, incluyendo los factores de virulencia.

Por lo mencionado se justifica la necesidad de comparar estos métodos de diagnóstico en nuestro medio, con el objetivo de poder brindar a la población opciones de métodos de diagnóstico para la infecciones por *H. pylori*, métodos de bajo costo.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

- El objetivo de este estudio de investigación es: Comparar métodos de laboratorio: PCR, Serología, Western Blot y Detección del antígeno, para el diagnóstico de infección por *H. pylori* a partir de muestras de heces, suero y saliva.

## **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio pretende conocer que prueba nos ayudara a distinguir de forma clara entre infectados y no infectados por *H. pylori*, de forma paralela también podremos evaluar qué tipo de muestra es óptima para establecer un correcto diagnóstico de esta infección.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido en cuanto un óptimo tipo de muestra y métodos para el diagnóstico de infecciones por *H. pylori*.

## **4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, y se le solicitará una muestra de heces, muestra de saliva y además se le tomara una muestra de sangre (en ayunas)

## **5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Este estudio consta de dos fases:

La primera implica la entrega de la muestra de heces, la cual debe ser recolectada en un frasco de boca ancha, no guardada más de 2 horas.

En la segunda fase se le tomara una muestra de saliva, y se proseguirá con la toma de muestra de sangre, en ayunas. Posterior a la toma de sangre, se puede presentar dolor o se puede llegar a formar una equimosis o morete en el lugar de la punción.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará.

## **6. ACLARACIONES**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o del padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

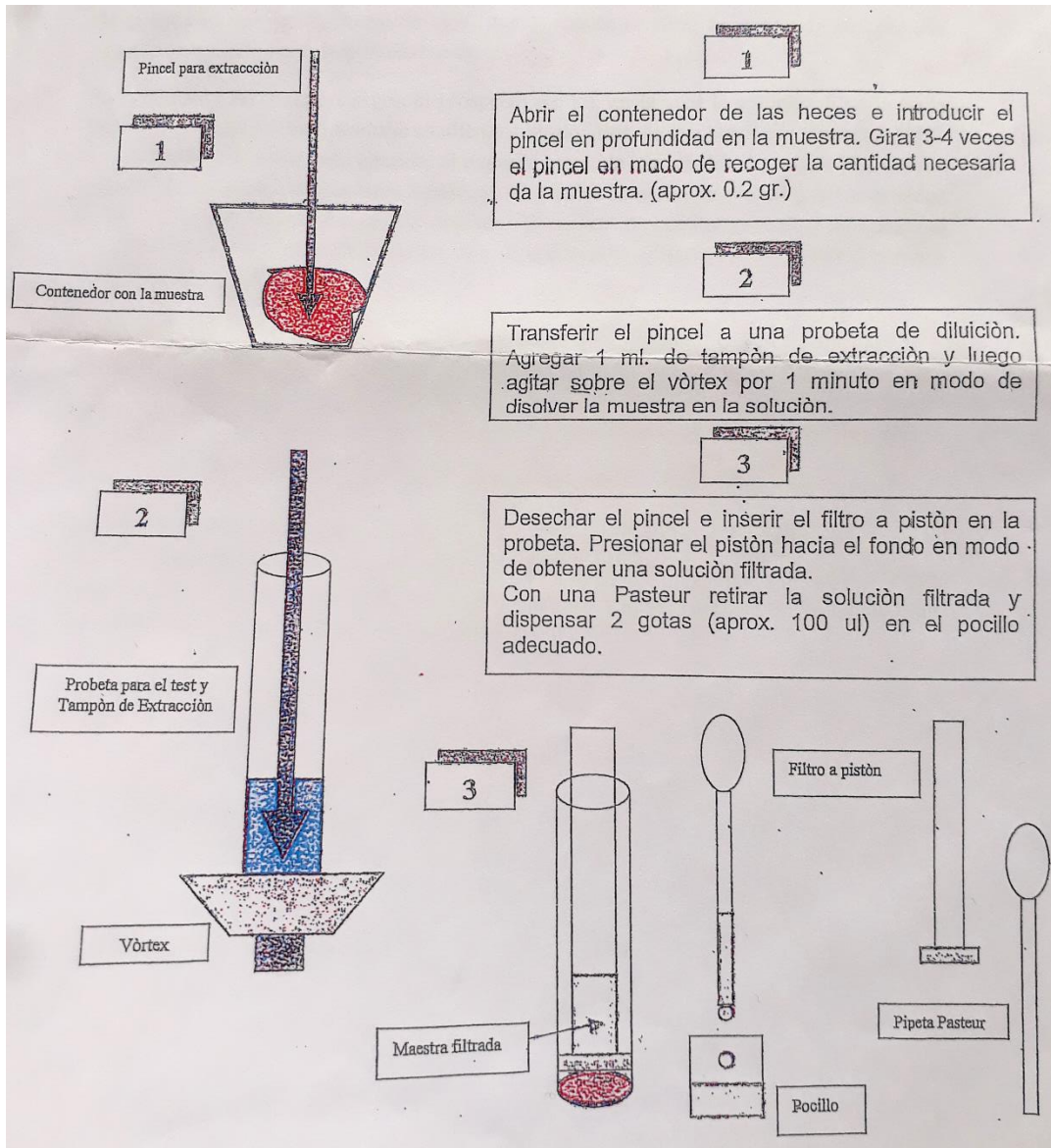
Firma del investigador

---

Fecha

**Anexo 2.** Instructivo del kit de extracción de las heces



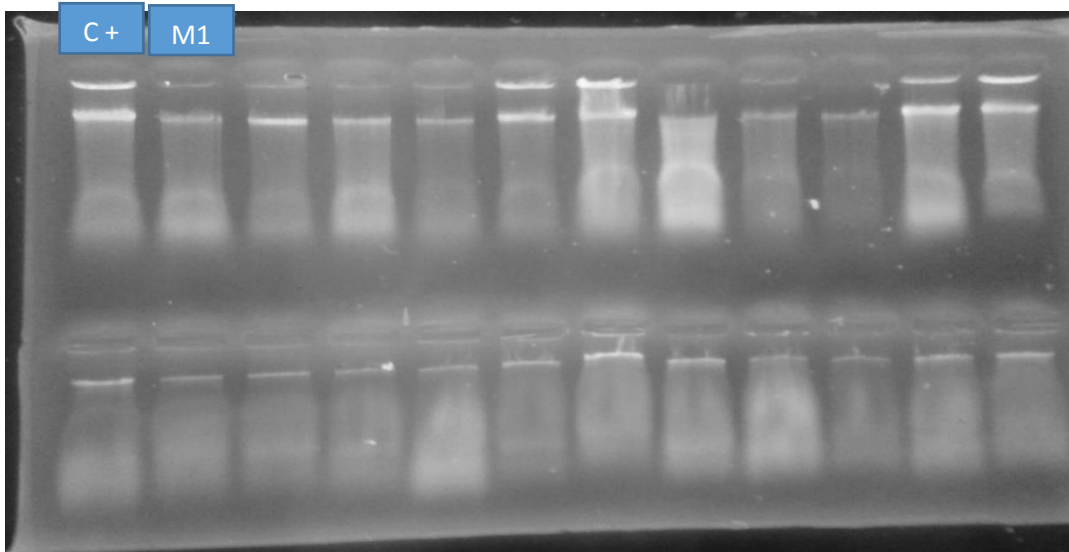


### Anexo 3. Tipo de muestras recolectadas por cada paciente

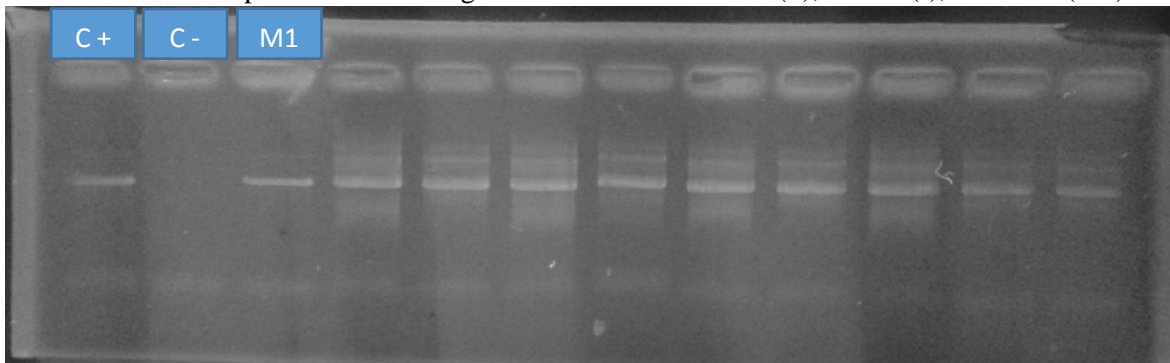
N° de paciente	Edad	muestra de sangre	muestra de saliva	muestra de heces	N° de paciente	Edad	muestra de sangre	muestra de saliva	muestra de heces	N° de paciente	Edad	muestra de sangre	muestra de saliva	muestra de heces
1	28	x	x	x	33	60	x	x	x	65	47	x	x	-
2	69	x	x	x	34	42	x	x	-	66	67	x	x	x
3	60	x	x	x	35	40	x	x	x	67	25	x	x	-
4	65	x	x	x	36	51	x	x	-	68	46	x	x	x
5	27	x	x	x	37	57	x	x	x	69	53	x	x	x
6	65	x	x	x	38	24	x	x	x	70	56	x	x	x
7	47	x	x	x	39	47	x	x	x	71	63	x	-	-
8	23	x	x	x	40	30	x	x	-	72	46	x	x	-
9	37	x	x	x	41	45	x	x	x	73	47	x	x	x
10	69	x	x	x	42	50	x	x	-	74	44	x	x	x
11	49	x	x	x	43	64	x	x	x	75	44	x	x	x
12	70	x	x	x	44	43	x	x	x	76	25	x	x	-
13	50	x	x	x	45	60	x	x	x	77	28	x	x	x
14	45	x	x	x	46	35	x	x	x	78	20	x	x	-
15	62	x	x	x	47	52	x	x	x	79	52	x	x	x
16	52	x	x	x	48	50	x	x	x	80	58	x	x	x
17	31	x	x	-	49	65	x	x	-	81	63	x	x	x
18	52	x	x	x	50	20	x	x	x	82	52	x	x	x
19	24	x	x	x	51	63	x	x	x	83	50	x	x	x
20	40	x	x	x	52	42	x	x	-	84	41	x	x	x
21	32	x	x	-	53	31	x	x	x	85	40	x	x	-
22	28	x	x	-	54	29	x	x	x	86	55	x	x	x
23	53	x	x	x	55	39	x	x	x	87	61	x	x	x
24	34	x	x	-	56	59	x	x	x	88	64	x	x	-
25	28	x	x	x	57	49	x	x	x	89	60	x	x	x
26	42	x	x	x	58	53	x	x	x	90	18	x	x	x
27	67	x	x	x	59	58	x	x	x	91	20	x	x	x
28	20	x	x	x	60	41	x	x	x	92	56	x	x	x
29	52	x	x	x	61	36	x	x	x	93	28	x	x	x
30	26	x	x	x	62	44	x	x	x	94	69	x	x	x
31	20	x	x	x	63	60	x	x	x	TOTAL		94	93	76
32	61	x	x	x	64	42	x	x	x					

**Anexo 4.** Extracción del material genético y Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Extracción del material genético en muestras de heces control (+), muestras (M1)



- PCR FD1 a partir del material genético obtenido: control (+), control (-), muestras (M1)



- PCR nested para la detección de *H. pylori* : control (+), control (-), muestras (M1)

