



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Helicobacter pylori*.
REPRODUCCIÓN DEL MODELO ANIMAL EN RATONES Y ESTUDIO
DE LOS MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN



Julián Gómez Martínez
Barcelona, 2001

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
SANITARIAS
FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Helicobacter pylori*.
REPRODUCCIÓN DEL MODELO ANIMAL EN RATONES Y ESTUDIO DE LOS
MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por
Julián Gómez Martínez

Director de Tesis Doctoral: M^a. Teresa Jiménez de Anta Losada

Barcelona, Mayo de 2001

ABREVIATURAS

Acetil-CoA : acetil-coenzima A

ADN : ácido desoxirribonucleico

AINEs : antiinflamatorios no esteroideos

ARN : ácido ribonucleico

ATPasa : adenosinatrifosfatasa

cagA : gen asociado a la citotoxina

CagA : proteína codificada por el gen *cagA*

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FDA : Food and Drug Administration

HLA : antígeno de histocompatibilidad

ICAM : molécula de adhesión intercelular

iceA : gen inducido por contacto con el epitelio

Ig : inmunoglobulina

IL-1 : Interleucina-1

IL-6 : Interleucina-6

IL-8 : Interleucina-8

kb : kilo bases

kDa : kilo Dalton

MALT : linfoma asociado a la mucosa gástrica

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

PAF : factor activador plaquetario

PAI : isla de patogenicidad

PCR : reacción en cadena de la polimerasa

TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa

tox : citotoxina

Urea - C¹³ : test del aliento con carbono ¹³

Urea - C¹⁴ : test del aliento con carbono ¹⁴

vacA : gen que codifica para la citotoxina vacuolizante

VacA : proteína codificada por el gen *vacA*

ABSTRACT

Caracterización molecular de cepas de *Helicobacter pylori* . Reproducción del modelo animal en ratones y estudio de los mecanismos de la inflamación.

Fundamento

A raíz del descubrimiento de *Helicobacter pylori*, hemos asistido a una revolución en la práctica de la medicina. Las consecuencias de esta infección son enfermedades como úlcera péptica, gastritis crónica, adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT. El carácter crónico así como la elevada incidencia de la infección, han despertado en los últimos años un gran interés científico.

Objetivos

- 1.-Estudiar la influencia del método utilizado en la esterilización de las pinzas de biopsia endoscópicas en el rendimiento del cultivo de *H. pylori*.
- 2.-Caracterizar molecularmente las cepas de *H. pylori* aisladas de muestras clínicas para los genes *vacA* y subtipos, *cagA* y estudiar su asociación con el efecto citotóxico.
- 3.-Reproducir el modelo animal de infección por *H. pylori* en ratones.
- 4.-Estudiar mediante microscopía intravital, los mecanismos de la inflamación en la infección crónica en el modelo experimental.

Resultados

La sensibilidad del cultivo es independiente de la técnica de esterilización utilizada para las pinzas de biopsia. Existe gran diversidad entre el genotipo de las cepas aisladas en nuestro entorno. Todas las cepas presentan el gen *vacA* y aproximadamente la mitad el *cagA*. Todas las cepas citotóxicas son *cagA* +, del subtipo *vacA* s1/m1 y corresponden a enfermos con úlcera péptica. El modelo animal reproduce la patología gastroduodenal observada en el hombre. La infección induce la aparición del fenómeno de rodamiento leucocitario (“*rolling*”) y la formación de agregados leucocito-plaquetarios en la microcirculación gástrica del modelo experimental. Pacientes con infección por *H. pylori* también muestran el fenómeno de agregación plaquetar, lo que constituye un nexo de unión entre la fisiopatología de la infección y la cardiopatía isquémica.

Genotype characterization of *Helicobacter pylori* strains. Mouse model development and study of the inflammatory response.

Background

Since discovery of *Helicobacter pylori*, we have seen a major revolution in the practice of medicine. The consequences of this infection are pathologies such as peptic ulcer, chronic gastritis, gastric cancer and gastric MALT lymphoma. Not only the chronicity of infection, but also its high prevalence, have motivated an exponential increase in research activity.

Objectives

- 1.- To study the influence of the different methodology used on biopsy forceps disinfection when culturing *H. pylori*.
- 2.- To genotype *H. pylori* strains by detecting *cagA*, *vacA* and its subtypes gens and their association with vacuolising activity.
- 3.- To develop an *H. pylori* mouse model infection.
- 4.- To analyse the inflammatory response on chronic animal model infection by intravital microscopy.

Results

Sensibility of culture is not related with biopsy forceps disinfection procedures. A high genetic diversity exists among strains in our environment. All strains present the *vacA* gen and 50 % approximately shows the *cagA*. Cytotoxic strains were *cagA* +, *vacA* subtype s1/m1 and were obtained from patients with peptic ulcer. The mouse model mimics the gastroduodenal pathology observed in humans. *H. pylori* infection induces a marked increase in the flux of rolling leukocytes and leukocyte-platelet aggregates in murine gastric venules. Circulating platelet aggregates were also detected in infected patients and represents a potentially link to coronary heart disease.

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. HISTORIA	2
2. MICROBIOLOGÍA	3
2.1. Genoma	4
2.2. Vías Metabólicas	6
3. EPIDEMIOLOGÍA	6
4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	8
4.1. Factores de virulencia	9
4.1.a. Inducción de la inflamación gástrica	9
• Interleucina-8	9
• Adherencia de los neutrófilos	9
• Factor de activación de las plaquetas	10
• Lipopolisacárido	10
• Ureasa	10
4.1.b. Alteración de la barrera mucosa gástrica ...	10
• Fosfolipasa	10
• Mucinasa	10
• Radicales libres de oxígeno	10
• Inducción de la óxido nítrico sintetasa ...	11
• Apoptosis	11
4.1.c. Alteración de la fisiología gástrica	10

4.2. Factores de mantenimiento	11
• Movilidad	11
• Catalasa y superóxido dismutasa	11
• Heat-shock proteins	11
• ATPasa	11
• Adhesinas	12
• Evasión a la inmunidad	12
5. MARCADORES DE PATOGENICIDAD	12
6. FISIOPATOLOGÍA	14
6.1. Anatomía Patológica	16
6.2. Cepas ulcerogénicas	18
7. CÁNCER GÁSTRICO	19
8. DIAGNÓSTICO	20
8.1. Cultivo microbiológico	21
8.2. Estudio histológico	21
8.3. Test rápido de la ureasa	22
8.4. Reacción en cadena de la polimerasa	22
8.5. Serología	22
8.6. Test del aliento	23
9. TRATAMIENTO	24
10. MODELO ANIMAL	27
11. VACUNA	28
III. OBJETIVOS	29
IV. RESULTADOS	30
• ARTÍCULO I	30
• ARTÍCULO II	34
• ARTÍCULO III	40
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	66
VII. BIBLIOGRAFÍA	68
VIII. DIRECCIONES DE INTERNET	80

I. PRESENTACIÓN

En las últimas dos décadas, a raíz del descubrimiento de *Helicobacter pylori*, hemos asistido a una verdadera revolución en el campo de la ciencia y en la práctica de la medicina.

Las primeras observaciones de microorganismos espirilados en la mucosa gástrica datan de finales del siglo pasado, pero no fue hasta 1982 cuando Warren y Marshall aislaron por primera vez *Helicobacter pylori* en biopsias de estómago de pacientes con gastritis crónica. Originalmente denominado *Campylobacter pyloridis*, en 1989 se reconoció que formaba parte de un nuevo género, *Helicobacter*.

H. pylori es un bacilo gram-negativo móvil, curvado, microaerófilo, de difícil aislamiento en medios de cultivo convencionales. Coloniza el estómago humano y la infección puede persistir asintomática durante décadas sin tratamiento, siendo el hombre su principal reservorio. Se cree que puede transmitirse por vía oral u orofecal y el riesgo de infección aumenta con la edad y el hacinamiento. Nuestro conocimiento sobre la patogénesis de la infección, patrón de transmisión, prevalencia... es todavía limitado, en parte debido a la falta, hasta no hace demasiado, de modelos experimentales válidos.

Su presencia se ha asociado con el concepto de patología crónica gastroduodenal, que incluye una amplia variedad de síndromes clínicos, básicamente gastritis y úlcera péptica. En el desarrollo de esta patología, se han involucrado además factores de tipo genético, psicológico, grupo sanguíneo, antígenos de histocompatibilidad, secreción endógena de ácido, ingesta de antiinflamatorios no esteroideos, tabaco, alcohol, café...

El carácter crónico y recidivante de la infección, así como su elevada incidencia en la población, han despertado en los últimos años un enorme interés científico.

II. INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA.

En 1982, tras las vacaciones de Pascua, una jarra de cultivo de larga incubación fue abierta en el Departamento de Microbiología del Royal Perth Hospital en Australia, revelando el crecimiento de una bacteria espirilada a partir de biopsias de pacientes con gastritis crónica. El primer cultivo de esta bacteria, observada al microscopio en preparaciones histológicas desde finales del siglo pasado pero jamás cultivada, se debió a los Drs. Robin Warren y Barry Marshall. Originariamente denominado *Campylobacter pyloridis*, pronto se separó de este género en base a estudios de secuenciación, adquiriendo la denominación definitiva de *Helicobacter pylori* en 1989 [Goodwin et al., 1989].

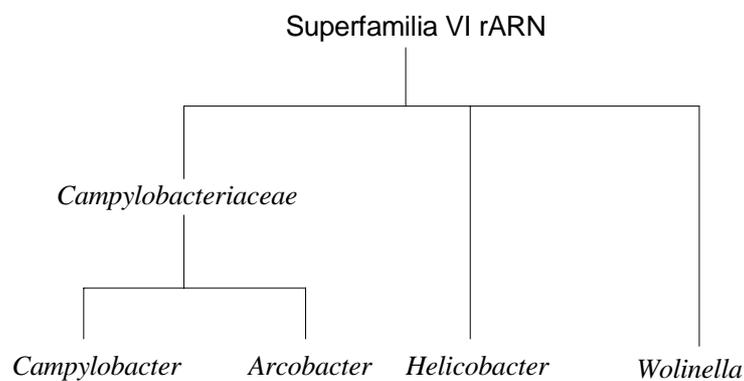


Figura 1.- Composición de la Superfamilia VI de rARN [Vandamme et al., 1991].

Este aislamiento revolucionó la gastroenterología y obligó a replantear muchos conceptos no sólo de la patología gastroduodenal, sino también de la fisiopatología gástrica. Los primeros congresos de los grupos de trabajo, resultaron auténticos esfuerzos por parte de los microbiólogos en su intento de convencer a los clínicos, un tanto escépticos, del protagonismo de *H. pylori* en la patología de la gastritis y la úlcera péptica. No fue hasta 1992, con la evidencia de que la triple terapia antibiótica curaba la úlcera péptica, que se aceptó el carácter infeccioso de ésta.

Actualmente sabemos que causa gastritis en la mitad de la población mundial y es el agente etiológico del 95 % de las úlceras duodenales, 70-80 % de las úlceras gástricas y tiene un protagonismo relevante en el 60-70 % de los casos de cáncer gástrico, que representa una de las neoplasias más frecuentes en todo el mundo [Blaser et al., 1987; Parsonnet et al., 1991]. La asociación con el linfoma gástrico de la mucosa gástrica tipo MALT, fue posterior [Bayerdörffer et al., 1995].

En unos años todas estas patologías, podrían ser meramente anecdóticas, si se pudiera erradicar esta infección de tan elevada prevalencia mundial, ya sea gracias al control de la vía de transmisión, la vacunación masiva eficaz, el tratamiento antibiótico de los casos infectados o una combinación de todos ellos. Nuestros esfuerzos deben ir en esta dirección, con la esperanza de que llegará el día en que nos plantearemos como eliminar los últimos aislamientos de *H. pylori* conservados en los laboratorios de referencia.

2. MICROBIOLOGÍA.

Helicobacter pylori es un bacilo gram-negativo móvil, de morfología espirilar y un tamaño de 2,5 a 5 µm, que crece lentamente a 37°C, pero no a 25°C, en condiciones de microaerofilia, en medios de cultivo con requerimientos nutricionales especiales. Es catalasa, oxidasa y ureasa positivo [Versalovic et al., 1999]. La morfología de sus colonias resulta característica por el pequeño tamaño de las mismas y su aspecto brillante. El crecimiento en medio líquido se ve favorecido por la agitación. Tras subcultivos

prolongados, aparecen las denominadas formas cocoides, metabólicamente activas pero inviabil para ser cultivadas de nuevo *in vitro* [Bode et al., 1993]. Posee de cuatro a seis flagelos de aproximadamente 30 μm de longitud.

2.1. Genoma.

En 1997, Tomb [Tomb et al, 1997] describió la secuencia completa del genoma de *Helicobacter pylori*. La secuencia se obtuvo por métodos de secuenciación randomizada, que previamente se habían utilizado en la obtención del genoma de *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* y *Methanococcus jannaschii*.

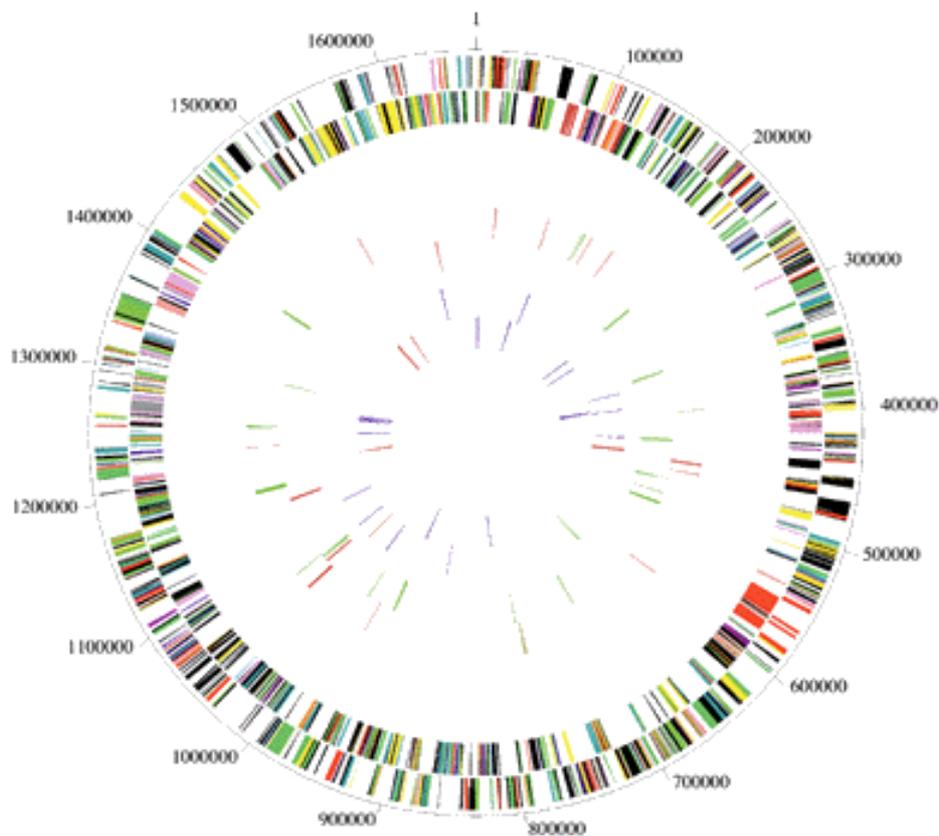


Figura 2.- Representación circular del cromosoma de *Helicobacter pylori* 26695

<http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html>

La cepa *Helicobacter pylori* 26695, aislada originalmente de un paciente de Reino Unido con gastritis, se escogió por su capacidad de colonizar cerdos y provocar en ellos una respuesta inmunitaria e inflamatoria. Se trata de una cepa toxigénica (*vacA* +), que presenta un genoma circular de 1.667.867 pares de bases y 1.590 genes, con un tamaño medio de 945 pares de bases cada uno, similar al observado en otras células procariontas. Más del 70 % de sus proteínas tenían un punto isoeléctrico mayor de 7.0, comparado con el 40 % de *H. influenzae* y *E. coli*. Los aminoácidos básicos -arginina y lisina- están presentes con una frecuencia doble en *H. pylori* respecto *H. influenzae* y *E. coli*, lo que quizás refleja su adaptación al medio gástrico ácido. De acuerdo con un nicho ecológico tan restrictivo, *H. pylori* presenta una gran capacidad de biosíntesis y reparación, en un intento por adaptarse al medio. La supervivencia en condiciones tan ácidas depende, en parte, de su habilidad para generar un potencial positivo intracitoplasmático en condiciones de bajo pH.

La patogenicidad de los aislamientos de *H. pylori* se ha considerado en función de su habilidad para producir la citotoxina vacuolizante (VacA) y la proteína asociada a la citotoxina (CagA). El gen *vacA*, de 3,9 kb de tamaño, codifica para una proteína de 139 kDa con una secuencia líder de 33 aminoácidos, la propia citotoxina (VacA) y un fragmento C-terminal de aproximadamente 50 kDa [Cover et al., 1994]. La citotoxina induce la formación de vacuolas en las células epiteliales del huésped y se ha asociado su presencia con la capacidad de producir lesión tisular y enfermedad ulcerosa, aunque no se trata del único factor implicado [Atherton et al, 1995]. El gen *cagA* está posicionado en uno de los extremos de la isla de patogenicidad (PAI) de 35 kb, que contiene unos veinte genes, incluyendo el *picB* [Tomb et al, 1997], requerido para inducir la producción de interleucina-8 por las células del epitelio gástrico [Censini et al, 1996].

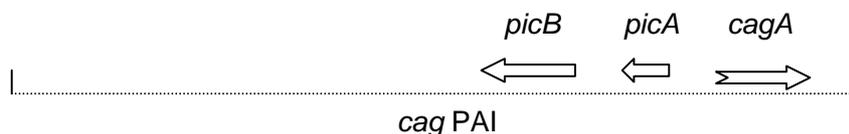


Figura 3.- Esquema de la isla de patogenicidad (PAI) de *Helicobacter pylori* [Tomb et al, 1997].

La movilidad de *H. pylori* es esencial para la colonización. Permite a la bacteria difundir por la capa viscosa de moco que cubre el epitelio gástrico. Al menos cuarenta proteínas del genoma de *H. pylori* se encuentran implicadas en la regulación, secreción y ensamblaje de la arquitectura flagelar [Suerbaum et al, 1995]. El lipopolisacárido de la pared celular juega un importante papel en la patogénesis de *H. pylori* [Moran, 1996]. Su potencial inmunogénico es de menor magnitud que el de las enterobacterias [Baker et al, 1994], lo que puede ayudar a la persistencia de la infección. El antígeno O se asemeja a los antígenos del sistema Lewis [Moran, 1996].

Aproximadamente el 40 % de los aislamientos de *H. pylori* presentan plásmidos, con un tamaño que oscila entre de 1,5 a 23,3 kb, pero no contienen ninguno de los factores de virulencia conocidos [Minnis et al., 1995].

2.2. Vías metabólicas.

El análisis de las rutas metabólicas del genoma de *H. pylori* [Tomb et al., 1997], sugieren que utiliza únicamente la glucosa como sustrato de hidratos de carbono y de fosforilación. También obtiene energía a partir de la degradación de la serina, alanina, aspártico y prolina. El eje metabólico de la glicolisis-gluconeogénesis constituye la base de la producción de energía y el punto de inicio de gran parte de las rutas de la biosíntesis: la síntesis de peptidoglicano, fosfolípidos, aminoácidos esenciales, ácidos grasos y cofactores derivados del acetil-CoA o de los intermediarios de la ruta de la glicolisis. El metabolismo del piruvato refleja el carácter microaerófilico de *H. pylori*. Las vías de síntesis y degradación de purinas y pirimidinas sugieren que *H. pylori* utiliza diversos sustratos como fuente de nitrógeno, incluyendo urea, amonio, alanina, serina y glutamina. La asimilación del amonio, un producto muy abundante por efecto de la actividad ureasa del microorganismo, se produce por la vía del enzima glutamato sintetasa.

3. EPIDEMIOLOGÍA.

Los estudios realizados en la última década han convertido a *Helicobacter pylori* en uno de los agentes infecciosos de mayor prevalencia en el hombre, implicándose en la patogenia de enfermedades tan dispares como la patología gastroduodenal crónica [Blaser, 1992],

enfermedades cardiovasculares [Mendall et al., 1994] y retraso de crecimiento [Patel et al., 1994].

El único reservorio en condiciones naturales es el hombre, aunque no es infrecuente el aislamiento en primates. Todavía hoy, la ruta de transmisión de la infección, no está claramente establecida y se piensa como vía más plosible, la vía oral u orofecal. Se ha hipotetizado sobre el mecanismo de transmisión a partir de insectos como las moscas [Grübel et al., 1997] o animales domésticos (mascotas), y más concretamente gatos, si bien implica especies diferentes como son *Helicobacter felis* y *Gastrospirillum hominis* [Stolte et al., 1994]. También se contempla la iatrogenia, a través de los endoscopios, pinzas de biopsia... [Akamatsu et al., 1996] circunstancia ésta que comporta un mayor riesgo de infección en el personal de endoscopia, especialmente aquellos que manipulan estos utensilios sin guantes [Mitchell et al., 1989].

Microorganismo	Localización	Huésped
<i>Helicobacter pylori</i>	Estómago	Hombre, gato y monos
<i>H. felis</i>	Estómago	Perro y gato
<i>Gastrospirillum suis</i>	Estómago	Cerdo
<i>H. heilmannii</i> (<i>G. hominis</i>)	Estómago	Hombre, gato y perro?
<i>H. mustelae</i>	Estómago	Hurón
<i>H. acinonyx</i>	Estómago	Leopardo
<i>H. nemestrinae</i>	Estómago	Monos
<i>H. cinaedi</i>	Intestino	Hombre y roedores
<i>H. fennelliae</i>	Intestino	Hombre
<i>H. canis</i>	Intestino	Perro
<i>H. muridarum</i>	Intestino	Roedores
<i>H. rappini</i>	Intestino	Hombre
	Estómago	Oveja
	Hígado	Perros
<i>H. hepaticus</i>	Hígado	Roedores

Tabla 1.- Especies de *Helicobacter* y microorganismos relacionados [Versalovic et al., 1999].

Numerosos estudios demuestran que la tasa de infección, aumenta con la edad [Patel et al., 1994], preferentemente en países subdesarrollados, del mismo modo que la incidencia de la infección va disminuyendo en países desarrollados. En éstos, la presencia de anticuerpos frente a *H. pylori* aumenta desde menos del 20% en la 3ª década de la vida hasta más del 50% en la 6ª, mientras en países subdesarrollados la cifra es superior al 80% en la 2ª década. Hombres y mujeres presentan aproximadamente, la misma tasa de infección.

La exposición a unas pobres condiciones de vida [Webb et al., 1994] como el hacinamiento o la mala alimentación, son factores de riesgo. Estudios serológicos a partir de casos índice en niños, demuestran tasas de infección elevadas entre miembros de una misma familia, con idéntica cepa de *H. pylori*, sugiriéndose la introducción y diseminación de la infección en el núcleo familiar a partir del caso índice [Best et al., 1994, Azuma et al., 1994]. También se ha vinculado el polimorfismo del gen del antígeno de histocompatibilidad HLA-DQA con un mayor riesgo, sin embargo su relación con determinados grupos sanguíneos o el antígeno Lewis es controvertida [Azuma et al., 1994].

A pesar de todo ello, sólo una mínima proporción de los infectados desarrolla signos y síntomas de patologías relacionadas, permaneciendo la inmensa mayoría asintomáticos. Una explicación a esta variedad en la prevalencia y forma de presentación clínica podría explicarse por la diversidad genotípica de cepas de *H. pylori* con diferente grado de agresividad o la coinfección por más de una de ellas en el mismo huésped.

4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

Helicobacter pylori es capaz de colonizar y persistir en su nicho biológico: la mucosa gástrica. Los factores de patogenicidad de *H. pylori* pueden dividirse en dos grupos [Dunn et al., 1997]:

1. Factores de virulencia, que contribuyen a los efectos patogénicos de la bacteria , y
2. Factores de mantenimiento, que permiten a la bacteria colonizar y permanecer dentro del huésped.

1. Factores de virulencia	2. Factores de mantenimiento
Inducción Inflamación Gástrica	Movilidad
Interleucina-8	Catalasa y Superóxido dismutasa
Adherencia neutrófilos	<i>Heat shock proteins</i>
PAF	ATPasa
Lipopolisacárido	Sideróforos
Ureasa	Adhesinas
	Evasión inmunidad
Alteración Barrera de Moco	
Fosfolipasa	
Mucinasa	
Radicales libres oxígeno	
Óxido nitroso sintetasa	
Apoptosis	
Alteración Secreción Ácida	

Tabla 2.- Mecanismos de patogenicidad de *Helicobacter pylori*.

4.1. Factores de virulencia.

Responsables de los tres grandes efectos patogénicos imputados a *H. pylori*: inducción de la inflamación gástrica, alteración de la barrera mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica.

4.1.a. Inducción de la inflamación gástrica.

La presencia de un infiltrado inflamatorio en la mucosa se ha relacionado con la necesidad de éste, para permitir la supervivencia de *H. pylori in vivo* [Blaser, 1992; El-Omar et al., 1994].

- Interleucina-8. Es un péptido que actúa como un potente mediador de la inflamación reclutando y activando neutrófilos [Sharma et al., 1995]. Cepas de *H. pylori* VacA + / CagA + inducen una mayor producción de IL-8 que cepas VacA - / CagA - [Crabtree et al., 1995].
- Adherencia de los neutrófilos. Evans ha caracterizado una proteína, denominada HP-NAP, de 150 kDa que incrementa la expresión en los neutrófilos de la integrina

CD11b/CD18 y aumenta su adherencia a las células del endotelio [Evans et al., 1995].

- Factor activador plaquetario (PAF). Se trata de un reconocido agente ulcerogénico, ya que estimula la secreción ácida gástrica, vía receptores específicos de las células parietales [Sobhani et al., 1996]. *H. pylori* puede metabolizar su precursor inactivo Lyso-PAF en PAF, induciendo lesión gástrica.
- Lipopolisacárido. El lipopolisacárido de *H. pylori* rompe la barrera mucosa gástrica interfiriendo la interacción entre la mucina y su receptor a nivel de la mucosa. La ebrotidina, contrarresta este efecto [Moran, 1996].
- Ureasa. Es un potente estímulo de la activación de la fagocitosis mononuclear y la producción de citocinas inflamatorias [Harris et al., 1996]. Producida en grandes cantidades por todos los aislamientos de *Helicobacter spp*, parece implicada en la protección de la bacteria frente a la acidez de su nicho ecológico, el estómago. Estudios en modelos experimentales demuestran que mutantes ureasa-negativas son incapaces de colonizar la mucosa del modelo animal en cerdos [Eaton et al., 1991]. Además, constituye el candidato por excelencia como agente utilizado en la vacuna contra *H. pylori*.

4.1.b. Alteración de la barrera mucosa gástrica.

H. pylori puede inhibir la respuesta de las células productoras de moco, lo que supone un efecto nocivo sobre el primer mecanismo de defensa de la mucosa gástrica.

- Fosfolipasa. A través de las fosfolipasas A y C expresadas por *H. pylori*, este microorganismo altera la capa de moco del epitelio gástrico [Ottlecz et al., 1993]. Su efecto puede ser inhibido por el uso de sales de bismuto.
- Mucinasa. Su expresión *in vivo*, contribuye probablemente a la alteración de la barrera mucosa gástrica.
- Radicales libres de oxígeno. Inducidos por *H. pylori*, se ha relacionado su formación en la mucosa gástrica *in vivo* con la extensión de la lesión gástrica, de modo que no existe evidencia de participación de los radicales libres de oxígeno en el daño gástrico en casos no relacionados con la infección por *H. pylori* [Davies et al., 1994].

- Inducción de la óxido nítrico sintetasa. Elevados niveles de óxido nítrico se han asociado a activación inmunitaria y lesión tisular. *H. pylori* induce su producción *in vitro*, a cargo de los macrófagos [Wilson et al., 1996].
- Apoptosis. *H. pylori* aparece como un inductor de la muerte celular programada de las células de epitelio gástrico. Del mismo modo inhibe la migración y proliferación de las células epiteliales [Moss et al., 1996].

4.1.c. Alteración de la fisiología gástrica.

La infección por *H. pylori* induce la secreción de gastrina, que actúa como un estímulo para la secreción ácida, e inhibe la secreción de somatostatina, péptido inhibidor de la secreción ácida. Este efecto está relacionado también con el grado de inflamación gástrica presente, de forma que, cuando la secreción gástrica es inhibida con omeprazol, la presencia de *H. pylori* en el antro se encuentra comprometida y se produce la migración de la bacteria desde esta localización hacia el cuerpo del estómago [Logan et al., 1995].

4.2. Factores de mantenimiento.

Contribuyen a la colonización y permanencia de *Helicobacter pylori* en su nicho.

- Movilidad. Se trata de un factor de colonización esencial basado en la presencia de flagelos, que en número de cuatro a seis, codificados por los genes *flaA* y *flaB* [Leying et al., 1992] favorecen el mantenimiento de la bacteria en la capa de moco gástrico. Se ha demostrado que cepas carentes de flagelos son incapaces de colonizar modelos animales [Eaton et al., 1996]. La forma espiralada de la bacteria también contribuye a su mantenimiento en la capa de moco [Goodwin et al., 1990].
- Catalasa y superóxido dismutasa. Confieren resistencia a la bacteria frente a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares [Spiegelhalder et al., 1993].
- Heat shock proteins, inductoras de la respuesta inmune y moduladoras de la actividad ureasa [Suerbaum et al., 1994].
- ATPasa, diana del efecto bactericida de los inhibidores de la bomba de protones en *H. pylori* [Iwalhi et al., 1991].

- Adhesinas involucradas en la fijación del microorganismo a las células epiteliales del estómago, resistiendo el peristaltismo [Lingwood, 1993].
- Evasión a la inmunidad. *H. pylori* parece tener una cierta actividad supresiva de la respuesta inmunitaria celular del huésped, al mostrar resistencia a la fagocitosis, quizá debido a la gran cantidad de amonio que es capaz de producir [Kist et al., 1993]. La expresión del antígeno de Lewis en la superficie de *H. pylori*, puede contribuir al camuflaje de la bacteria. La modificación de la morfología de las bacterias también está implicada, por medio de las formas cocoides, que representa una forma de resistencia en condiciones ambientales hostiles, que pueden ser revertidas a formas bacilares virulentas *in vivo*.

Producto	Gen	Función supuesta
Ureasa	<i>ure</i>	Neutralización acidez gástrica, toxicidad epitelio
Flagelos	<i>flaA, flaB</i>	Movilidad bacteriana
Adhesinas	<i>hpsA</i>	Adhesión células epitelio gástrico
Superóxido dismutasa	<i>sod</i>	Resistencia fagocitosis
Catalasa	<i>katA</i>	Resistencia fagocitosis
HP-NAP	<i>napA</i>	Activación neutrófilos
<i>Heat shock proteins</i>	<i>hspA, hspB</i>	Activación ureasa
VacA	<i>vacA</i>	Citotóxica epitelio gástrico
CagA	<i>cagA</i>	Desconocida

Tabla 3.- Proteínas de *Helicobacter pylori* que contribuyen a su patogenicidad.

5. MARCADORES DE PATOGENICIDAD.

Además de estos factores patogénicos presentes en todas las cepas, existen otros producidos sólo por un subgrupo de aislamientos como son:

- la proteína vacuolizante citotóxica (VacA) de alto peso molecular, formada por monómeros de 87 kDa, que forma vacuolas en las células epiteliales eucariotas de

los mamíferos, producida aproximadamente por la mitad de las cepas de *H. pylori* [Cover et al., 1992; Leunk, 1991], y

- la proteína asociada a citotoxicidad (CagA), cuyo peso molecular es alrededor de 128 kDa, descrita en diversas cepas citotóxicas de *H. pylori*, sugiriendo que juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad [Covacci et al., 1993]. La patología crónica gastroduodenal está estrechamente relacionada con la expresión del antígeno CagA que habitualmente se coexpresa con la toxina vacuolizante VacA por parte de la cepa de *H. pylori* implicada en la infección.

A pesar de la gran diversidad genética que existe entre las cepas de *Helicobacter pylori*, la mayoría de ellas pueden clasificarse fenotípicamente en dos grandes grupos [Xiang et al., 1995]:

- I - bacterias que presentan los genes que codifican la proteína CagA y VacA y expresan ambas proteínas y,
- II - bacterias que presentan el gen de la citotoxina y su proteína VacA, pero no el gen *cagA* ni la proteína CagA.

Aunque la relación entre estos dos factores de patogenicidad no es claramente conocida, el antígeno CagA no es necesario para la expresión de la citotoxicidad vacuolizante [Xiang et al., 1995], lo que ha sido confirmado con el hallazgo de que la administración de citotoxina sola purificada permite inducir ulceración en el estómago de ratones [Telford et al., 1994]. Estudios serológicos demuestran que las cepas productoras de la proteína CagA se encuentran asociadas con ulcera duodenal y el título de anticuerpos frente a este antígeno CagA se correlaciona con la severidad de la enfermedad.

Con posterioridad, se describió la existencia del gen *iceA* así como del antígeno Lewis.

- iceA. Este gen, inducido por contacto con el epitelio, posee dos variantes *iceA* 1 e *iceA* 2. La presencia del subtipo *iceA* 1, se ha relacionado con una mayor asociación a patología ulcerosa duodenal [Peek et al., 1996].
- Antígeno Lewis. Son glucoproteínas polimórficas, identificadas habitualmente con los eritrocitos pero que existen también en otras células epiteliales, como las de la mucosa gástrica. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha identificado la expresión de alguno de los antígenos Le^a, Le^b, Le^x y Le^y en cepas de *H. pylori*, lo que ayuda a su diferenciación. La expresión de los determinantes de tipo 2 (Le^x y Le^y) es más común que los de tipo 1 (Le^a y Le^b). Las cepas *cagA* + muestran una mayor expresión que cepas *cagA* - [Wirth et al., 1997].

6. FISIOPATOLOGÍA.

La infección producida por *Helicobacter pylori* establece su potencial ulcerogénico en base al incremento de la secreción ácida [El-Omar et al., 1993], la inducción de metaplasia gástrica en el duodeno [Khulusi et al., 1995], la alteración de la barrera mucosa [Berstad et al., 1994] y la producción de metabolitos inflamatorios en la mucosa gástrica [Rautelin et al., 1993].

Una compleja interacción entre diferentes mecanismos como son los factores de virulencia, la respuesta por parte del huésped (susceptibilidad genética, metaplasia gástrica en el duodeno, respuesta en la secreción de ácido, neuromodulación) y factores ambientales (dieta, edad de adquisición de la infección, stress, tabaquismo) se han erigido como conductores hasta el proceso final de la úlcera [Kreiss et al., 1995].

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* desencadena una respuesta inflamatoria inespecífica caracterizada por la activación de las células epiteliales superficiales productoras de IL-1, IL-6, IL-8, interferón y TNF- α [Nielsen et al., 1993]. Estas citocinas propician el reclutamiento de neutrófilos y posteriormente de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y macrófagos, además de modular la producción de otros mediadores de la inflamación. La IL-8 producida por las células epiteliales en respuesta a la

infección parece tener un papel primordial en la activación de los neutrófilos [Figura, 1995]. La producción de IL-8 vendría determinada por las señales intracelulares propiciadas por el factor de transcripción NF-kB. La infección desencadena una respuesta humoral a partir de linfocitos B presentes en el infiltrado inflamatorio y folículos linfoides formados en respuesta a la infección, con la producción de anticuerpos del tipo IgA e IgG.

La caracterización de los fenómenos inflamatorios desencadenados por la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* ha estado limitada hasta la actualidad, por la falta de un modelo animal adecuado. Este mismo hecho ha dificultado el estudio de las posibles interacciones entre la infección por *H. pylori* y otros agentes gastrolesivos, desconociéndose si *H. pylori* incrementa la susceptibilidad al daño inducido por antiinflamatorios no esteroideos o etanol, o si comporta un cambio de flujo sanguíneo de la mucosa gástrica y si éstos juegan un papel en el desarrollo de lesiones ulcerosas.

Algunos de los mediadores de la inflamación liberados por las células epiteliales e inmunocitos (macrófagos, mastocitos, neutrófilos) afectan directamente la integridad de la mucosa a través de alteraciones en la permeabilidad epitelial y vascular o la regulación del flujo sanguíneo, ignorándose el papel que juegan las diferentes moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales [Figura, 1995].

La colonización gástrica por *H. pylori* estimula el sistema de HLA aumentando la expresión de ciertas moléculas en las células epiteliales. Supuestamente, la expresión de ciertos alelos de los antígenos HLA-DQ y HLA-DR en el huésped determinarían una mayor progresión de la gastritis o un mayor riesgo de desarrollar úlcera gastroduodenal.

Los pacientes con úlcera péptica presentan de forma constante dos hechos: una alta prevalencia de infección por *H. pylori* y su asociación a gastritis. Los estudios realizados en pacientes ulcerosos se han centrado fundamentalmente en el efecto que la erradicación de *H. pylori* tenía sobre la recidiva ulcerosa, descuidando el estudio del efecto sobre las lesiones inflamatorias [Correa, 1988]. Tras la erradicación de la infección el infiltrado por neutrófilos de la mucosa gástrica desaparece completamente de forma rápida. El número de linfocitos, células plasmáticas y folículos linfoides también disminuye, pero en este caso la

regresión es lenta y puede no haberse normalizado por completo en 1 o 2 años. Por lo que respecta a la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal, no existen datos que avalen que la erradicación induzca su regresión [Sáinz et al., 2000]. Ambas lesiones son precursoras para el desarrollo de cáncer gástrico, cifrándose su incidencia en el 0,2-1 % de estos pacientes.

6.1. Anatomía Patológica.

La gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* es una de las infecciones crónicas de mayor prevalencia en la población. El concepto de gastritis crónica incluye todo tipo de inflamación de la mucosa gástrica. Clásicamente se había utilizado la clasificación de gastritis tipo A - atrófica, predominantemente en el cuerpo y a menudo con componente inmunológico; gastritis tipo B - superficial y predominante en el antro; y gastritis tipo C - de origen químico. En 1990 se propuso la clasificación del sistema Sidney que incluye criterios endoscópicos, histológicos y etiológicos. Con esta nueva clasificación, la gastritis se clasificó en aguda, crónica y formas específicas, dividiéndose la gastritis crónica en dos grandes categorías: no atrófica y atrófica, precisando la localización antral, cuerpo o extensa (pangastritis) [Dixon et al., 1996].

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* induce invariablemente una reacción inflamatoria de carácter agudo y difuso en cuerpo y antro. Esta reacción aguda se transforma con el tiempo en una inflamación crónica de predominio antral, inicialmente superficial, en la que se aprecia un aumento del número de células inflamatorias, linfocitos y plasmocitos, con algunos eosinófilos y neutrófilos en la lámina propia. Este infiltrado inflamatorio puede ocupar toda la superficie de la mucosa y la zona foveolar, pero no afecta la zona glandular. En la progresión de la inflamación, el infiltrado inflamatorio se extiende a toda la profundidad de la mucosa llegando a formar folículos linfoides, pudiéndose observar disminución de la capa de moco y aparición de erosiones en el epitelio de superficie. Con el tiempo la gastritis progresa a atrofia gástrica, con la pérdida de túbulos glandulares. El grado de lesión no suele ser uniforme, coexistiendo con zonas preservadas en una misma preparación. Cuando la atrofia es total, el infiltrado inflamatorio suele ser mínimo. Junto con la atrofia glandular suele coexistir el fenómeno de metaplasia o sustitución de la estructura normal de la mucosa gástrica por otra de tipo intestinal. En la metaplasia intestinal aparecen de forma parcheada agregados de células caliciformes,

pudiendo alcanzar la mucosa una apariencia totalmente de tipo intestinal [Sáinz et al., 2000].

Las gastritis crónicas que aparecen con más frecuencia son la gastritis atrófica multifocal y la gastritis antral difusa. La gastritis atrófica multifocal se caracteriza por la pérdida de glándulas y reemplazo por epitelio de tipo intestinal (metaplasia intestinal) y aparición de focos de atrofia. Se asocia fundamentalmente a úlcera y adenocarcinoma gástrico. La gastritis antral difusa muestra un predominio de linfocitos en la mucosa antral. Esta lesión acompaña de forma constante a la úlcera péptica duodenal, siendo más rara la aparición del linfoma gástrico tipo MALT [Correa, 1992].

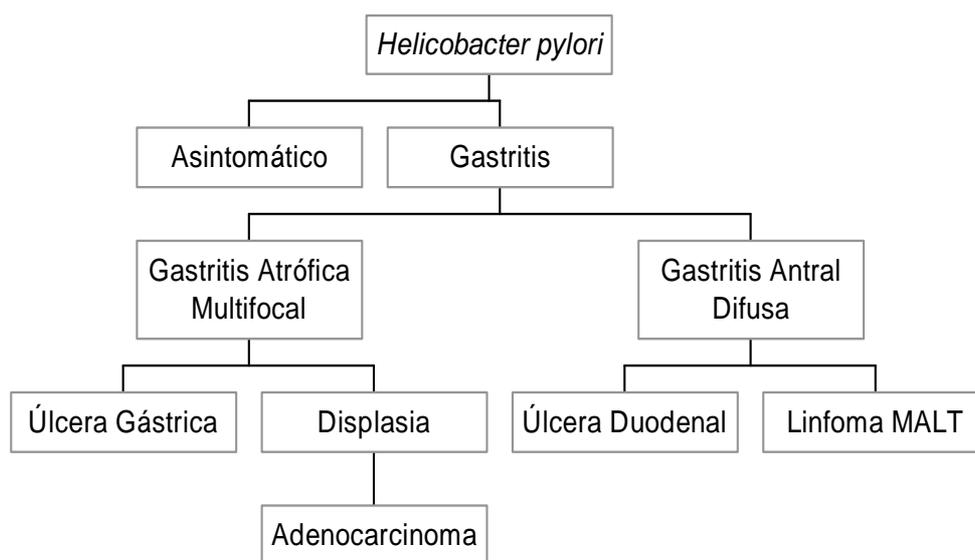


Figura 4.- Cambios clínicopatológicos inducidos por la infección de *Helicobacter pylori*.

Una vez más, los factores que determinan que algunos pacientes presenten lesiones de gastritis crónica y permanezcan estables largos períodos de tiempo, mientras otros progresan rápidamente hacia la atrofia, no están totalmente esclarecidos, implicándose la diversidad genómica de los aislamientos de *H. pylori*, la susceptibilidad del propio huésped

y las características de su respuesta inmune [Kreiss et al., 1995]. El tiempo de evolución de la infección, se considera un factor determinante en la progresión de la gastritis hacia la atrofia, al ser la incidencia anual de atrofia gástrica entre 4 y 6 veces superior en los pacientes infectados y desarrollar uno de cada tres pacientes, atrofia gástrica en un período de 20 años.

6.2. Cepas ulcerogénicas.

La citotoxina (VacA) está estrechamente relacionada con la capacidad ulcerogénica de la cepa, de forma que cepas VacA + son más frecuentemente aisladas en enfermos con úlcera péptica que en enfermos con gastritis [Blaser, 1994]. La diversidad genética entre el *vacA* puede explicar la pérdida de agresividad (citotoxicidad) de determinados genotipos de *H. pylori*. El gen *vacA* que codifica la citotoxina VacA posee una estructura en mosaico con una de las tres familias de presentación del péptido señal (s1a, s1b, s2), combinada con una de las dos de la región media (m1, m2) [Atherton et al., 1995]. Existen estudios que demuestran que las cepas con la secuencia señal s1 en la citotoxina poseen mayor potencial para generar úlcera péptica con una mayor respuesta inflamatoria a nivel gástrico [Tham et al., 1995]. Todos los pacientes infectados con cepas de *H. pylori* citotóxicas (VacA +) poseen asociada una gastritis, 78 % presentan infiltración de polimorfonucleares en la mucosa gástrica, frente al 33 % del grupo VacA - [Phadnis et al., 1994].

A pesar de que prácticamente todas las cepas de *H. pylori* son portadoras del gen que codifica para la citotoxina y alrededor del 50 % producen dicha citotoxina, no está perfectamente aclarado por qué la mayoría de pacientes infectados permanecen asintomáticos y son una minoría los que desarrollan clínica. Se ha vinculado la actividad citotóxica con la presencia del gen *cagA* -situado en la isla de patogenicidad (PAI) y que codifica la proteína CagA- si bien está demostrado que no es necesaria su presencia (*cagA*) para la expresión de la citotoxina [Tummuru et al., 1994; Xiang et al., 1995]. Estudios serológicos de anticuerpos anti-CagA demuestran su presencia en el 60 % de las gastritis crónicas y en el 100 % de las úlceras pépticas [Crabtree et al., 1991]. La proteína CagA puede ser considerada un marcador de patogenicidad para identificar aquellos pacientes con mayor riesgo ulcerogénico aunque el mecanismo esté todavía por dilucidar. Otra posible explicación es que la infección esté producida por más de una cepa de *H. pylori* y que éstas

presenten diferentes genotipos [Owen et al., 1993], estando también implicados otros factores de virulencia de *H. pylori* [Covacci et al., 1993].

7. CÁNCER GÁSTRICO.

La Organización Mundial de la Salud a través de su Agencia para la Investigación del Cáncer, reconoció en 1994 a *Helicobacter pylori* como un carcinógeno tipo I en su clasificación de agentes biológicos carcinogénicos.

La infección por *H. pylori*, contraída en los primeros años de vida es la causa más frecuente de gastritis crónica atrófica que puede ser el sustrato histológico del proceso carcinogénico. En países industrializados el riesgo atribuible a la relación entre *H. pylori* y cáncer gástrico es del 35-60 %, considerada la segunda neoplasia más frecuentemente diagnosticada en todo el mundo [Forman et al., 1994]. Esto supone que la erradicación de la infección prevendría teóricamente, la aparición del tumor en dicha proporción de casos.

El adenocarcinoma gástrico, se subdivide en dos tipos, con diferencias epidemiológicas: - tipo intestinal, precedido por una cadena de cambios fenotípicos que incluyen infección por *H. pylori*, gastritis crónica, atrofia, metaplasia intestinal y displasia; y - tipo difuso, aún por esclarecer su relación con la infección por *H. pylori*. El riesgo entre los infectados es de 3 a 6 veces superior. Sin embargo, se estima que tan solo el 0,5 % de los infectados presentarán un carcinoma de estómago, lo que confirma el carácter multifactorial de la carcinogénesis gástrica [Sáinz et al., 2000].

La implicación de alteraciones genotípicas también están presentes con reordenamientos de la región promotora de translocación y mutaciones en la región *K-ras* en la metaplasia intestinal [Wright et al., 1994]. Otros factores que incluyen predisposición genética, ingesta de antioxidantes y grasas, pueden influir en este proceso. Parece clara la relación existente entre hipocloridria y sobrecrecimiento bacteriano, por la vía de la producción de nitrosaminas, conocidos agentes carcinogénicos. Otros factores a tener en consideración son la gastrectomía o el reflujo duodenogástrico [Yeomans, 1994].

La mayoría de los tumores se diagnostican en estadios avanzados y la supervivencia a cinco años es únicamente del 17 %, cifra solo algo superior a la de 20 años atrás [Boring, et al., 1994]. Respecto a la prevención, la erradicación de *H. pylori* es un tema controvertido, ya que ninguna de las pautas de tratamiento actuales es lo suficientemente barata o de fácil administración, para ser utilizada masivamente en programas de salud pública. Una alternativa prometedora puede ser la vacuna contra *H. pylori*.

Los linfomas no-Hodgkin del estómago, se encuentran muy próximos histológicamente a los linfomas asociados a la mucosa gástrica. La gastritis crónica activa, típica de la infección por *H. pylori*, está presente en la proximidad del tumor y la eradicación de *H. pylori* se ha asociado con una total o parcial regresión de los linfomas de bajo grado [Bayerdörffer et al., 1995].

8. DIAGNÓSTICO.

La demostración de que *Helicobacter pylori* era el principal agente causal de la gastritis antral asociada a la úlcera péptica y de que su erradicación conducía a la curación definitiva de la mayoría de los casos de esta enfermedad, así como su implicación en los linfomas gástricos tipo MALT y el cáncer de estómago, produjeron una auténtica eclosión de métodos diagnósticos. Cada uno de ellos ofrece ventajas adicionales sobre el resto, pero ninguno es perfecto [Kosunen et al., 1995].

El diagnóstico de la infección puede establecerse por métodos - directos, cuando se detecta la presencia del microorganismo en muestras obtenidas por endoscopia (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares) [Cohen et al., 1997] o - indirectos, cuando se estudia alguna propiedad del mismo (test de la ureasa, prueba del aliento con urea-C¹³ o urea-C¹⁴) o la respuesta inmune específica (serología) [Atherton, 1997].

La obtención de muestras para el diagnóstico puede realizarse por métodos - invasivos (biopsia) o - no invasivos. El estudio histológico de biopsias gástricas, el aislamiento por cultivo bacteriológico, el test rápido de la ureasa, la reacción en cadena de la polimerasa,

son técnicas diagnósticas disponibles, que requieren la realización de una endoscopia digestiva para la obtención de una muestra de tejido gástrico. Por el contrario, el test del aliento con urea marcada, la serología, la PCR del jugo gástrico, son pruebas diagnósticas no invasivas, que no requieren endoscopia.

El método considerado de referencia para el diagnóstico de la infección es el método directo invasivo (cultivo y tinción) [Cohen et al., 1997] y el más rápido para confirmar el diagnóstico es el test rápido de la urea-rojo fenol a partir de biopsia [Abdalla et al., 1989]. La estrategia diagnóstica a seguir es combinar inicialmente dos pruebas invasivas aprovechando la fibrogastroscofia. Si se trata de la primera manifestación de los síntomas de la enfermedad, la endoscopia digestiva debe practicarse para confirmar la existencia de úlcera activa y puede aprovecharse para practicar biopsias gástricas que mediante el cultivo, estudio histológico o test rápido de la ureasa, permitirán diagnosticar la existencia de infección. Por el contrario, en pacientes ulcerosos crónicos, con diagnóstico endoscópico en brotes previos, la práctica del test del aliento con urea marcada o un test serológico, proporcionará el diagnóstico con una buena sensibilidad y especificidad. La elección de la prueba diagnóstica a utilizar dependerá de la información clínica, la disponibilidad y coste de las pruebas complementarias [Dunn et al., 1997].

8.1. Cultivo microbiológico.

El cultivo más habitual es el de biopsias gástricas, aunque se han cultivado con éxito el jugo gástrico y las heces [Thomas et al., 1992]. Su principal ventaja es permitir el estudio de la sensibilidad antibiótica y la caracterización molecular de la cepa. A pesar de la alta sensibilidad del cultivo (95 % en grupos experimentados) y su total especificidad, dadas las características de crecimiento lento y requerimientos nutritivos de esta bacteria, existen otros métodos diagnósticos más rápidos y simples para el diagnóstico de la infección *por H. pylori*.

8.2. Estudio histológico.

H. pylori se localiza en la capa de moco adherido a la superficie del epitelio y puede encontrarse en la profundidad de las criptas. La presencia de bacterias en poca cantidad dificulta su apreciación con la tinción convencional de hematoxilina y eosina, lo que hace

necesario complementar el estudio histológico con otras tinciones especiales como la de Warthin-Starry o el Giemsa modificado [Genta et al., 1994]. La utilización de tinciones de inmunohistoquímica facilita el diagnóstico microscópico de la infección, a la par que disminuye los falsos negativos por falta de experiencia del observador.

8.3. Test rápido de la ureasa.

El rendimiento de esta técnica diagnóstica depende del inóculo presente en la mucosa gástrica. El CLOtest® (Delta West Ltd., Bentley, West Australia) fue el primer medio de diagnóstico rápido comercializado y uno de los más utilizados en la actualidad [Laine et al., 1996], aunque existen otros como el Hpfast® (GI Supple, Camp Hill, Pa) o PyloriTek® (Serim Research Corp., Elkhart, Ind). Básicamente, el fundamento diagnóstico de todos ellos es un cambio colorimétrico a expensas de la modificación del pH que se produce al hidrolizarse la urea en presencia de la ureasa de *H. pylori*. Alrededor del 75 % de las pruebas positivas, lo son al cabo de 10-60 minutos, lo que permite establecer el diagnóstico inmediatamente. Poseen una buena sensibilidad y excelente especificidad, aunque se ha sugerido la posibilidad de errores diagnósticos por la presencia de otros colonizantes con actividad ureasa en la mucosa gástrica.

8.4. Reacción en cadena de la polimerasa.

Existen diferentes aspectos técnicos que pueden influir en la variabilidad y reproductibilidad de sus resultados: elección de los iniciadores o “*primers*”, preparación de muestras, extracción del material genético, densidad del inóculo bacteriano, existencia de inhibidores de la reacción, ... [Ashton-Key et al., 1996]. Permite además, la detección de *H. pylori* en la placa dental, lo que refuerza la idea de que la cavidad oral es la localización original de esta infección [Li et al., 1996]. Se trata de un método altamente sensible y específico, que permite diferenciar genotípicamente las cepas entre sí.

8.5. Serología.

La infección por *H. pylori* provoca una respuesta inmunológica local y sistémica con un incremento de la secreción de IgA, IgM e IgG. Los test serológicos desarrollados permiten el cribado de gran cantidad de muestras en estudios epidemiológicos de la población [Perez-Perez et al., 1988]. Se trata de una prueba diagnóstica no invasiva, rápida y

económica. La mayoría de test comercializados son del tipo ELISA. En ausencia de tratamiento de la infección, el nivel de anticuerpos permanece elevado de por vida. Tras la erradicación, el nivel de IgG desciende hacia la mitad de los valores iniciales en 6 meses aproximadamente [Kosunen et al., 1992] por lo que éste, es un mal método de seguimiento en pacientes tratados.

Existen tests de última generación, Flexsure HP® y Quickview One Step®, basados en técnicas de aglutinación en látex, practicados con una gota de sangre capilar, obteniéndose el resultado en 10-15 minutos y a un coste muy reducido. Aunque aprobados por la FDA, su determinación es únicamente cualitativa y su sensibilidad menor [Cohen et al., 1996, Sadowski et al., 1996].

8.6. Test del aliento.

El fundamento de esta técnica diagnóstica es la cuantificación de CO₂ marcado espirado en la respiración, tras la administración de urea marcada con un isótopo, resultante de su hidrólisis por *H. pylori*. La prueba realizada con el isótopo C¹³ (Meretek Diagnostics, Nashville, Tenn) requiere un espectrómetro de masas, mientras que con C¹⁴ (PY test, Ballard Medical Products, Draper, Utah), utiliza un contador de centelleo. La realización del test urea-C¹⁴ supone una dosis de irradiación de 1 µCi, equivalente a la exposición solar diaria [Stubbs et al., 1993]. La elección de uno u otro, depende de la disponibilidad, coste y normativas legales de cada centro. El test con urea-C¹⁴ no se recomienda para niños ni mujeres embarazadas.

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Endoscopia	Comentario
Cultivo	77 - 95	100	Sí	Permite testar susceptibilidad antibiótica y genotipar cepas
Histología	93 - 98	95 - 98	Sí	Recomendable múltiples biopsias del antro
Test rápido ureasa	89 - 98	93 - 98	Sí	Método endoscópico de elección
PCR	85 - 96	90 - 100	Sí (biopsia) No (saliva)	Detección ADN: no requiere bacterias vivas
Serología	88 - 95	86 - 95	No	Indicación estudios epidemiológicos
Test del aliento	90 - 95	90 - 95	No	Ideal seguimiento respuesta tratamiento antibiótico

Tabla 4.- Tests diagnósticos de la infección por *Helicobacter pylori* [Dunn et al., 1997].

9. TRATAMIENTO.

La implicación patogénica de *H. pylori* en el desarrollo de la úlcera ha quedado bien establecida a partir de los numerosos trabajos que han demostrado que la recidiva ulcerosa se reduce drásticamente al erradicar la infección por este microorganismo. Una vez realizado el diagnóstico de brote ulceroso e infección por *H. pylori*, el tratamiento de la infección es obligado. El tratamiento actualmente utiliza diversas combinaciones terapéuticas de dos o más agentes, ya que se ha demostrado que monoterapias con un antibiótico o bismuto son escasamente efectivas. Ello es así a pesar de que la sensibilidad *in vitro* es muy alta para la mayoría de los antibióticos.

Los antimicrobianos más utilizados en la erradicación de la infección son claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, así como sales de bismuto e inhibidores de la bomba de protones. Claritromicina es el macrólido que ha obtenido mejores resultados en la erradicación de esta bacteria. Su mayor eficacia clínica se debe a que su metabolito activo configurado por un radical 14-hidroxilo es mucho más estable en medio ácido que el resto de macrólidos, alcanzando concentraciones veinte veces superiores a las de eritromicina en la mucosa gástrica [Sáinz et al., 2000].

La amoxicilina tiene una buena biodisponibilidad por vía oral y aumenta su actividad antibacteriana con la neutralización del pH del estómago. Las tetraciclinas tienen una buena actividad incluso a pH ácido. No se han descrito resistencias primarias a ninguno de estos dos antibióticos. Metronidazol posee una actividad independiente del pH del medio y además es secretado por el jugo gástrico. El principal inconveniente es el elevado porcentaje de cepas de *Helicobacter pylori* con resistencia constitutiva y el rápido desarrollo de resistencias tras el tratamiento, que se cifra en torno al 35 % en países como el nuestro [López-Brea et al., 1997].

Los compuestos de bismuto coloidal inhiben la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas. Inhiben también la actividad ureasa y fosfolipasa, que permiten la supervivencia de la bacteria en su nicho ecológico. Las sales de bismuto se convierten en el estómago en complejos insolubles que se fijan a las proteínas del cráter ulceroso y a las glucoproteínas del moco. También contribuyen a la inhibición de la actividad de la pepsina, a la estimulación de la producción de moco, bicarbonato y la síntesis endógena de prostaglandinas. Su absorción intestinal es escasa, por lo que carece de toxicidad sistémica.

Existen múltiples pautas terapéuticas aunque no todas aprobadas por la FDA. Entre las más utilizadas están las que incluyen tres fármacos, ya sea la combinación clásica conocida como pauta triple clásica y que incluye metronidazol, bismuto coloidal y tetraciclina o amoxicilina, o la que combina dos de estos tres antibióticos, claritromicina, metronidazol y amoxicilina, con un inhibidor de la bomba de protones como omeprazol o lansoprazol [De Boer et al., 1995]. La inclusión de un antisecretor en el tratamiento, no es por su efecto

bactericida, sino porque al elevar el pH gástrico facilita la capacidad bactericida de los dos antibióticos en la mucosa gástrica. *In vitro*, *H. pylori* es susceptible a una amplia variedad de antibióticos, pero *in vivo*, la sensibilidad puede ser muy diferente. La falta de actividad puede deberse a la inactivación del antimicrobiano por el pH ácido del estómago, la dificultad para difundir en el moco gástrico y penetrar en las zonas profundas de la mucosa gástrica o el desarrollo de resistencias durante el tratamiento.

	Régimen	Dosis	Duración	Erradicación (%)
Pauta triple clásica:	Tetraciclina + Metronidazol + Bismuto Subsalicilato	500 mg/6h 400 mg/6h 120 mg/6h	2 semanas	85
Pauta doble:	Claritromicina + Omeprazol o Claritromicina + Ranitidina-Bismuto Citrato	500 mg/8h 40 mg/24 h 500 mg/8h 400 mg/12h	2 semanas 2 semanas	74 82
Pauta triple:	Metronidazol o Amoxicilina + Claritromicina + Omeprazol	400 mg/12h 1 g/12h 500 mg/12h 20 mg/12h	1 semana	90
	Ranitidina-Bismuto Citrato + Claritromicina + Amoxicilina	400 mg/12h 500 mg/12h 1 g/12h	2 semanas	90

Tabla 5.- Pautas terapéuticas de *Helicobacter pylori* [Dunn et al., 1997].

Con estas pautas se consiguen unas tasas de erradicación del germen de alrededor del 80-90 % con una incidencia de efectos secundarios de entre el 10 y el 20 %, en general leves y bien tolerados. Claritromicina se ha asociado a mucositis y alteraciones del gusto como sabor metálico, si bien no es tan molesto como para abandonar el tratamiento. Metronidazol, aunque con poca frecuencia, está relacionado con la aparición de candidiasis vaginal y colitis pseudomembranosa [Borody et al., 1996]. Los fracasos del tratamiento se han relacionado más con incumplimiento de la pauta por parte del paciente que con la aparición de resistencias del aislamiento a alguno de los antibióticos.

Una vez realizado el tratamiento, es importante confirmar la erradicación y ello se puede llevar a cabo realizando una prueba del aliento con urea marcada al cabo de uno o dos meses de finalizar el tratamiento. La negatividad de ésta o cualquier otra prueba diagnóstica (preferentemente no invasiva), antes de este período puede dar resultados falsos negativos, al haberse suprimido solo parcialmente la colonización bacteriana. Este fenómeno se ha denominado aclaramiento. La serología no sirve como prueba de seguimiento ya que los títulos de anticuerpos anti IgG tardan alrededor de 6 meses en descender a la mitad de su valor inicial después de la erradicación y ello impide confirmar la curación durante este espacio de tiempo [Wang et al., 1994].

Las reinfecciones postratamiento son muy bajas y en el medio occidental se considera que son del orden del 1-2 % anual. Esto, junto al hecho de que sin infección raramente hay recidiva ulcerosa, ofrece unas inmejorables perspectivas para la modificación substancial de la historia natural de la enfermedad ulcerosa.

10. MODELO ANIMAL.

En un principio, se logró desarrollar el modelo de *Helicobacter pylori* en cerdos y primates, pero su manejo en el estabulario era muy incómodo y caro. El primer modelo animal experimental en ratones fue con *Helicobacter felis*. La evidencia de que la inoculación desarrollaba una gastritis crónica activa y simulaba la inflamación inducida por *H. pylori* en el hombre, fue un estímulo para desarrollar el modelo en ratones. En 1995, el grupo de Marchetti [Marchetti et al., 1995] de la Universidad de Siena, desarrollaron un modelo animal capaz de inducir en ratones CD1 la patología observada en humanos, mediante la colonización del estómago con aislamientos bacterianos obtenidos a partir de muestras clínicas.

Sin embargo, no todas las infecciones por *H. pylori* están asociadas a gastritis y cuando lo están, en el modelo animal, la gastritis presenta la típica desestructuración de la arquitectura de las glándulas, erosiones y ulceraciones en el epitelio, pero carece de la infiltración de polimorfonucleares en la lámina propia característica de la infección

humana, quizás por una menor reactividad a la infección en el huésped [Marchetti et al., 1995]. La patología gástrica en ratones que simula la patología humana se ha relacionado con infecciones causadas por cepas productoras de la citotoxina vacuolizante pero no por cepas no productoras. Existe pues una correlación epidemiológica entre infección con cepas citotóxicas y enfermedad ulcerosa péptica, igual que ocurre en el ser humano [Covacci et al., 1993].

Este modelo animal ha adaptado cepas salvajes (aisladas a partir de enfermos con patología gastroduodenal) para colonizar el estómago de ratones, convirtiéndose en un importante avance para el estudio de los mecanismos de la patogénesis de la infección por *H. pylori*, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y, el desarrollo de una vacuna eficaz [The Eurogast Study Group, 1993]. Disponemos de un modelo experimental para intentar explicar la patogenia de la gastritis y la úlcera péptica que además permite el estudio cronológico de los mecanismos inmunológicos de la inflamación en la mucosa gástrica.

11. VACUNA.

La mayoría de los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* han sido caracterizados, en el intento de ser utilizados como candidatos para la síntesis de una vacuna eficaz. Una gran variedad de inmunógenos como bacterias sonicadas, ureasa purificada, citotoxina VacA y las heat-shock protein A y B, administrados individualmente, confieren protección frente a la infección por *H. pylori* en modelos animales. Entre ellos destacan los estudios realizados con la ureasa y la proteína VacA. La facilidad para producir una ureasa recombinante en grandes cantidades, junto a su ya demostrada eficacia en el modelo animal, la convierte en la mejor de las opciones para utilizar en el hombre [Marchetti et al., 1995].

La producción de ureasa se ha detectado en todas las cepas de *H. pylori*. Eaton [Eaton et al., 1991] ya demostró que su presencia era necesaria para la colonización de animales en un modelo sobre cerdos. La administración oral de este antígeno previene la colonización de *H. pylori* en ratones. La citotoxina inductora de vacuolas en las células epiteliales *in vitro* (VacA) administrada oralmente en forma de proteína purificada junto con toxina

termolábil de *E. coli* como adyuvante, protege la colonización del estómago de ratones [Marchetti et al., 1995].

En países subdesarrollados con una alta prevalencia de esta infección, la vacunación podría ser la respuesta final a la infección.

III. OBJETIVOS

1.- Estudiar el rendimiento del método de esterilización de las pinzas de biopsia utilizadas en la recogida de muestras de mucosa gástrica para el aislamiento por cultivo de *Helicobacter pylori*.

2.- Desarrollar y optimizar las técnicas de biología molecular para la caracterización y tipificación de cepas de *Helicobacter pylori* según la presencia o ausencia de los genes *vacA* (subtipos s1a, s1b, s2 / m1, m2), *cagA* y su efecto citopático.

3.- Desarrollar un modelo experimental animal en ratones que reproduzca la patología gastroduodenal observada en humanos a partir de cepas aisladas de muestras clínicas.

4.- Implementar las técnicas de microscopía intravital para caracterizar los fenómenos inflamatorios desencadenados por la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* en el modelo animal, así como estudiar la interacción leucocito-endotelio en la microcirculación gástrica.

La técnica de esterilización de las pinzas de biopsia no influye en el cultivo de *Helicobacter pylori*

J.I. Elizalde, J. Gómez, A. Ginés, J. Llach, J.M. Piqué, J.M. Bordas, F. Marco, J. Terés

Am J Gastroenterol 1998; 93: 1450 – 1452

El cultivo de *Helicobacter pylori* tiene una baja sensibilidad, y se afecta por factores como por ejemplo el número de biopsias, transporte y condiciones de cultivo. La detección de *H. pylori* viene influenciada también por el omeprazol, antibióticos, sales de bismuto o el uso de benzocaina. Los procedimientos de desinfección basados en el glutaraldehído son muy efectivos en la eliminación de la contaminación por *H. pylori* de los equipos de endoscopia. Sin embargo, la posibilidad de que restos de glutaraldehído presente en las pinzas de biopsia tras ser descontaminadas, puedan afectar la viabilidad de *H. pylori*, todavía no ha sido investigado. Muestras antrales de 25 pacientes con úlcera gástrica o duodenal activa obtenidas con 3 pinzas (esterilizadas con óxido de etileno, glutaraldehído o glutaraldehído fenolato) fueron sembradas en medio de cultivo apropiado, y los resultados del cultivo fueron evaluados.

Helicobacter pylori fue aislado en 17 pacientes. La positividad del cultivo fue independiente del método de la esterilización de las pinzas, y el número de colonias (media \pm DS) fue similar para los 3 tipos de pinzas (475 ± 312 , 533 ± 242 y 550 ± 225 unidades formadoras de colonias [UFC] para óxido de etileno, glutaraldehído, y glutaraldehído fenolato, respectivamente). Además, el tiempo de incubación hasta el aislamiento fue también similar ($6,0\pm 1,3$, $5,8\pm 1,2$ y $5,7\pm 1,2$ días para óxido de etileno, glutaraldehído, y glutaraldehído fenolato, respectivamente). La utilización de glutaraldehído para esterilizar las pinzas de biopsia no es responsable de los falsos resultados negativos del cultivo de *H. pylori*.

Tipificación de cepas de *Helicobacter pylori* mediante la detección del gen *cagA* y subtipos del *vacA*

J. Gómez, J.I. Elizalde, F. Marco, J.M. Bordas, J.M. Piqué, M.T. Jiménez de Anta

Enferm Infecc Microbiol Clin 1999; 17: 171 – 175

La infección por *Helicobacter pylori* es probablemente la infección bacteriana crónica más frecuente en todo el mundo. Las consecuencias de la infección son enfermedades como úlcera péptica, gastritis crónica, cáncer gástrico o linfoma MALT de la mucosa gástrica. El objetivo de este estudio fue detectar el subtipo del gen de la citotoxina vacuolizante (*vacA*), el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) de cepas de *H. pylori* y estudiar su asociación con el efecto citopático. Se cultivaron muestras de biopsia gástrica de enfermos dispépticos. Los aislamientos fueron genotipificados posteriormente mediante reacción en cadena de la polimerasa.

Todas las cepas estudiadas fueron *vacA* + y el 55 % fueron *cagA* +. Todas las cepas citotóxicas eran *cagA*+, del subtipo *vacA* s1/m1 y correspondían a enfermos con úlcera péptica. Las 11 cepas *cagA* - correspondían al subtipo s2/m2. No se demostró efecto citotóxico entre los subtipos s1/m2 y s2/m2. Existe gran diversidad genética entre las cepas de nuestro medio. El subtipo de bacterias, *vacA* s1/m1 / *cagA* + se asocia con la formación de vacuolas en cultivo celular (tox +).

Activación plaquetar en la infección por *Helicobacter pylori* en ratones y en el hombre

J.I. Elizalde, J. Gómez, J. Panés, M. Lozano, M. Casadevall, J. Ramírez, P. Pizcueta, F. Marco, F. Díaz de Rojas, D.N. Granger, J.M. Piqué

J. Clin. Investigation 1997; 100: 996 – 1005

Se ha demostrado que extractos de *Helicobacter pylori* inducen la adhesión leucocitaria en las venas del mesenterio, pero se desconocen los efectos de la infección por *H. pylori* en la microvasculatura gástrica. Las interacciones de las células inflamatorias en la microcirculación gástrica se estudiaron mediante videomicroscopía intravital en ratones inoculados con suero fisiológico o aislamientos de *H. pylori*. Los agregados plaquetarios fueron detectados y cuantificados en sangre portal de ratón, mientras la expresión endotelial de la selectina P se determinó utilizando la técnica del doble marcado radioactivo de anticuerpos monoclonales. La activación y agregación plaquetar se estudiaron en pacientes infectados por *H. pylori* y controles, midiéndose el cociente plaquetas/agregación y la expresión de la selectina P plaquetar.

La infección por *Helicobacter pylori* induce un marcado aumento en el flujo de “leucocitos rodantes” y la aparición de plaquetas y agregados leucocito-plaquetarios en las venas gástricas de ratón. El “rolling” inducido por la infección por *H. pylori* y la formación de agregados plaquetarios se demostró por anticuerpos monoclonales frente selectina L o selectina P, pero no selectina E. La expresión por las células endoteliales de selectina P no se alteró, pero la expresión de la selectina P plaquetar aumentó en ratones infectados por *H. pylori*. Los agregados plaquetarios circulantes y las plaquetas activadas fueron también detectados en pacientes con infección por *H. pylori*. Estos hallazgos indican que la activación y agregación plaquetar contribuyen a la disfunción de la microcirculación y la inflamación celular asociada con la infección por *H. pylori*.

V. DISCUSIÓN

Desde los primeros intentos de la Microbiología por aislar mediante cultivo este microorganismo espirilado que era fácilmente observable al microscopio en las preparaciones histológicas de biopsias gástricas, tuvo que transcurrir mucho tiempo hasta que por fin, y fruto en parte de la casualidad, pudo conseguirse.

Muchos han sido los argumentos esgrimidos acerca de los requerimientos nutritivos de este microorganismo exigente, condiciones de transporte, atmósfera y tiempo de incubación... y ninguno de ellos resulta gratuito a la hora de conseguir el crecimiento en un medio de cultivo ya sea sólido o líquido. El medio de cultivo enriquecido con el que se ha obtenido el mejor rendimiento ha sido el medio de Brain Heart suplementado con 7 % de sangre de caballo y un suplemento antibiótico que contiene vancomicina, trimetoprim, cefsulodina y anfotericina B. Algunos autores postulan el adecuado crecimiento y aislamiento de este microorganismo en medio de Agar Sangre [Hachem et al., 1995]. Sin embargo, cuando se trata de biopsias gástricas, la mucosa puede estar colonizada por otros gérmenes, que fácilmente pueden tener un crecimiento más rápido que *Helicobacter pylori*, lo que representa un impedimento para obtener un correcto aislamiento cuando las placas se incuban por un período de 7 a 10 días.

Existen numerosos medios de cultivo comercializados que aportan todos los requerimientos nutritivos necesarios para favorecer el aislamiento en cultivo de *H. pylori*. Todos ellos, comerciales o de fabricación propia, tienen el mismo problema, la viabilidad de las placas, ya que tras un corto período de quince días desde su elaboración, su rendimiento disminuye dramáticamente en su cometido. Esto obliga a una constante reposición de un medio de cultivo, que ya de por sí resulta caro dado el gran número de constituyentes que precisa para su elaboración. Estas son algunas de las dificultades a las que se enfrenta la rutina del día a día de un Laboratorio de Microbiología para cultivar biopsias gástricas y obtener el

aislamiento de *H. pylori* y que hace que sólo esté disponible en laboratorios debidamente equipados o centros de referencia o investigación.

La atmósfera microaerofílica óptima para el aislamiento de *Helicobacter pylori* es la mezcla de 5 - 10 % H₂, 5 - 10 % CO₂, 80 - 90 % N₂ y a una humedad relativa del 95 %. A partir del tercer día deben examinarse las placas a diario para detectar crecimiento, hasta un total de 10 días. Si el paciente hubiese recibido tratamiento antibiótico o antiseptor recientemente, se incubarán por un período de 14 días. Para conseguir un crecimiento suficiente, puede utilizarse un medio de cultivo líquido. El caldo Brucella enriquecido con suero fetal bovino al 5-10 %, incubado en microaerofilia y con agitación, favorece el crecimiento en un menor espacio de tiempo.

Igualmente difícil resulta el procedimiento de conservación de cepas para asegurarse la recuperación de las mismas al cabo de un período de tiempo. Sin duda la conservación en frío es el método de referencia, ya sea en nitrógeno líquido a - 196 °C o en un congelador a - 70 °C [Glupczynski et al., 1996]. Una suspensión muy densa (4 o 5 de la escala McFarland) en un medio líquido como puede ser caldo Brucella o Brain Heart, suplementado al 30 % con glicerol estéril, obtiene unos buenos resultados de recuperación a los 6 y 12 meses. Siempre resulta recomendable subcultivar los aislamientos periódicamente, para asegurarse de la viabilidad de los mismos.

Teniendo en cuenta todos los factores que condicionan el rendimiento del cultivo para *Helicobacter pylori*, los resultados publicados en las diferentes series son muy dispares, oscilando entre el 70 y el 90 % de rendimiento [Kjöller et al., 1991]. Para justificar esta circunstancia se han postulado múltiples argumentos, como la distribución irregular de *H. pylori* en la mucosa gástrica (“*patchy*”), lo que obliga a la toma múltiple de biopsias para aumentar en lo posible el rendimiento, habiéndose establecido un mínimo de tres, siendo una de ellas correspondiente a la mucosa antral. Las zonas de metaplasia intestinal no están colonizadas por *H. pylori* y es una causa frecuente de falsos negativos. Otra posible explicación ha sido argumentar que los restos de desinfectante, habitualmente óxido de etileno o glutaraldehído, utilizado en la esterilización del instrumental empleado para la toma de biopsia, podía ser un inhibidor del crecimiento de *H. pylori*. Esto se ha

comprobado que no es así, ni aún en aquellos casos en que se ha intentado justificar por el efecto inóculo, donde una pequeña cantidad de microorganismos en la mucosa gástrica, es recuperada eficazmente en cultivo. En nuestra experiencia, el método de desinfección utilizado para esterilizar las pinzas de biopsia -óxido de etileno, glutaraldehído o glutaraldehído fenolato- no influyó en el rendimiento del cultivo de *H. pylori*, en relación al número de unidades formadoras de colonias y tiempo de incubación necesario.

La ingesta de algunos fármacos como por ejemplo sales de bismuto u otros antiácidos, antibióticos empleados en la pauta de erradicación o benzocaína, pueden estar implicados en falsos resultados negativos del cultivo [Dickey et al., 1996; Czinn et al 1989]. Es por este motivo, que todos los protocolos de endoscopia recomiendan la realización de esta prueba como elemento diagnóstico, tras un período de aclaramiento del efecto que esta medicación puede tener sobre el nicho ecológico de la bacteria. Se sabe que la ingesta de antiácidos desplaza la bacteria desde su localización original en el antro hacia el cuerpo gástrico [Logan et al., 1996], por lo que la endoscopia en enfermos que han estado sometidos a tratamiento con antiácidos, obliga a la toma de biopsias en esta última localización. Finalmente, también se ha responsabilizado a la propia bacteria su falta de crecimiento, imputándose a determinadas cepas, una dificultad adicional para su aislamiento, en función de su genotipo. Resulta curioso, la diferente distribución genotípica de cepas a lo largo de la geografía o la práctica ausencia de cepas descritas con el genotipo s2 / m1 [Letley et al., 1999]. Las formas cocoides, entendidas como una forma quiescente de vida de *Helicobacter pylori*, podrían considerarse también una forma “suicida” del microorganismo en condiciones de crecimiento hostiles, si bien se ha comprobado su viabilidad *in vivo* [Bode et al., 1993].

El cultivo de biopsias para el aislamiento de *Helicobacter pylori* se ha convertido en el método de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico de esta infección, debido en parte, a que es la única técnica que permite el aislamiento del agente causal y posibilita la realización de estudios de sensibilidad antibiótica, así como el estudio genotípico de la cepa gracias a las técnicas de biología molecular. Aunque existe una carencia en la estandarización de la metodología, la técnica más utilizada para la determinación de la susceptibilidad del microorganismo, es el método de Kirby-Bauer (difusión en agar), si bien

este método es inapropiado para microorganismos como *H. pylori*, que requieren atmósfera microaerofílica, prolongado tiempo de incubación y suplementos nutricionales en el medio de cultivo [Piccolomini et al., 1997]. Por este motivo, las últimas recomendaciones de la National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS, 2000], aconsejan testar la susceptibilidad mediante el método del E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia).

A la hora de realizar el antibiograma es necesario considerar algunos aspectos prácticos. La suspensión de la bacteria que se empleará para la inoculación del medio de cultivo, debe ser 2 en la escala de McFarland (aproximadamente 1×10^7 - 1×10^8 UFC/ml), para asegurar el crecimiento y la correcta determinación [NCCLS, 2000]. No es necesario testar todos los antibióticos disponibles, sino únicamente aquellos que se han demostrado eficaces en la pautas de erradicación. Así pues amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina y ciprofloxacino son de obligada determinación. Para pautas alternativas resulta de utilidad conocer la sensibilidad a eritromicina, clindamicina y rifampicina. También es posible estudiar la susceptibilidad a sustancias no antimicrobianas como las sales de bismuto o los inhibidores de la bomba de protones [Ansorg et al., 1996].

La interpretación de la sensibilidad de los aislamientos a todos los antibióticos en general y a metronidazol en particular, debe tener una especial consideración, ya que su resultado puede estar influenciado por el pH del medio en el que se produce la determinación *in vitro*, la atmósfera de incubación o la técnica empleada [Glupczynski et al., 1991]. Además, la NCCLS no ha establecido de una forma clara los puntos de corte a considerar en la interpretación del estudio de la sensibilidad para *H. pylori*, lo que genera una discrepancia de criterios al realizar estudios de sensibilidad por áreas geográficas, si como cabe pensar, cada autor utiliza sus propios puntos de corte.

En nuestro entorno, las cifras de resistencia a macrólidos se sitúan alrededor del 5 %. La resistencia constitutiva a metronidazol alcanza valores del 35 % [López-Brea et al., 1997] y éste es uno de los principales motivos que conducen al fracaso de las pautas de erradicación. Se ha relacionado la aparición de resistencia a metronidazol, con un antecedente de utilización de este antimicrobiano en el tratamiento de otro episodio infeccioso (diarrea por *Giardia lamblia* [*G. intestinalis*], vaginitis por *Trichomonas*

vaginalis ...) [Blaser, 1992]. Ante la sospecha de una previa exposición a antibióticos como claritromicina o metronidazol, es recomendable utilizar una pauta alternativa que no incluya ninguno de estos antimicrobianos. Al igual que otros autores en otros medios, no se ha descrito ninguna cepa con resistencia primaria a amoxicilina. De este modo, parece obligada una combinación de sustancias que incluya este antibiótico en las pautas de tratamiento erradicador de la infección por *H. pylori*.

La observación de este microorganismo en biopsias gástricas es también un método diagnóstico. Existen diferentes tinciones utilizadas en anatomía patológica para demostrar la presencia de la bacteria en las preparaciones histológicas: hematoxilina y eosina, Warthin-Starry (plata metenamina), Giemsa, ácido periódico de Schiff o incluso tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales [Ashton-Key et al., 1996]. Sin embargo, con una tinción de Gram a partir del homogeneizado de la biopsia gástrica que se utiliza para el cultivo microbiológico, a los ojos de un observador experimentado, puede ser suficiente para establecer el diagnóstico.

Tras el descubrimiento de *Helicobacter pylori*, Leunk [Leunk et al., 1988] demostró que aproximadamente la mitad de las cepas, independientemente del área geográfica de procedencia, eran capaces de inducir un efecto citopático *in vitro*, sobre líneas de cultivo celular (tox +). Rápidamente se dividieron los aislamientos en dos grupos, cepas citotóxicas y no citotóxicas, asociándose el primero de ellos con una mayor severidad en la patología gastroduodenal resultante [Figura et al., 1989]. Resulta interesante desde el punto de vista epidemiológico, determinar la toxicidad del aislamiento primero para ayudarnos a entender mejor la historia natural de la infección por *H. pylori* y, segundo, para verificar si el riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico puede ser conocido de antemano y por tanto prevenido.

Esta citotoxina posee un mecanismo de acción muy peculiar: inducir la formación *in vitro* de vacuolas intracitoplasmáticas en líneas de cultivo celular. El mecanismo de vacuolización fue establecido por Papini [Papini et al., 1993] que demostró que se trata de una toxina termolábil que estimula las bombas de protones de la célula, teniendo como diana una ATPasa intracitoplasmática. El resultado de la estimulación se traduce en la

formación de un gradiente de pH transmembrana, que atrae sustancias básicas por osmosis que inflan la célula hasta lograr su estallido y muerte celular. Sustancias básicas como la nicotina, pueden favorecer por sí misma este fenómeno, lo que se ha relacionado con la mayor prevalencia de úlcera duodenal en pacientes fumadores.

La determinación de la actividad citotóxica de los aislamientos de *H. pylori* por medio de líneas de cultivo celular, es una práctica generalizada. La vacuolización citoplasmática celular se evidencia de una forma clara en la línea celular HeLa. También han sido utilizadas otras líneas celulares con el mismo propósito: CHO, HEp-2 y Vero, siendo esta última la menos sensible al efecto citopático [Figura et al., 1989]. La práctica de esta técnica requiere la concentración del sobrenadante del medio líquido en el que crece la cepa de *H. pylori* que queremos estudiar. El caldo Brucella, es el mejor medio líquido para favorecer el crecimiento de *H. pylori* y expresar su actividad vacuolizante. Siempre trabajando en condiciones de esterilidad, para no contaminar la línea celular utilizada, podemos realizar diluciones dobles consecutivas en el ensayo, para de este modo titular la mínima dilución a la que está presente el efecto citopático. De acuerdo con esto, la detección de la actividad citotóxica es un procedimiento no excesivamente complicado y disponible como herramienta diagnóstica a la hora de determinar quien debe ser sometido a tratamiento de erradicación de la infección por *H. pylori*, considerando los efectos a largo plazo de las cepas citotóxicas [Figura, 1996].

A pesar de la buena disponibilidad de test serológicos comercializados, sus resultados deben ser interpretados con prudencia. Se considera la serología como un método global de diagnóstico, reflejo de la infección de la mucosa gástrica por *H. pylori*. La superficie del estómago tiene unos 700 cm². El método diagnóstico estándar basado en la biopsia, que representa un 0,001 % de la superficie, se considera sujeto a errores en la toma de muestras, dada la distribución irregular de la bacteria en el área gástrica. La serología puede resultar positiva en pacientes con gastritis atrófica [Karnes et al., 1991], donde el número de microorganismos es reducido y quizás indetectable por endoscopia o el test del aliento. Presumiblemente, los pacientes con atrofia gástrica continúan teniendo una serología positiva para *H. pylori*. Un paciente joven con sintomatología de dispepsia, con una serología negativa, predice una probabilidad de infección por *H. pylori* baja y no requiere

otras exploraciones complementarias. El mismo paciente con un test serológico positivo, éste tendrá un bajo valor predictivo y requerirá la confirmación con la ayuda de otros métodos diagnósticos. Por el contrario, en pacientes con úlcera péptica, un test serológico positivo no necesita confirmación. La serología se muestra como un excelente método de cribado en estudios epidemiológicos de grandes grupos de población [Pérez-Pérez et al., 1988].

La serología no se considera un buen método para monitorizar la respuesta al tratamiento, dado que los títulos de anticuerpos tardan de seis a doce meses en reducirse a la mitad [Kosunen et al., 1992]. No obstante esto se ha vinculado con el tipo de cepa que produce la infección. Las cepas citotóxicas están estrechamente relacionadas con la producción de la proteína asociada a la citotoxina (CagA) que actúa como un marcador de patogenicidad, correlacionándose con una mayor severidad al inducir una inflamación más severa por la activación de la IL-8, que puede conducir a un mayor grado lesión gástrica, si concurren otros factores predisponentes [Crabtree et al., 1993].

La clasificación histológica de las gastritis ha requerido una estandarización para poder evaluar uniformemente la variabilidad entre centros. Los estudios histológicos para cuantificar el daño tisular y la inflamación, requiere diferentes clasificaciones en función del propósito [Bayerdörffer et al., 1992]. *Helicobacter pylori* está frecuentemente asociado a gastritis crónica superficial y su patrón más característico es un infiltrado inflamatorio de células mononucleares asociado a un infiltrado de neutrófilos en el epitelio, no estando específicamente asociado a cambios metaplásicos, formación de granulomas o atrofia de las glándulas del fundus gástrico [Dixon, 1995]. La magnitud de la inflamación varía desde una mínima infiltración de la lámina propia con la estructura glandular intacta hasta una severa inflamación con formación de microabscesos y aparición de atipias [Genta et al., 1994]. Concomitantemente aparecen cambios degenerativos en la superficie del epitelio, incluyendo deplección de la capa de moco, vacuolización citoplasmática y desestructuración de la arquitectura glandular. Tras erradicar la infección por *H. pylori*, muchas de estas anomalías desaparecen, aunque el infiltrado de células mononucleares persiste durante meses [Dixon, 1995].

La respuesta inflamatoria a *H. pylori* en niños difiere ostensiblemente a la observada en adultos. La endoscopia revela un fino infiltrado nodular de la mucosa gástrica, que se corresponde microscópicamente con una hiperplasia linfonodular, especialmente localizada en el antro [Genta et al., 1993]. Estos agregados linfocitarios frecuentemente contienen centros germinativos activados. Además, la cantidad del infiltrado por neutrófilos es menor al observado en adultos.

La PCR ha cambiado la Biología Molecular, abriendo un nuevo horizonte en el campo del diagnóstico [Mullis, 1990]. La aplicación de esta técnica a la investigación de *Helicobacter pylori* ha permitido la clonación y secuenciación de genes implicados en la colonización y patogénesis de la bacteria [Tomb et al., 1997]. Entre las causas de falsos negativos se contempla la falta, en la cepa en estudio, del gen diana, dada la heterogeneidad existente entre cepas de *H. pylori*, lo que obliga a una cuidadosa elección de los iniciadores o “*primers*”. También existen inhibidores de la *Taq* polimerasa que pueden artefactar la reacción. La causa más frecuente de una reacción falsa negativa es la presencia de microorganismos o material genético por debajo del umbral de detección de la técnica. Si bien la especificidad de esta prueba es muy alta, es teóricamente posible la aparición de una reacción falsa positiva, por reacción cruzada con otras especies del género *Helicobacter* o incluso *Campylobacter*.

En la última década han aparecido variaciones de la técnica original, encaminadas a evitar estas limitaciones, así la PCR-retrotranscriptasa (RT-PCR), la PCR anidada, la PCR basada en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), la PCR basada en la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (PCR-RAPD)... han permitido aumentar las aplicaciones especialmente al campo de la epidemiología y la clínica [Hua et al., 1996]. Estas técnicas permiten diferenciar cepas entre sí, argumentar posibles vías de transmisión, determinar la diseminación entre miembros de una misma familia, discriminar entre reinfección o fracaso terapéutico, constatar la coinfección por más de una cepa en un paciente ...

Los estudios de biología molecular, por amplificación de ADN mediante la técnica de la PCR, revelan que existe una diversidad genética entre cepas en nuestro entorno. En nuestra experiencia todas las cepas de *Helicobacter pylori* tienen presente el gen que codifica la citotoxina vacuolizante (*vacA*), con una de las seis posibles formas de presentación, a excepción de la forma s2/m1, que no ha sido descrito por ningún grupo de trabajo hasta el momento. El 55 % de las cepas presentan el gen que codifica para el marcador de patogenicidad CagA. El 30 % de cepas poseen efecto citopático *in vitro* sobre líneas de cultivo celular (tox +), y se corresponden con el genotipo *vacA* s1 / m1. Esta misma característica se ha relacionado con el potencial ulcerogénico de las cepas de *H. pylori*, con predominio de este genotipo en pacientes con úlcera péptica.

Estudios realizados en otras poblaciones demuestran la existencia de variaciones geográficas en el genotipo de cepas de *H. pylori*. Así por ejemplo, en la población portuguesa, el genotipo s1b es el más frecuente, mientras en la holandesa resulta más común el s1a. Japón muestra una mayor homología entre sus aislamientos, de forma que el 96 % de la población estudiada posee el genotipo *vacA* s1a / m1. En Alemania, el 96 % de los enfermos afectados de úlcera péptica poseen un genotipo s1, el 4 % restante son s2, genotipo que está presente en el 31 % de los enfermos con dispepsia no ulcerosa. [Marais et al., 1999]. No obstante, la gran variedad de genotipos realza el papel fisiopatológico que juegan en la enfermedad ulcerosa otros aspectos como la propia susceptibilidad del huésped o factores ambientales.

La variabilidad a nivel del péptido señal s está relacionada con los diferentes niveles de producción de citotóxina y se establece como marcador potencial de la virulencia de las cepas según su genotipo. Las cepas s1a producen los mayores niveles de actividad citotóxica, seguido de las s1b; cepas s2 generalmente no producen o a muy bajo nivel, actividad citotóxica [Atherton et al., 1995]. De forma similar, cepas s1a (independientemente del tipo de región media) se asocian con los mayores niveles de inflamación gástrica, mientras las cepas m1 (independientemente del tipo de secuencia señal) se asocian con un mayor grado de lesión en el epitelio gástrico [Atherton et al., 1996].

La infección por cepas *cagA* + aumentan el riesgo de desarrollar úlcera duodenal y adenocarcinoma distal gástrico comparado con las infecciones producidas por cepas *cagA* - [Blaser, 1996]. Una persona portadora de una cepa *cagA* +, *vacA* s1a, *iceA* 1 posee un mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal que otra portadora de otros alelos diferentes para los genes *vacA* e *iceA* y *cagA* - [Blaser, 1998]. Estudios recientes demuestran que el riesgo de adenocarcinoma gástrico proximal decrece en personas infectadas con cepas *cagA* - [Chow et al., 1998]. Estos datos confieren una enorme relevancia clínica, a la tipificación por biología molecular de las cepas de *Helicobacter pylori*, ya que existe una gran variabilidad entre los aislamientos naturales de *H. pylori*, como ha podido observarse por estudios de polimorfismo [van der Ende et al., 1996].

H. pylori posee diferentes mecanismos -mutaciones puntuales, mosaicismo en genes conservados, pérdida de otros genes, reordenamientos cromosómicos- que contribuyen a su diversidad genética, generando una heterogeneidad entre la población bacteriana, incluso intrapaciente, capaz de explicar las diferentes enfermedades vinculadas a la infección [Marais et al, 1999]. Esto, a su vez sugiere una continua evolución de las cepas en su adaptación al nicho ecológico, por la presión selectiva a la que están sometidas.

No cabe duda que cuando ha sido posible el aislamiento de *Helicobacter pylori in vitro*, se ha abierto una nueva vía de investigación. La vinculación de esta bacteria a enfermedades de una alta prevalencia en la sociedad como la úlcera péptica o el cáncer gástrico [Parsonnet et al., 1991], su relación con otras tan dispares como la cardiopatía isquémica [Mendal et al., 1994] o el retraso de crecimiento en los niños [Patel et al., 1994], han actuado de revulsivo en la búsqueda de modelos experimentales que reprodujeran las circunstancias vitales que ocurren en el hombre, con el propósito de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos más íntimos de este microorganismo y su interacción con su huésped habitual. Otras enfermedades como la anorexia nerviosa, la rosacea ... se han venido vinculando también con la infección por *H. pylori* [Howden et al., 1996] sin que por el momento existan estudios válidos que confirmen estas hipótesis.

La aparición de los modelos experimentales en animales son por el momento, la mejor aproximación a la situación fisiopatológica que se produce en el hombre cuando se encuentra colonizado e infectado por esta bacteria. En un principio los esfuerzos fueron dirigidos a la búsqueda y síntesis de una vacuna que resultase efectiva, al diseño de pautas eficaces de erradicación de la infección o al ensayo de nuevas sustancias antibióticas. Por extensión, los modelos animales también han ayudado a un mejor conocimiento de la interacción huésped-bacteria, de los mecanismos de la inmunidad que se ponen en marcha ante un microorganismo que ocupa un nicho tan particular como la capa de moco gástrico.

La colonización de la mucosa gástrica en el modelo experimental animal, está relacionada con el genotipo de la cepa, de forma que cepas *tox + / cagA +* consiguen una tasa de infección superior en ratones, produciendo un infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear, a diferencia de lo que sucede en el hombre, donde predomina el infiltrado de tipo polimorfonuclear. En patología gastroduodenal crónica, las cepas *tox + / cagA +* son más agresivas en su potencial ulcerogénico, posiblemente debido a la presencia del gen *cagA*, que actuaría como un marcador de patogenicidad, potenciando la actividad citotóxica vacuolizante de las cepas *vacA +*. Las cepas *cagA - / tox -* tienen un menor potencial ulcerogénico [Blaser, 1996].

Helicobacter pylori es el agente de la infección crónica más frecuente en el hombre, tras la caries dental. Este microorganismo causa una intensa reacción inflamatoria, donde los factores que sostienen la misma no están totalmente esclarecidos. *H. pylori* recluta células inflamatorias que infiltran y lesionan la mucosa gástrica, erigiéndose en el principal agente entre las enfermedades inflamatorias crónicas. Uno de los problemas es el desconocimiento de otras infecciones bacterianas crónicas en el hombre, por lo que el conocimiento del proceso inflamatorio o los factores de virulencia de otras enfermedades infecciosas, difícilmente pueden ser extrapolados a la infección por *H. pylori*. La infección estimula la respuesta inflamatoria local y sistémica gracias al estímulo inmunológico que representa la difusión de sustancias quimiotácticas a través del epitelio, que activan los neutrófilos y el resto de células inflamatorias [Kozol et al., 1991, Figura, 1995].

El hecho de que *H. pylori* no tenga competidores en su nicho ecológico, le proporciona una ventaja competitiva en su evolución, mediante una asombrosa habilidad para reorganizar su genoma, con una amplia variedad genotípica y fenotípica no solo entre cepas, sino también en un mismo individuo infectado [Owen et al., 1993]. La variabilidad genómica entre cepas, puede tener repercusiones en la respuesta inflamatoria provocada por el microorganismo. Cepas que expresan la citotoxina VacA y la proteína asociada a la citotoxina CagA, muestran una mayor secreción de IL-8 por las células del epitelio gástrico [Cabtree et al., 1994, Ghiara et al., 1995]. La expresión epitelial de IL-8 se encuentra también regulada por otras citocinas, el TNF- α y la IL-1, producidas por las células inflamatorias.

El-Omar [El-Omar et al., 1994] sugiere que la inflamación es esencial para la supervivencia de *H. pylori*, ya que la infección se mantiene siempre que persista la inflamación. La importancia de las células inflamatorias en el epitelio gástrico ha sido confirmada por Mezey [Mezey et al., 1992], que ha descrito la presencia de receptores para histamina, muscarina, gastrina y dopamina en los inmunocitos (plasmocitos, macrófagos y células T) localizados en la lámina propia del epitelio gástrico en condiciones normales. La existencia de inmunocitos en la mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori*, supera en cantidad el proceso normal, por lo que resulta factible pensar que la inflamación inducida por la infección afecta la respuesta fisiológica gástrica.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel crucial de las interacciones leucocito-célula endotelial en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria [Carlos et al., 1994]. El infiltrado celular propio de los tejidos inflamados es el resultado de complejas interacciones entre la superficie endotelial y los leucocitos circulantes, que se producen fundamentalmente a nivel de las vénulas postcapilares. Dichas interacciones, en las que intervienen tanto moléculas expresadas en la superficie celular endotelial y leucocitaria (moléculas de adhesión), como productos derivados de la activación celular (óxido nítrico, radicales libres de oxígeno) han sido bien caracterizadas *in vitro* e *in vivo* [Panés et al., 1994].

El fenómeno inflamatorio se inicia con la liberación de mediadores que inducen la activación de células endoteliales. Estos mediadores son producidos por las células inflamatorias locales (macrófagos, fibroblastos, células cebadas) en respuesta a estímulos externos o endógenos. Citocinas pro-inflamatorias como el TNF α , IL-1 e interferón-gamma ejercen un papel activador sobre las células endoteliales. Esta activación conduce a la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) y la producción de sustancias quimiotácticas (prostaglandinas, leucotrienos, factor C5a del complemento, PAF, quimiocinas) que atraen leucocitos hacia el foco inflamatorio [Sánchez-Madrid et al., 2000]. Durante el proceso de extravasación de leucocitos, distintos receptores de adhesión participan de un modo cooperativo y secuencial en las diferentes etapas de la interacción de los leucocitos con el endotelio.

En dichas interacciones, inicialmente se produce una marginación de los leucocitos hacia la periferia de la luz venular, donde pueden establecer interacciones débiles mediadas básicamente por selectinas, produciéndose el fenómeno de rodamiento o “rolling” leucocitario sobre las células endoteliales. El siguiente paso es la adhesión firme de los leucocitos al endotelio, regulada por β_2 integrinas (especialmente CD11/CD18) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 y VCAM-1). Tras la adhesión se produce la migración leucocitaria al espacio intersticial, que puede producirse por las uniones inter-endoteliales o a través de las células endoteliales, proceso mediado por las moléculas de adhesión ICAM y PECAM [Crowe et al., 1995, Enders et al., 1995]. En la actualidad se dispone de anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas moléculas, lo que ha permitido determinar su nivel de expresión y su importancia en distintos modelos de inflamación.

Hasta la actualidad, el papel de la respuesta inflamatoria en la patogenia de las lesiones asociadas a la infección por *Helicobacter pylori* se ha estudiado mediante modelos experimentales que difieren de forma sustancial de la situación clínica real. Sin embargo, dichos estudios han permitido obtener suficientes evidencias que otorgan a la respuesta inflamatoria un papel clave en la patogenia de la infección. Se ha conseguido reproducir en el ratón un modelo experimental de colonización por *H. pylori* que comporta el desarrollo de fenómenos inflamatorios en la mucosa gástrica murina [Marchetti et al., 1995]. Utilizando dicho modelo y mediante técnicas de microscopía intravital específicamente

adaptadas al estudio de la microcirculación gástrica, se han podido efectuar estudios que demuestran que la infección por *H. pylori* comporta en el ratón un incremento en los fenómenos de “rolling” leucocitario dependiente de la expresión de selectina P plaquetar.

En animales inoculados con *H. pylori* y en pacientes infectados de forma crónica por este microorganismo se ha podido comprobar que existen marcados fenómenos de activación plaquetar, traducidos en un incremento significativo en la expresión de la molécula de adhesión selectina P en las plaquetas circulantes. La activación plaquetar constituye un paso previo a su agregación y juega un papel prominente en la fisiopatología de la aterosclerosis y en el desarrollo de fenómenos isquémicos coronarios agudos [Mendal et al., 1994]. La demostración de la existencia de fenómenos de activación plaquetar en la infección por *H. pylori*, no sólo proporciona información sobre los mecanismos celulares involucrados en el daño local asociado a la infección sino que permite ofrecer un nexo fisiopatológico para la asociación epidemiológica propuesta entre la infección por *H. pylori* y la cardiopatía isquémica.

Se desconoce el significado de la activación plaquetar en la infección por *H. pylori* y si traduce una participación activa de las plaquetas en los fenómenos inflamatorios desencadenados por la infección o, por el contrario, supone un marcador de otros fenómenos. Las interacciones leucocito-plaqueta-endotelio en otras situaciones patológicas como el shock séptico poseen una especial relevancia ya que permiten la síntesis transcelular de leucotrienos o tromboxanos [Frenette et al., 1995]; además, existen evidencias de que las plaquetas pueden ser activadas por los leucocitos, y éstos a su vez, pueden activarse generando radicales libres de oxígeno [Colli et al., 1996] o PAF [Elstad et al., 1995] tras contactar con plaquetas activadas.

Por otro lado, en diversos modelos experimentales de daño gástrico se ha comprobado el papel crucial que en su desarrollo juegan las alteraciones del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica [Panés et al., 1994]. Sin embargo, hasta la actualidad no se han aportado datos concluyentes sobre la existencia de alteraciones del flujo sanguíneo asociados a la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, y al posible papel que pueda jugar en ellos la síntesis de óxido nítrico o la activación de factores de transcripción como NF-kB o

AP-1 involucrados en la regulación de la expresión de éste y otros enzimas. Cada vez existe más controversia sobre el posible efecto potenciador o protector de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* sobre el daño inducido por AINEs.

A pesar de que algunos autores sugieren la existencia de un efecto potenciador, datos recientes, incluyendo estudios de nuestro grupo sobre el modelo experimental de infección por *H. pylori*, indican que la infección por *Helicobacter* podría proteger del daño inducido por AINEs, en las fases más precoces de la infección, donde la hiperemia de la mucosa gástrica y el aumento de producción de óxido nítrico contrarrestarían el efecto potenciador de la lesión por AINEs [Elizalde et al., 1999]. Estos datos sugieren que la lesión gástrica inducida por AINEs cambia en el curso de la infección por *H. pylori*, probablemente dependiendo de la reacción inflamatoria subyacente desencadenada por la bacteria, aunque se desconocen los mecanismos a través de los cuáles tendría lugar esta interacción.

Se ha sugerido la necesidad de tratar la infección por *H. pylori* en sujetos que toman AINEs. Los pacientes infectados tienen mayores niveles de prostaglandinas en la mucosa gastroduodenal y esto puede reducir el efecto de los AINEs y potenciar el efecto antiulceroso de los antisecretores. La eliminación de *H. pylori* no es mejor que la ausencia de tratamiento en la prevención de la recidiva ulcerosa. El tratamiento de mantenimiento con omeprazol es más eficaz que la erradicación de la infección en la prevención de las complicaciones. En el momento actual y con los estudios disponibles, se recomienda no erradicar *H. pylori* en sujetos con antecedentes de úlcera que precisen tomar AINEs [Hawkey et al., 1998, Yeomans et al., 1998].

Durante los últimos años se ha postulado que la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* constituiría un factor de riesgo no sólo para la enfermedad ulcerosa péptica, sino también para otras patologías distantes, incluyendo diversas enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos fisiopatológicos responsables de dicha asociación no han sido totalmente establecidos, aunque los datos indican que la presencia del germen en la mucosa gástrica condiciona un estado de activación plaquetar que, por otro lado, se ha visto involucrada en la fisiopatología de las lesiones coronarias.

Mejorar nuestro conocimiento acerca de la cascada inflamatoria puede conducir a esclarecer el papel de *H. pylori* en la patogénesis de determinadas enfermedades y síndromes, cuya etiología es hasta hoy desconocida.

VI. CONCLUSIONES

Objetivo 1

1.- El método utilizado en la esterilización (óxido de etileno, glutaraldehído o glutaraldehído fenolato) de las pinzas de biopsia, no se ha demostrado como una causa de falsos negativos en la recuperación de aislamientos de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de mucosa gástrica.

Objetivo 2

2.- Las técnicas de biología molecular permiten genotipificar las cepas de *Helicobacter pylori*, de forma que existe una gran diversidad de genotipos entre las cepas aisladas en nuestro medio.

3.- Todos los aislamientos de *Helicobacter pylori* estudiados presentan el gen *vacA*, y aproximadamente la mitad, presentan el gen *cagA*. El genotipo *vacA* s1/m1 / *cagA* +, se asocia con la formación de vacuolas en líneas de cultivo celular (tox +).

Objetivo 3

4.- La inoculación de ratones con aislamientos frescos de *Helicobacter pylori* permite disponer de un modelo experimental animal que reproduce la patología gastroduodenal observada en el hombre.

5.- La capacidad de las cepas de *Helicobacter pylori* para colonizar la mucosa gástrica del modelo animal en ratón, depende del genotipo de la cepa. Cepas con los marcadores de patogenicidad *cagA* así como la citotoxina, muestran un 70 % de colonización, frente al 33 % cuando ambos marcadores están ausentes.

6.- En la infección por *Helicobacter pylori* existen diferencias en la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica en el modelo animal respecto a la observada en el hombre. El infiltrado celular muestra un predominio de células mononucleares en el ratón, mientras en el hombre predominan los leucocitos polimorfonucleares.

Objetivo 4

7.- La infección por *Helicobacter pylori* induce la aparición de leucocitos rodantes, así como la formación de agregados plaquetarios y leucocito-plaquetarios en la microcirculación gástrica del modelo animal en ratón.

8.- En la aparición del fenómeno del “*rolling*” leucocitario y en la formación de agregados leucocito-plaquetarios se encuentran implicadas las moléculas de adhesión selectina L y selectina P, pero no selectina E.

9.- Los agregados plaquetarios circulantes y las plaquetas activadas también se detectan en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*, y representan factores potenciales que contribuyen a la disfunción de la microcirculación y de la inflamación celular asociada a la fisiopatología de las enfermedades relacionadas con *H. pylori*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abdalla S, Marco F, Pérez RM, Piqué JM, Bordas JM, Jiménez de Anta MT et al. Rapid detection of gastric *Campylobacter pylori* colonization by a simple biochemical test. *J Clin Microbiol* 1989; 11: 2604-2605.

Akamatsu T, Tabata K, Hironga M, Kawakami H, Uyeda M. Transmisión of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am J Infect Control* 1996; 24: 396-401.

Ansorg R, von Reckinghausen G, Heintschel von Heinegg E. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to simethicone and other non-antibiotic drugs. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 45-52.

Ashton-Key MT, Diss TC, Isaacson PG. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol* 1996; 49: 107-111.

Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.

Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaiser MJ. The clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, encoding the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1996; 112: 92-99.

Atherton JC. Non-endoscopic test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 (Suppl. 1): 11-20.

Bayerdörffer E, Lehn N, Hatz R, Mannes GA, Oertel H, Sauerbruch T et al. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* 1992; 102: 1575-1582.

Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1995; 345: 1591-1594.

Berstad K, Sjødahl R, Berstad A. Phospholipase A2 activity in gastric juice from patients with active and *Helicobacter pylori*-eradicated healed duodenal ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 175-180.

- Blaser MJ.** Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis and peptic ulcer. *Gastroenterology* 1987; 93: 371.
- Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* : its role in disease. *Clin Infec Dis* 1992; 15: 386-393.
- Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29 (Suppl 205): 1-5.
- Blaser MJ.** Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 (Suppl 1): 73-7.
- Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Clin Rev* 1998; 316: 1507-1510.
- Bode G, Mauch F, Malfertheines P.** The coccoid forms of *Helicobacter pylori* . Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 1993; 111: 483-490.
- Boring CC, Squires TS, Yamamoto Y.** Gene rearrangements, *Helicobacter pylori*, and gastric MALT lymphoma. *Lancet* 1994; 343: 1636.
- Borody TJ, Shortis NP, Cgongnan J, Reyes E, O'Shea JE.** Eradication failure (EF) after *H. pylori* treatment- further therapies. *Gastroenterology* 1996; 110: A67.
- Carlos TM, Harlan JM.** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
- Censini S, Lange C, Xiang ZY, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M et al.** Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 14648-14653.
- Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ.** An inverse relation between *cagA* + strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 588-590.
- Cohen H, Retama B, Johnson C, Rose A, Pronovost AD, Laine L.** Evaluation of a rapid test to detect IgG antibodies to *Helicobacter pylori* using fingerstick whole blood samples. *Gastroenterology* 1996; 110: A83.
- Cohen H, Laine L.** Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 (Suppl. 1): 3-9.
- Colli S, Eligini S, Lalli M, Tremoli E.** Platelet-neutrophil interaction and superoxide anion generation: involvement of purine nucleotides. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 271-278.
- Correa P.** Chronic gastritis: a clinico-pathological classification. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 504-509.

- Correa P.** Human gastric carcinogenesis – a multistep and multifactorial process – first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740.
- Covacci A,** Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5791-5795.
- Cover TL,** Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Bio Chem* 1992; 267: 10570-10575.
- Cover TL,** Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser NJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10566-10573.
- Crabtree JE,** Farmery S, Lindley IJD, Peich P. Cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* induce IL - 8 production by gastric epithelial cells. *Acta Gastro-Enterol Belg* 1993; 56 (Suppl): 48.
- Crabtree JE,** Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with *cagA* positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995; 48: 41-45.
- Crabtree JE,** Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338: 332-335.
- Crowe SE,** Álvarez L, Dytoc M, Hunt RH, Muller M, Sherman P et al. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology* 1995; 108: 65-74.
- Czinn SJ,** Carr HS, Speck WT. Effect of topical anesthetic agents on *Campylobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 9: 46-48.
- Davies GR,** Banatvala N, Collins CE, Sheaff MT, Abdi Y, Clements L et al. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 419-424.
- De Boer WA,** Tytgat GNJ. The best therapy for *Helicobacter pylori* infection: should efficacy or side effect profile determine our choice? *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 401-407.

- Dickey W**, Kenny BD, McConnell JB. Effect of proton pump inhibitors on the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 289-293.
- Dixon MF**. Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995; 9: 467-486.
- Dixon MF**, Genta RM, Yardley JH, Correa P, and the participants in the International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston, Texas, 1994: Clasification and grading of gastritis. The updated Sidney system. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181.
- Dunn BE**, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 4: 720-741.
- Eaton KA**, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1991; 59: 2470-2475.
- Eaton KA**, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 3604-3607.
- Eaton KA**, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996; 64: 2445-2448.
- Elizalde JI**, Méndez A, Pizarro MA, Gómez J, Panés J, Qintero E et al. NSAID-Induced gastric damage in a mouse model of *H. pylori* infection. Role of nitric oxide and blood flow. *Gut* 1999; 45: (Suppl. III): A38.
- Elstad MR**, La Pine TR, Cowley S, McEver RP, McIntyre TM, Prescott Sm et al. P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J Immunol* 1995; 155: 2109-2122.
- El-Omar E**, Penman I, Dorrian CA, Ardill JES, McColl KEL. Eradicating *Helicobacter pylori* infection lowers gastrin mediated acid secretion by two-thirds in patients with duodenal ulcer. *Gut* 1993; 34: 1060-1065.
- El-Omar E**, Penman I, Cruikshank G, Dover S, Banerjee S, Williams C et al. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut* 1994; 35: 1385-1388.
- Enders G**, Brookx W, VonJan N, Lehn N, Bayerdorffer E, Hatz R. Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins: comparison with membrane proteins from other bacteria. *Infect Immun* 1995; 63: 2473-2477.

Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA et al. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 225-226.

Figura N. Progress in defining the inflammatory cascada. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 296-302.

Figura N. Culture of *Helicobacter pylori* in broth, determination of vacuolising activity of bacterial broth cultures and neutralisation of the vacuolising activity. En: Lee A, Mégraud F. *Helicobacter pylori*. Techniques for clinical diagnosis & basic research. Saunders. London 1996; 224-234.

Forman D, Webb PM. *H. pylori* and gastric cancer; the significance of the problem. En: Hunt RH, Tytgat GNJ. *Helicobacter pylori*. Basic mechanisms to clinical cure. Kluwer Academic Publishers. London 1994; 461-468.

Frenette PS, Johnson RC, Hynes R, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 7450-7454.

Genta RM, Graham DY. *Helicobacter pylori*: the new bug on the (paraffin) block. *Virchows Arch* 1994; 425: 339-347.

Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori* : a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest Endosc* 1994; 40: 342-345.

Genta RM, Hammer HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol* 1993; 24: 577-583.

Glupczynski Y, Labbè M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2072-2075.

Glupczynski Y. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. En: Lee A, Mégraud F. *Helicobacter pylori*. Techniques for clinical diagnosis & basic research. Saunders. London 1996; 17-32.

Ghiara P, Marchetti M, Blaser MJ, Tummuru MKR, Cover TL, Segal DE et al. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* 1995; 63: 4154-4160.

- Goodwin CS**, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collind MD, Sly L et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nova. as *Helicobacter pylori* comb. nova. and *Helicobacter mustelae* comb. nova., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405.
- Goodwin CS**, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol* 1990; 9: 1-13.
- Grübel P**, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. Vector potential of Houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1300-1303.
- Hachem CY**, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. Comparison of agar media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; 48: 714-716.
- Harris PR**, Mobley HL, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 1996; 111: 419-425.
- Hawkey CJ**, Tullasay Z, Szczapanski L, van Resenburg CJ, Filipowicz A, Lanas A et al. *Helicobacter pylori* eradication in patients taking nonsteroidal antiinflammatory drugs: The HELP NSAIDS Study. *Lancet* 1998; 352: 1016-1021.
- Howden CW**. Clinical Expressions of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* 1996; 100: (Suppl 5A): 5A-27S.
- Hua J**, Birac C, Mégraud F. PCR-based RAPD (random amplified polymorphic DNA) “fingerprinting” of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. En: Lee A, Mégraud F. *Helicobacter pylori*. Techniques for clinical diagnosis & basic research. Saunders. London 1996; 121-126.
- Iwahi T**, Satoh H, Nakao M, Iwasaki T, Yamazaki T, Kubo K et al. Lansoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor, and its related compounds have selective activity against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 490-496.
- Karnes WE**, Samloff MI, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991; 101: 167-174.
- Khulusi S**, Mendall MA, Badvr S, Patel P, Finlayson C, Northfield TC. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric metaplasia of the duodenum. *Gut* 1995; 36: 193-197.

- Kist M**, Spiegelhalder C, Moriki T, Schaefer HE. Interaction of *Helicobacter pylori* (strain 151) and *Campylobacter coli* with human peripheral polymorphonuclear granulocytes. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 280: 58-72.
- Kjöller M**, Fisher A, Justesen T. Transport conditions and number of biopsies necessary for culture of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 166-167.
- Kosunen TU**, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 1995; 11 (Suppl 1): 5-10.
- Kosunen TU**, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992; 339: 893-895.
- Kozol R**, Domanowski A, Jaszewski A, Czanko R, McCurdy B, Prasad M et al. Neutrophil chemotaxis in gastric mucosa: a signal-to-response comparison. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1277-1280.
- Kreiss C**, Blum AL, Malfertheiner P. Peptic ulcer pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 1995; 11 (Suppl 1): 25-31.
- Laine L**, Chung D, Stein C, El-Beblawi I, Sharma V, Chandrasoma P. The influence of size and number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 49-53.
- Laine L**, Estrada R, Lewin DN, Cohen H. The influence of warming on rapid urease test results -a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 429-432.
- Letley DP**, Lastovica A, Louw JA, Hawkey CJ, Atherton JC. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1203-1205.
- Leunk RD**, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93-99.
- Leunk RD**. Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev Infect Dis* 1991; 13 (Suppl 8): 5686-5689.
- Leying H**, Suerbaum S, Geis G, Haas R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol* 1992; 6: 2863-2874.
- Li CF**, Ha TZ, Ferguson DA, Chi DS, Zhao RG, Patel NR et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva and feces -evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2142-2149.

- Lingwood CA.** *Helicobacter pylori*: receptors and adhesins. En: Goodwin CS, Worsley BW. *Helicobacter pylori* : biology and clinical practice. CRC Press. Boca Raton, Fla. 1993; 209-222.
- Logan RP,** Walker MM, Misiewicz JJ, Gummett PA, Karim QN, Baron JH. Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut* 1996; 36: 12-16.
- López-Brea M,** Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 279-281.
- Marais A,** Mendz GL, Hazell SL, Mégraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 642-674.
- Marchetti M,** Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 267: 1655-1658.
- Mendall MA,** Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D et al. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 1994; 71: 437-439.
- Mezey E,** Palkovits M. Localization of targets for anti-ulcer drugs in cells of the immune system. *Science* 1992; 258: 1662-1665.
- Minnis JA,** Taylor TE, Knesek JE, Peterson WL, McIntire SA. Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid* 1995; 34: 22-36.
- Mitchell HM,** Lee A, Ca'rrick J. Increased incidence of *Campylobacter pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person-to-person transmission. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 396-400.
- Moran A P.** The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 (Suppl 1): 39-50.
- Moss SF,** Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501.
- Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 579-582.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Approved Standard M7-A5. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.

- Nielsen H**, Andersen LP. Cellular immunity to *Helicobacter pylori*. En: Goodwin CS, Worsley BW. *Helicobacter pylori: biology and clinical practice*. CRC Press. Boca Raton, Fla. 1993: 257-271.
- Ottlecz A**, Romero JJ, Hazell SL, Graham DY, Lichtenberger LM. Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2071-2080.
- Owen RJ**, Desai M, Figura N, Bayeli PF, Di Gregorio L, Russi M et al. Comparison between degree of histological gastritis and DNA fingerprints, cytotoxicity and adhesivity of *Helicobacter pylori* from different gastric sites. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 315-321.
- Panés J**, Casadevall M, Piqué JM, Bosch J, Whittle BJR, Terés J. Effects of acute normovolemic anemia on gastric mucosal blood flow in rats: role of nitric oxide. *Gastroenterology* 1992; 103: 407-413.
- Papini E**, Bugnoli M, Debernard M, Figura N, Rappuoli R, Montecucco C. Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. *Mol Microbiol* 1993; 7: 323-327.
- Parsonnet J**, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131.
- Patel P**, Mendall M, Northfield E, Vandenplas Y. *H. pylori* infection in children: risk factors and a possible effect on growth. *BMJ* 1994; 309: 1119-1123.
- Peek RM**, Thompson SA, Atherton JC, Blaser MJ y Miller GG. Expression of *iceA*, a novel ulcer-associated *Helicobacter pylori* gene, is induced by contact with gastric epithelial cells and is associated with enhanced mucosal IL-8. *Gut* 1996; 39: A71.
- Perez-Perez, GI**, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med* 1988; 109: 11-17.
- Phadnis SH**, Ilver D, Janzon L, Normak S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 1557-1565.
- Piccolomini R**, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E test, agar dilution and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1842-1846.

- Rautelin H**, Blomberg B, Fredlund H, Järnerot G, Danielson D. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. *Gut* 1993; 34: 599-603.
- Sadowski D**, Cohen H, Laine L, Greenberg J, Goldstein J, Mihalov M et al. Evaluation of the Flexsure HP fingerprick blood test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1996; 110: A246.
- Sáinz R**, Mearín F, Piqué JM, Saperas E, Lanás A, Borda F. Enfermedades del estómago y del duodeno. En: Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. Harcourt. Madrid 2000; 132-180.
- Sánchez-Madrid F**, González-Amaro R. Integrinas y otras moléculas de adhesión. En: Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. Harcourt. Madrid 2000; 3106-3112.
- Sharma SA**, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 reponse of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun* 1995; 63: 1681-1687.
- Spiegelhalder C**, Gerstenecker A, Kersten E, Schiltz E, Kist M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun* 1993; 61: 5315-5325.
- Sobhani I**, Bado A, Cherifi Y, Moizo L, Laigneau JP, Pospai D et al. *Helicobacter pylori* stimulates gastric acid secretion via platelet activating factor. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47: 177-185.
- Stubbs JB**, Marshall BJ. Radiation dose estimates for the carbon-14-labeled urea breath test. *J Nucl Med* 1993; 34: 821-825.
- Suerbaum S**, Thilberge J-M, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol* 1994; 14: 959-974.
- Telford JL**, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179: 1653-1658.
- Tham KT**, Peek RM, Blaser MJ, Cover TI. Specific *Helicobacter pylori* vacA genotypes are associated with presence of duodenal and gastric ulceration and degree of gastric inflammation. *Gut* 1995; 37 (Suppl 1): A3-9.

- Thomas JE**, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340: 1194-1195.
- The Eurogast Study Group**. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341: 1359-1362.
- Tomb JF**, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.
- Tummuru MKR**, Cover TL, Blaser MJ. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 2609-2613.
- Vandamme P**, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bact* 1991; 41: 88-103.
- van der Ende A**, Rauws EAJ, Feller M, Mulder CJJ, Tytgat GNJ, Dankert J. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 638-647.
- Versalovic J**, Fox JG. *Helicobacter*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM. Washington 1999; 727-738.
- Wang WM**, Chen CY, Jan CM, Chen LT, Perng DS, Lin SR et al. Long-term follow-up and serological study after triple therapy of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1793-1796.
- Webb PM**, Knight T, Creaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J et al. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person-to-person transmission in early life. *BMJ* 1994; 308: 750-753.
- Wilson KT**, Ramanujam KS, Mobley HLT, Musselman RF, James SP, Meltzer SJ. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterology* 1996; 111: 1524-1533.
- Wright PA**, Williams GT. Gastric carcinoma. En: Quirken P. *Molecular biology of digestive disease*. BMJ Publishing Group. London 1994; 44-51.
- Wirth HP**, Yang MQ, Karita M, Blaser MJ. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status. *Infect Immun* 1996; 64: 4598-4605.

Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R et. al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun* 1995; 63: 94-98

Yeomans ND. Role of bacterial overgrowth in gastric carcinogenesis. En: Hunt RH, Tytgat GNJ. *Helicobacter pylori*. Basic mechanisms to clinical cure. Kluwer Academic Publishers. London 1994; 475-482.

Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, Rensburg CJ et al. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1998; 338: 719-726.

VIII. DIRECCIONES DE INTERNET

<http://www.helico.com>

Información general sobre la infección por *Helicobacter pylori*.

<http://www.cdc.gov/ulcer>

Web del Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Información actualizada sobre la ulcera péptica y su impacto socioeconómico en Estados Unidos.

<http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb.html>

Secuencia genómica completa y alineamiento de familia de genes de *Helicobacter pylori* 26695. La secuencia se encuentra depositada en el banco de genes con el número de acceso AE000511.

Último acceso confirmado en fecha 10/4/2001