

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE UREASA (CLOTEST), HISTOLOGÍA DE MUCOSA GÁSTRICA, SEROLOGÍA, CULTIVO Y PCR EN LA IDENTIFICACIÓN DEL HELICOBACTER PYLORI. SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO.

Dres. Añez Marianela*, Romero Gisela*, Lizarzábal Maribel*, Rangel Rosa*, Serrano Ana*, Latuff Zulily*,
Fernández José Miguel*.

*Servicio De Gastroenterología Hospital Universitario Maracaibo

RESUMEN

Las pruebas de test de ureasa (Clotest), histología, serología, cultivo y PCR, son métodos diagnósticos útiles para la identificación del *Helicobacter Pylori*. Son de alta sensibilidad y especificidad. Objetivo: Determinar la sensibilidad y especificidad del test de ureasa, histología, serología, cultivo y PCR, utilizando la histología como prueba estándar. Materiales y Métodos: se realizó un estudio prospectivo de 92 pacientes con dispepsia e indicación de endoscopia digestiva superior durante en periodo 2004 y 2005. Resultados: La edad de los pacientes fue entre 14 y 85 años siendo 30 pacientes del sexo masculino y 62 del femenino. Los tipos de dispepsia fueron: no ulcerosas en 71 pacientes (77%) y dispepsias ulcerosas en 21 pacientes (22,83%). Los hallazgos endoscópicos fueron: gastritis en 16 pacientes (17.39%), 28 pacientes con gastroduodenopatías (30.43%), 1 paciente con duodenitis (1.09%) y 26 pacientes con otros hallazgos endoscópicos (28.26%). Se comparó test de ureasa con histología resultando una sensibilidad del 58% y especificidad en 50%. Se comparó serología con histología resultando la sensibilidad en 89% y la especificidad en 96%. Los resultados de histología fueron 75% de positivos, test de ureasa (55%), serología (56%), cultivo 54% y PCR 41%. Conclusión: La histología y la serología fueron superiores al test de ureasa en la identificación del *Helicobacter Pylori*.

Palabras claves: *Helicobacter Pylori*, test de ureasa, histología, cultivo, PCR y serología.

SUMMARY

The Clotest, histology and serology are methods available for the detection of the *Helicobacter Pylori* infection. They have high sensitivity and specificity. Objective: The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of Clotest, histology, Serology, culture and PCR, using the histology as a gold standard. Patients and methods: sixty patients evaluated in a prospective study between 2004 and 2005 with dyspeptic symptoms and upper endoscopy indication in the University Hospital of Maracaibo. Results: the age of the patients was between 14 and 85. Were males 30 and females 62. The indications were: no ulcers dyspeptic in 71 patients (85%) and in 21 were dyspeptic ulcers. The endoscopic finding included: 16 patients with gastritis (17.39%), 28 patients with gastroduodenitis (30.43%), 1 patient with duodenitis (1.09%) in 26 patients with other pathologies (28.26%). Were compared Clotest with histology, the sensitivity was (58%) and specificity (50%), and when they were compared histology with serology the sensitivity was (89%) and specificity was (96%).

Conclusion: The histology and the serology were higher than Clotest for the detection of the *Helicobacter Pylori* infection.

INTRODUCCIÓN

Los primeros informes acerca de la presencia del *Helicobacter Pylori* en tejido gástrico datan de 1896. Tal noción sufrió un vuelco total en los primeros años de la década de los 80, cuando los doctores Robin Warren y Barry J. Marshall, identificaron en forma irrefutable, la presencia de una bacteria espiral en la mucosa gástrica. Estudios posteriores demostraron que dicho microorganismo, conocido hoy día como *Helicobacter pylori* (H.P.), estaba presente en más del 80% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal. (1). El (H.P.) es una bacteria gran negativa de forma espiral y flagelada que se halla con frecuencia en la capa mucosa del epitelio gástrico. (1). También, se ha reportado la infección en el epitelio metaplásico del duodeno, esófago, mucosa gástrica ectópica y otros sitios del tracto gastrointestinal, incluyendo el divertículo de Meckel y el recto. (1,2).

En su transmisión se señala la participación de la mosca doméstica como transportador de la bacteria, la cual se puede encontrar en las comidas contaminadas con heces. (1,2). También se ha reportado la transmisión latrogénica en el momento de la endoscopia. (3)

El hombre es el mayor reservorio natural. El ADN bacterial ha sido aislado por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) de la boca, placa dental y saliva. (3, 43, 45) La infección por el (H.P.) ocurre en todo el mundo. En los países en vías de desarrollo, esta infección se adquiere desde muy joven, mientras que la prevalencia en los países industrializados es mayor en las personas de edad avanzada. (3) (4) (44)

Hay diferencias en prevalencia entre grupos raciales y étnicos dentro de los Estados Unidos. Hispánicos y Afro-americanos tienen una seroprevalencia más alta de *Helicobacter pylori* que los caucásicos posiblemente relacionados por diferencias socio-económicas. (3) (4) (39)

La prevalencia de la infección entre padres y hermanos de los individuos afectados y entre los que viven en instituciones públicas es mayor en grupos no familiares y en individuos que no conviven agrupados, lo que sugiere la transmisión oral o fecal del organismo. (3,4, 39)

La infección es adquirida principalmente en la infancia y la reinfección después del tratamiento exitoso es poco usual. La tasa de infección aumenta con la edad, de manera que mientras alrededor del 10% de los individuos menores de 30 años están infectados, tal cifra asciende a 60% en mayores de 60 años. Según los estimados más recientes, del 90 a 95% de los pacientes con úlcera duodenal y del 60 a 70% con úlcera gástrica están colonizados por el germen. (3,4, 39)

Antes del descubrimiento del (H.P.) se pensaba que el estómago era estéril. Se consideraba que los contenidos luminales ácidos y la capa protectora representaban una barrera para la supervivencia de bacterias. (3,4)

Pero resulta que este organismo posee novedosas propiedades que le permiten sobrevivir en el estómago bajo la secreción de ácidos; la bacteria secreta grandes concentraciones de la enzima ureasa. La ureasa es una enzima de elevado peso molecular que causa descomposición de la urea en amoníaco y bicarbonato. El bicarbonato es absorbido en el torrente circulatorio y convertido en bióxido de carbón, que es exhalado posteriormente. El amoníaco producido por esta reacción, le proporciona a la bacteria un micro-

ambiente alcalino, protegiéndola del entorno ácido, le permite penetrar la capa mucosa porque hidroliza y perturba la estructura de la mucosa. Dado que tiene un efecto tóxico directo sobre el epitelio gástrico por interferir con el ácido tricloroacético impide la normal producción de trifosfato de adenocina (ATP). (3,4). La eficiente movilidad del (H.P.) a través de la capa mucosa es vital, para su supervivencia, esto se debe a la morfología espiral y sus flagelos. (4,5).

La capacidad de fijarse a las células gástricas epiteliales puede determinar su patogenicidad. Todos los subtipos del (H.P.) tienen el potencial de producir citotoxinas, pero solo aquellos que producen la proteína CAGA que secretan citotoxinas vacuolizantes específicas. (5,6) tiene mayor virulencia y patogenicidad.

El (H.P.) juega un papel en la patogénesis de la enfermedad ulcerosa péptica. Se reporta gastritis histológica, dispepsia no ulcerosa que es el grupo de síntomas que usualmente se originan en el tracto digestivo superior que incluyen dolor en epigastrio o cuadrante superior derecho, saciedad temprana, gases postprandiales con o sin distensión, náuseas con o sin vómitos, quemadura retroesternal y regurgitaciones, siendo esto un síntoma común en la población general con una prevalencia entre un 13 al 41 por ciento. La dispepsia es una entidad frecuente, sin embargo, solo el 10% consultan al médico y de estos solo el 22% es referida a la consulta especializada, de los pacientes con dispepsia que son llevados al estudio de endoscopia digestiva superior el 38% no se les encuentra anomalías endoscópicas. La prevalencia de la infección con (H.P.) varía según la población estudiada y va del 43 al 87%. En Venezuela se ha estimado una prevalencia del 50% para la infección de (H.P.) en la dispepsia no ulcerosa. La dispepsia no ulcerosa es mucho más frecuente que la dispepsia ulcerosa. Aproximadamente el 50% de los pacientes con dispepsia no ulcerosa presentan el (H.P.) positivo, siendo más frecuente en la dispepsia no ulcerosa que la de tipo ulcerosa y reflujo, cuya prevalencia es del 80%. También se ha descrito asociado al (H.P.) un tipo de linfoma (tipo MALT) gástrico de bajo y alto grado de malignidad. (7-10, 37).

El pronóstico de la infección por (H.P.) presumiblemente depende, de factores del huésped como: genéticos, respuesta inmune, secreción ácida, edad de la adquisición y factores bacterianos incluyendo aquellos que permitan colonización, persistencia de la infección y virulencia. (7-10).

El empleo de las pruebas para diagnosticar el (H.P.) es de vital importancia para el manejo de los pacientes. Hay una gran variedad de pruebas: pruebas invasivas o endoscópicas y pruebas no invasivas o no endoscópicas (50, 54). Todas las pruebas son sensibles y específicas cuando se llevan a cabo apropiadamente, pero la situación clínica y el costo determinan el método apropiado para el paciente. Las invasivas son basadas en la toma de tejidos gástricos lo cual indica que el paciente debe tener una evaluación endoscópica e incluyen: test rápido de ureasa, histología, cultivo y la reacción en cadena de polimerasa (P.C.R.). Las pruebas no invasivas incluyen los test serológicos y las pruebas del aliento con carbono 13 y 14 marcado y el test de antígeno fecal que ya fue aprobado por la FDA. (10,11, 46,51, 52, 53, 54)

El test rápido de ureasa por biopsia desarrollado por Marshall (Clotest) fue el primero comercialmente designado para la detección del (H.P.). Hoy día es un test ampliamente conocido y utilizado. El (H.P.) hidroliza la urea contenida en el agar gel del test por medio de la ureasa permitiendo la producción de amonio, al aumentar el (H.P.) se produce un cambio de color de amarillo a rojo. Este test es interpretado a los 30 minutos y 3 horas de la muestra de

mucosa gástrica dentro del agar gel. (10-12). El test rápido de ureasa por biopsia es altamente sensible y específico, pero puede ser afectado por los inhibidores de la bomba de protones, antibióticos y preparaciones de bismuto. El número y tamaño de las biopsias afectan los resultados tempranos, pero no las características operativas. Es el test endoscópico de excelencia para diagnosticar el (H.P.), sin embargo hay que tomar en cuenta el costo adicional de la endoscopia. (10-12). La sensibilidad del test es del 90 %; sin embargo puede variar de un estudio a otro incluso en la misma institución (13, 14, 38, 42). Dos estudios encontraron que la sensibilidad a las 24 horas fue equivalente en diferentes tamaños de biopsias (15, 16), pero en uno de los estudios el test de ureasa comienza a hacerse positivo más rápidamente con una biopsia de gran tamaño. La especificidad del ureasa es excelente generalmente entre el 95 al 100 %, pero cuando se lee a las 24 horas falsos positivos infrecuentemente pueden ser encontrados. (15,16, 42). El test de ureasa por biopsia ha reportado falsos negativos en úlceras sangrantes y los que reciben terapias con inhibidores de bomba de protones, bloqueadores H2 de histamina, bismuto y antibióticos (16-18, 46, 48, 49). Otros test nuevos están comercialmente disponibles en Estados Unidos que son: el (H.P.) Fast, similar a clotest utilizando un indicador de pH diferente y el otro el Pylori Tek, la principal ventaja es que se puede llevar a cabo su interpretación en una hora. Sin embargo, estudios simultáneos de los tres test se han realizado y los resultados son comparables. (19, 20, 35)

El gold standard para el diagnóstico del (H.P.) es la detección del organismo en biopsias gástricas. (21)

La histología ofrece la ventaja de diagnosticar y estudiar la gastritis y detectar las lesiones tales como: cáncer y linfoma MALT. La distribución del (H.P.) en el estómago no es uniforme. Varias biopsias de antro y cuerpo deben ser tomadas para el diagnóstico con esta técnica (21,22). Genta y Cols han reportado sensibilidad del 100 % para biopsias del ángulo del estomago (22). Una biopsia simple del antro distal tiene una sensibilidad del 96 al 97 %, mientras que una muestra simple del cuerpo gástrico tiene una sensibilidad de 91 al 94 % y las dos biopsias tienen una sensibilidad del 100 %. (22, 36, 38, 40, 42)

La tinción con Hematoxilina-Eosina es usualmente adecuada para detectar el (H.P.), pero puede aumentar su efectividad usándose otras tinciones especiales como Giemsa. La ausencia de inflamación en una biopsia antral hace que la infección por *H. pylori* sea remota y las tinciones especiales no estarían indicadas. (23,24)

El cultivo para el (H.P.), es importante para manejar susceptibilidad antibiótica en individuos quienes les han fallado el tratamiento. El cultivo no es necesario para diagnosticar primariamente la bacteria, debido al potencial de falsos negativos por errores de la adquisición de las muestras, almacenajes, transporte y tiempo para obtener los resultados. Su sensibilidad se puede ver disminuida en pacientes con terapias antisecretoras (42). No está disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos. (24)

Reacción en cadena de Polymerasa (PCR)

Los ensayos del PCR han demostrado ser sensibles y específicos para la detención del (H.P.) sobre biopsias mucosales gástricas. Sin embargo, la diversidad de la organización genética del (H.P.), puede afectar la sensibilidad de la prueba. Existe incertidumbre sobre la especificidad de algunas de las primeras moléculas usadas en PCR. Por refinamiento y estandarización, el PCR puede ser útil clínicamente para la detección de resistencia antibiótica. (24) La serología a través de la determinación de los Títulos de anticuerpos IgG-IgA tiene buena sensibilidad y moderada especifi-

cidad, es el test de elección cuando la endoscopia no esta clínicamente indicada. Una ventaja de la prueba es que es poco costosa; es útil para confirmar el control de la infección, una vez que los títulos de anticuerpos IgG bajan, después del tratamiento por infección bacteriana.

Los test de sangre total basados en inmunoensayos séricos, ofrecen resultados rápidos a bajo costo, pero no son tan seguros como las pruebas basadas en ELISA. Son menos sensibles que las pruebas anteriormente mencionadas. (25, 26, 41).

Un reciente meta análisis de once (11) kits de ELISA y un kit de aglutinación de latex reveló que tenían una sensibilidad del 85% y especificidad del 79% (27,28, 41). Estos test pueden dar falsos positivos y falsos negativos para diagnosticar infección por el (H.P.) con frecuencia. (27-29)

En el diagnóstico en vitro, los anticuerpos específicos anti (H.P.) no indican los títulos de anticuerpos en el espécimen. Especímenes obtenidos para la detección temprana pueden no contener niveles detectables de anticuerpos. Y si el resultado es negativo y la infección se sigue sospechando una segunda muestra debe ser obtenida y probada dos a siete semanas más tarde. Un resultado positivo no distingue entre infección aguda y colonización por (H.P.). Resultados positivos pueden ocurrir incluso si el paciente no tiene síntomas típicos. Si el test es negativo y la infección por (H.P.) es sospechada otros test como histología y cultivo deben ser realizados.

El test anti (H.P.) tiene una alta sensibilidad (97%) y especificidad (95%) cuando se compara con el ELISA. (29,30, 41)

El test del aliento con carbono marcado 13 y 14 depende de la ureasa en la superficie celular bacteriana. Esta prueba es altamente sensible y específica, es la que más se usa para confirmar erradicación de la bacteria, en el seguimiento del tratamiento. Se ha reportado que medicaciones como inhibidores de la bomba de protones, algunos antibióticos o compuestos de bismuto suprimen la actividad de la bacteria, por tanto en individuos que ingieren esos medicamentos los resultados de la prueba pueden estar alterados. Además es costosa y ya está disponible en nuestro medio (31)

Una variedad de otras pruebas para la detección del (H.P.) han sido descritas. Estas incluyen: la detección de anticuerpos en la orina, medición de bicarbonato sérico marcado seguido de la administración de urea marcada con Carbono (C13) en la prueba del aliento, mediciones de Carbono (C14) marcado en la orina, mediciones de Nitrógeno (N15) y amonio marcado. Ninguno de estos métodos se han estandarizados y están comercialmente disponibles. El test de ELISA de antígenos fecal ha aprobado por la Federación de Drogas Americanas (FDA) (32).

Es de vital importancia conocer las ventajas y desventajas de los métodos utilizados para la identificación del (H.P.), de manera que se pueden emplear apropiadamente con determinada población.

El principio básico es que tiene poco sentido someter al paciente a la incomodidad y al costo de algunas de las pruebas si el resultado en la identificación de la bacteria es similar y no va ha influenciar al tratamiento.

Debido a la importante asociación del (H.P.) con enfermedades de tan alta prevalencia y mortalidad, como la úlcera Péptica y el linfoma MALT, la detección de (H.P.) se ha convertido en práctica cotidiana en Gastroenterología.

El (H.P.) es de distribución mundial, que la frecuencia de la infección se incrementa en los países subdesarrollados, en individuos

de bajo nivel socio-económico y está asociado a condiciones gastrointestinales frecuentes como la enfermedad ulcerosa péptica y la gastritis. Nuestro país no escapa a esta realidad. En el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Maracaibo acuden un gran número de pacientes infectados por esta bacteria, y en su gran mayoría son pacientes de bajos recursos económicos. Tomando en cuenta la diversidad de métodos diagnósticos para detectar la infección del (H.P.), es importante reconocer cual de ellos se ajusta a nuestra realidad, y en base a la accesibilidad de las pruebas, y por supuesto sensibilidad y especificidad se busca el costo beneficio con el fin de brindarle a los pacientes el tratamiento adecuado.

El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad y especificidad de los test de ureasa rápida (clotest), la serología (IgG), PCR y cultivo, utilizando la histología como prueba estándar para la identificación del (H.P.) en pacientes con dispepsia que asistieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Maracaibo en el periodo de Enero de 2004 a Enero de 2005.

MATERIALES Y MÉTODOS.

En este estudio prospectivo fueron seleccionados 92 pacientes con un rango de 14 a 85 años y con una edad promedio de 45.858, de ambos sexos 30 hombres y 42 mujeres con indicación de endoscopia digestiva superior que asistieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Maracaibo desde Abril de 2004 hasta Abril de 2005, con síntomas de dispepsia, denominándose dispepsia al dolor abdominal episódico o persistente en el cuadrante superior derecho o disconfort que se produce en el tracto digestivo superior o proximal. Se incluyeron los pacientes con síntomas de dispepsia con más de tres meses de duración, llamándose dispepsia ulcerosa los que tenían síntomas de una úlcera (dolor epigástrico, dolor nocturno que despierta al paciente, dolor que mejora con las comidas o antiácidos, dolor con patrón de mejorías y crisis) y no ulcerosa tipo dismotilidad (llenura postprandial, náuseas o vómitos, saciedad temprana/anorexia, eructos y disconfort abdominal superior). Tipo reflujo gastroesofágico (pirosis y regurgitación) y no específicos cuando no existe ningún síntoma predominante, síntomas que no encajan en algunas de las categorías precedentes (33,34). Se excluyeron aquellos pacientes que estaban recibiendo Aines (drogas antiinflamatorias no esteroideas), inhibidores de bomba de protones, bloqueadores H2 de histamina, antibióticos o compuestos a base de bismuto, así como también los que presentaron hemorragia digestiva superior.

Evaluación Clínica

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica donde se analizaron variables como: número de historia, nombre y apellido, dirección y teléfono, edad, sexo, antecedentes, síntomas, enfermedades asociadas y diagnósticos endoscópicos.

Evaluación Endoscópica.

A cada paciente en la sala de endoscopia se le realizó una vídeo gastroscopia previa sedación endovenosa con midazolam y aplicación de anestesia local en la garganta; con un vídeo endoscopio marca Fuji o Pentax. Se tomaron cuatro muestras: una para la prueba rápida de ureasa (Clotest); una de antro gástrico, otra de cuerpo gástrico para la histología y otra para el cultivo bacteriológico. Esta última metodología se aplicó únicamente a 32 pacientes de los 92 incluidos en el estudio.

Se tomó además muestra de sangre venosa para la detección de anticuerpos séricos de IgG y IgA específicos contra H. Pylori.

MÉTODOS INVASIVOS: Prueba Rápida de Ureasa (CLOTEST)

Para la prueba rápida de ureasa se colocó la primera muestra tomada en una lámina que contenía medio de urea y se observó a las 24 horas. La prueba se consideró positiva al observarse un cambio de color naranja suave o rosado fucsia intenso, indicando desdoblamiento de la urea con producción de CO₂ y amonio.

Las biopsias fueron tomadas de antro y cuerpo gástrico para la histología. Fueron colocadas en solución de formol al 10% y transformadas a procesos estándar de preparación, se incluyeron en parafina para ser teñidas luego con giemsa.

CULTIVO BACTERIOLÓGICO

La muestra de biopsia gástrica destinada a cultivo bacteriológico se colocó en un tubo eppendorf conteniendo 0.5 ml de solución salina fisiológica estéril como medio de transporte, y se envió al laboratorio en un lapso no mayor de 4 horas para su procesamiento. Una vez en el laboratorio, se realizó una fina disección de la biopsia con una hojilla de bisturí sobre un vidrio de reloj estéril. Este preparado se sembró en los medios de cultivo para aislamiento primario.

La muestra se cultivó en dos medios enriquecidos, uno selectivo y uno no selectivo teniendo ambos como base Agar Brucilla suplementado con sangre humana al 5%. Al medio selectivo se le adicionaron 4 agentes antimicrobianos: vancomicina (10µg/ml), trimetoprim (5µg/ml), cefsulodin (5µg/ml) y anfotericina B (10µg/ml). Ambos medios se incubaron en atmósfera microaerofílica húmeda (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85 de N₂), utilizando jarras de anaerobiosis y sobres generadores de gases (Campy Pak o Anaerocult C), a una temperatura de 35°C. Los cultivos se inspeccionaron después de 3,5 y 7 días.

La identificación de los aislamientos se realizó en base a la morfología colonial y celular características de H. Pylori, y pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa positivas.

DETECCIÓN POR PCR

Extracción de ADN

Las muestras biopsia para PCR se colocaron en 0.5 ml de solución salina fisiológica estéril y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. La digestión del tejido se efectuó añadiendo 50 µl de Proteinasa K (100µg/ml) y 50 µl de buffer lisis (Tris-HCl 10mM, pH 8.1 + sarcosina al 0.1%) al tubo conteniendo la muestra, y calentando en baño de María a 65°C por dos horas. El ADN se extrajo mediante tratamiento con 1 volumen de fenol; cloroformo; alcohol isoamílico (25:24:1) y se realizó una segunda extracción con cloroformo. Utilizando 1/10 volumen de acetato de amonio 10M y 2 volúmenes de etanol puro frío se logró precipitar el ADN.

Indicadores o Primers.

Se utilizaron `Primers` oligonucleótidos (estuche comercial Diasorin) para amplificar específicamente un pequeño segmento de 410 pb, correspondiente al gen ureA de H. Pylori. La secuencia de los primers es la siguiente:

Oligo A1: 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3'

Oligo A2: 5'-CTC CTT AAT TGT TTT TAC-3'

Amplificación por PCR

La amplificación se realizó en un volumen de reacción de 50 µl, conteniendo 10 µl del Ax, MgDN extraído de las muestras. La mezcla de reacción se preparó con buffer 10X, MgCl₂ 15 mM de cada deo-

xinucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, y dCTP), 0.5 mM decaprimero y 2.5 U de Taq polimerasa. Se siguió el siguiente programa de corrida: desnaturalización inicial 95°C x 15", desnaturalización 94°C x 8", anillamiento 45°C x 15", extensión 72°C x 30" y extensión final 72°C x 1'15". Se realizaron 30 ciclos de amplificación. El producto amplificado se obtuvo en el lapso de 1 hora.

Detección de Productos Amplificados

La detección del segmento genómico amplificado por PCR, específico de *H. Pylori* se llevó a cabo mediante inmunoensayo enzimático del DNA (GEN-ETI-KDELIA-DiaSorin), el cual se basa en la hibridación del ADN amplificado con una sonda de ADN de simple cadena, la cual se encuentra fija a los pozos de una placa de microtitulación por una unión biotina-estreptavidina. El híbrido que se forma entre la sonda y el ADN que se está examinando, se detecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón, anti ADN. Este anticuerpo sólo reacciona con ADN de doble cadena y no con ADN de simple cadena. El anticuerpo unido al híbrido se detecta empleando un marcador enzimático (peróxido de hidrógeno + tetrametibencidina como cromógeno).

Para la aplicación del ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante. La sonda 5'-biotinilada de secuencia 5'-ATT GAC ATT GGC GGT AAC-3' se unió covalentemente a las microplacas de poliestireno, añadiendo 100 µl de la solución de la sonda biotinilada a cada pozo. La placa se incubó por 18 horas a 4°C. Luego se enfriaron por 10 min. en un baño de hielo.

A cada pozo se añadieron 100 µl de buffer de hibridación y 20 µl de los productos amplificados por PCR. La hibridación tuvo lugar a 50°C por 1 hora 15 min. Posteriormente se lavaron los pozos y se les agregó 100 µl del anticuerpo anti ADN de doble cadena. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 min., luego se lavaron y se procedió a agregar 100 µl del trazador enzimático.

Se repitió la incubación a temperatura por 30 min. Finalmente, se agregó 100 µl de cromógeno/sustrato. Después de 30 min. de incubación a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 200 µl de ácido sulfúrico, y se leyó la DO de cada pozo a 450 nm en un lector de micro ELISA. En el ensayo se empleó un control positivo (secuencia complementaria de la sonda 5'-biotinilada), un control negativo, y se corrió un blanco de reactivos.

La positividad de las muestras se determinó calculando un valor cutoff, de la siguiente forma: DO control negativo + 0.150.

DIAGNOSTICO SEROLÓGICO (MÉTODO NO INVASIVO)

Para la detección y la cuantificación de inmunoglobulinas de tipo IgG específicas contra el *Helicobacter pylori* en el suero de pacientes, se llevó a cabo a 28 pacientes mediante el inmunoensayo cromatográfico (hexagon H. Pylori) en suero o plasma siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Este test emplea una combinación de anticuerpos humanos monoclonales, conjugados, proteínas altamente purificada de *H. pylori* fijada en la línea del test y anticuerpos de IgG de ratón en la línea control. A través del lado absorbente, el IgG humano se une con el anti IgG de ratón-conjugado para formar una inmuno complejo. Esta unión con la proteína del *H. pylori* en la línea del test produce una línea rojo violeta, si el anticuerpo anti *H. pylori* está presente en la muestra un exceso de reacción conjugada en la línea control con el anticuerpo IgG de ratón, forma una segunda línea rojo violeta para demostrar la correcta

función de los reagentes.

Interpretación de los resultados: la raya rojo violeta que aparece en la parte superior de la ventana indica que el test fue realizado correctamente y una segunda línea rojo violeta aparece en la parte baja de la ventana, resulta positivo indicando anticuerpos anti *H. pylori* en la muestra.

A 32 pacientes se les realizó la serología mediante la detección y cuantificación de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgA específicas contra *H. Pylori*, en el suero de los pacientes y donantes, se llevó a cabo mediante el inmunoensayo enzimático comercial "Pyloriset" (Pyloriset EIA-G y Pyloriset EIA-A. Orion Diagnostica), siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

Este kit emplea antígenos purificados inactivos de *H. Pylori*, y una anti-inmunoglobulina humana de cerdo (anti IgG o anti IgA humana) conjugada a fosfatasa alcalina, para la detección del complejo Ag-Ac. La lectura de la prueba se realizó en un lector de micro ELISA, a una λ de 405 nm.

Los resultados de las muestras y los títulos de anticuerpos se calcularon por comparación con las DO obtenidas para 4 calibradores de título conocido, con cuyos valores se construyó una gráfica en papel semilogarítmico (DO vs título de anticuerpos). Se consideraron positivas para anticuerpos de tipo IgG e IgA específicos de *H. Pylori*, las muestras cuyos títulos fueran ≥ 300 y ≥ 250 , respectivamente.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para hallar la sensibilidad y especificidad se calcularon por una tabla clásica de dos por dos. La tabla de dos por dos es completada por los resultados de los tests verdaderos positivos (positivo cuando la enfermedad está presente), resultados de tests falsos positivos (positivos cuando la enfermedad está ausente), resultados de tests verdaderos negativos (negativos cuando la enfermedad está ausente) y falsos negativos (negativos cuando la enfermedad está presente).

Se utilizaron las siguientes formulas para identificar la sensibilidad y la especificidad

$$S = \frac{VP}{FN+VP} \quad E = \frac{VN}{FN+VP}$$

VP: verdaderos positivos
VN: verdaderos negativos
FN: falsos negativos
FP: falsos positivos

La sensibilidad es el porcentaje de pacientes con la enfermedad en quienes los resultados de los tests son positivos. Y la especificidad es el porcentaje de pacientes sin enfermedad en quienes los test son negativos.

RESULTADOS

La tabla N° 1 muestra las características generales de los pacientes sometidos a endoscopia superior. La edad de los pacientes fue entre 14 y 85 años. Siendo 30 pacientes (33%) del sexo masculino y 40 (67%) del sexo femenino.

TABLA N° 1

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES CON DISPEPSIA SOMETIDOS A ENDOSCOPIA SUPERIOR

RANGO:	14 - 85 Años
EDAD PROMEDIO	45.8 Años
SEXO:	Masculino 30 (33%) Femenino 40 (67%)

La tabla N° 2 muestra la relación de los hallazgos endoscópicos y los tipos de dispepsia. En 71 pacientes (77%) fueron dispepsias no ulcerosas que correspondieron a 16 pacientes con gastritis (17.39%), 28 con gastroduodenitis y duodenopatías (30.43%), 1 paciente con duodenitis (1.09%) y 26 pacientes (28.26%) con otras patologías. En relación a las dispepsias ulcerosas fueron 21 pacientes ubicadas en duodeno (22,83%).

TABLA N° 2

RELACIÓN ENTRE HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS Y TIPOS DE DISPEPSIAS		
DIAGNOSTICO ENDOSCOPICO	n	%
<i>Dispepsias No Ulcerosas</i>		
Gastritis	16	17,39
Gastroduodenitis	28	30,43
Duodenitis	1	1,09
Otras	26	22,83
<i>Dispepsias Ulcerosas (Gástrica y Duodenales)</i>		
Úlceras	21	
TOTAL	92	100,00

En la tabla 3 se expresaron los resultados de clotest, comparando este con la histología en una tabla 2x2. Para clotest fueron 92 pacientes analizados de los cuales 36 fueron verdaderos positivos, 15 falsos positivos, 26 falsos negativos y 15 verdaderos negativos. La sensibilidad fue del 58% y la especificidad del 50%.

TABLA N° 3

PRUEBA DE TEST DE UREASA (CLOTEST) PARA DETERMINAR EN FORMA RÁPIDA EL (H.P)		
	HELICOBACTER PRESENTE	HELICOBACTER AUSENTE
TEST POSITIVO	36	15
	VP	FP
TEST NEGATIVO	26	15
	FN	VN

SENSIBILIDAD	$VP / (VP + FN) = 36 / (36 + 26) = 58\%$
---------------------	--

ESPECIFICIDAD:	$VN / (VN + FP) = 15 / (15 + 15) = 50\%$
-----------------------	--

VP :	Verdadero Positivo
FP:	Falso Positivo
FN:	Falso Negativo
VN:	Verdadero Negativo

En la tabla N° 4 se analizaron los resultados de serología, se comparó la serología con la histología en una tabla 2x2. Para la serología la muestra fue de 60 pacientes. Con 33 verdaderos positivos, 1 falso positivo, 22 verdaderos negativos y 4 falsos negativos. Resultando la sensibilidad en un 89% y la especificidad en un 96%.

TABLA N° 4

MÉTODO SEROLÓGICO PARA DETERMINAR (H.P)		
	HELICOBACTER PRESENTE	HELICOBACTER AUSENTE
TEST POSITIVO	33	1
	VP	FP
TEST NEGATIVO	4	22
	FN	VN

SENSIBILIDAD	$VP / (VP + FN) = 33 / (33 + 4) = 89\%$
---------------------	---

ESPECIFICIDAD:	$VN / (VN + FP) = 22 / (22 + 1) = 96\%$
-----------------------	---

VP :	Verdadero Positivo
FP:	Falso Positivo
FN:	Falso Negativo
VN:	Verdadero Negativo

En la tabla N° 5 se analizaron los resultados de el cultivo, la muestra de 31 pacientes. Con 14 verdaderos positivos, 3 falsos positivos, 13 verdaderos negativos y 1 falso negativo. Resultando la sensibilidad en un 93% y la especificidad en un 81%.

TABLA N° 5

MÉTODO CULTIVO PARA DETERMINAR (H.P)		
	HELICOBACTER PRESENTE	HELICOBACTER AUSENTE
TEST POSITIVO	14	3
	VP	FP
TEST NEGATIVO	1	13
	FN	VN

SENSIBILIDAD	$VP / (VP + FN) = 14 / (14 + 1) = 93\%$
---------------------	---

ESPECIFICIDAD:	$VN / (VN + FP) = 13 / (13 + 3) = 81\%$
-----------------------	---

VP :	Verdadero Positivo
FP:	Falso Positivo
FN:	Falso Negativo
VN:	Verdadero Negativo

En la tabla N° 6 se analizaron los resultados del PCR. La muestra fue de 31 pacientes. Con 7 verdaderos positivos, 6 falsos positivos, 13 verdaderos negativos y 5 falsos negativos. Resultando una sensibilidad del 58% y una especificidad del 68%.

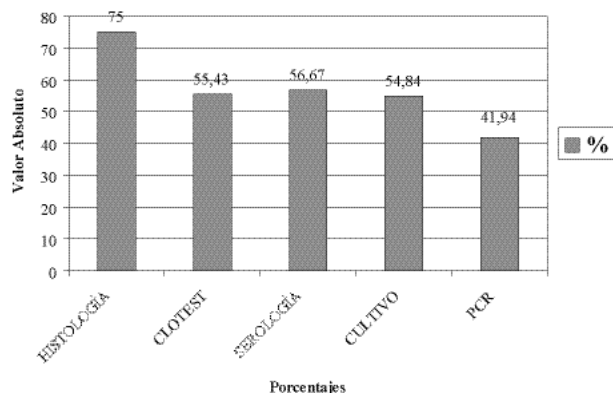
TABLA N° 6

MÉTODO PCR PARA DETERMINAR (H.P)		
	HELICOBACTER PRESENTE	HELICOBACTER AUSENTE
TEST POSITIVO	7 VP	6 FP
TEST NEGATIVO	5 FN	13 VN
SENSIBILIDAD	$\frac{VP}{(VP + FN)} = \frac{7}{(7 + 5)} = 58\%$	
ESPECIFICIDAD:	$\frac{VN}{(VN + FP)} = \frac{13}{(13 + 6)} = 68\%$	
VP :	Verdadero Positivo	
FP:	Falso Positivo	
FN:	Falso Negativo	
VN:	Verdadero Negativo	

En el gráfico se relacionaron los resultados de las pruebas de clotest, histología, serología, cultivo y PCR de los pacientes. Para clotest de los 92 pacientes fueron (55%) positivos. La histología de antro y de cuerpo fueron 60 pacientes (75%) positivos. Para la serología de los 60 pacientes analizados fueron (42%) positivos, para el cultivo fueron (55%) positivos y para el PCR fueron (42%) positivos.

GRÁFICO

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HISTOLOGÍA (n=60), CLOTEST(n=92), SEROLOGÍA (n=60), CULTIVO(n=31) Y PCR(n=31)



DISCUSIÓN

Durante un periodo de 12 meses de estudio, se evaluaron noventa y dos pacientes que consultaron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Maracaibo. El rango de edad osciló entre 14 y 85 años, con una tendencia hacia las edades más altas a la media tal como se ha reportado en la literatura (3,4). En relación al sexo correspondió al femenino el mayor porcentaje en el 67.

Se relacionaron los hallazgos endoscópicos con las dispepsias, que correspondieron el 30,43% a las gastroduodenitis, seguido del 28,26% por otras que incluyeron: hernias del hiato, esofagitis péptica, esófago de Barrets y estudio normal. En relación a las dispepsias las más frecuentes fueron las no ulcerosas con un 77% y las ulcerosas correspondieron a un 23%. Esto concuerda con lo descrito en la literatura mundial, se dice que el (H.P.) causa gastritis crónica y está relacionado con las dispepsias no ulcerosas así como la enfermedad gástrica, duodenal y el carcinoma gástrico. (7-9).

El empleo apropiado de las pruebas para diagnosticar el *H. pylori* tiene vital importancia para el manejo de los pacientes, y así ofrecer el tratamiento para la infección. Las características de los test son usualmente expresados en términos de sensibilidad y especificidad. En este estudio prospectivo se comparó la sensibilidad y especificidad del clotest, histología, serología, cultivo y PCR para la identificación del (H.P.) en nuestro medio. Cuando se comparó el clotest con la histología la sensibilidad fue del 58% y la especificidad fue del 50%. La literatura señala que la sensibilidad del clotest es del 90% y la especificidad del 95% (13-16).

En pacientes con clotest negativo la mucosa es usualmente normal en un 90% de los casos, aunque en un 5 a 10% pueden tener un bajo grado de infección no detectado por el clotest (31,32). Estos valores pueden ser afectados por los inhibidores de bombas de protones como antibióticos, antiinflamatorios, bloqueadores H2 de histamina y otros. Aunque en este estudio se excluyeron los pacientes que estaban tomando dichas medicaciones algunos de ellos probablemente las tomaron un mes antes del estudio. La sensibilidad y la especificidad de la prueba rápida de ureasa están interrelacionadas y dependen del tiempo de lectura de la prueba. La sensibilidad de esta prueba también depende del número de bacterias presentes en la muestra, pudiendo encontrarse falsos negativos cuando hay pocas bacterias. Algunos autores recomiendan usar dos fragmentos de biopsias en incubación a 37° C para aumentar la sensibilidad de la prueba. (31,32). Probablemente los resultados de clotest en este estudio sean debido a que la lectura fue realizada a las 24 horas de tomadas las muestras y que solo se tomó un sólo fragmento de biopsia de antro.

En un trabajo realizado por Guelrud y Cols. (1989) en Venezuela, compararon la prueba de ureasa (Clotest) con la histología en el diagnóstico de (H.P.), sus resultados fueron: clotest fue positivo en un 30% y la biopsia fue positivo en un 65%. Todos los pacientes tuvieron gastritis crónica (35).

Cuando se comparó la histología con la serología la sensibilidad de ésta última fue del 89% y la especificidad del 96%, en relación a lo que está descrito la sensibilidad es 85% y

la especificidad es 79% (25-27). Estos resultados concuerdan con lo que dice la literatura.

En un trabajo de la población japonesa realizado Kikuchi y Cols. (2000) Ellos compararon el diagnostico para la identificación del por varios kits serológicos, mostraron en sus trabajos que estos test serológicos son altamente sensibles y específicos comparables a los reportados en la población occidental, pero hay resultados intermedios en estos test en el rango del 5.3% al 23% y concluyen que su utilidad está limitada en sus pacientes debido al gran número de resultados intermedios (36).

En relación a la histología sesenta pacientes (75%) tuvieron la prueba positiva, es decir tenían la bacteria en las muestras de biopsias tomadas de estómago. Se tomaron muestras de antro y cuerpo gástrico, se realizaron tinciones con Giemsa que es una de las tinciones especiales para la identificación del (H.P.) en el tejido gástrico. El porcentaje de biopsias positivas en este estudio coincide con lo que está escrito en la literatura (21,22).

En un trabajo realizado por Piñero y Cols. (1989) en Venezuela sobre la frecuencia del (H.P.) en venezolanos sanos y asintomáticos, compararon 21 sujetos para la prueba de ureasa, histología y cultivo, encontrando que las biopsias o histologías tuvieron una sensibilidad del 76% (37,38).

La pregunta del manejo del costo-beneficio para los pacientes con dispepsia parece hasta el momento no estar resuelto. Sin embargo, las evidencias sugieren obtener la decisión del análisis que indica la terapia antimicrobial y terapia antisecretora para pacientes que tienen infección por H. P. por medio de test no invasivos, puede ser el manejo preferido.

En un trabajo realizado por Valenzuela y Cols. en una revisión sobre (H. P.) la revolución bacteriológica en donde el autor dice que el método más común para diagnosticar la infección es el test de ureasa de las biopsias gástricas; y que la determinación de los niveles en suero de IgG debe llevarse a cabo en estudios de gran población de pacientes donde hay alta incidencia de la bacteria. (40).

El cultivo reportó una alta sensibilidad del 93% y especificidad del 81% que concuerda con lo dicho en la literatura. Y el PCR reportó una mediana sensibilidad del 58% y una especificidad del 68%

La histología y la serología son superiores al clotest según los resultados obtenidos en éste estudio, y pudieran ser más beneficiosas; ya que la serología es una prueba que es rápida y económica; y la histología aunque requiere de personal entrenado y del costo de la endoscopia superior, al final la combinación de ambas presentan mas ventajas por cuanto permite conocer con mayor exactitud la existencia de la bacteria, lo cual conlleva a su erradicación y menor probabilidad de reinfección, por lo tanto disminuye el número de consultas al especialista, el número de suspensiones laborales por ésta patología y las hospitalizaciones por complicaciones de la úlcera péptica igualmente se reducen.

CONCLUSIONES

El empleo de las pruebas para identificar el (H.P.) es de vital importancia para el manejo de los pacientes. Hay una gran variedad de pruebas invasivas y no invasivas para su identificación. En nuestro estudio se realizaron pruebas invasivas a través de la endoscopia como el test de ureasa (clotest), histología, cultivo y PCR; y las no invasivas como la serología para el manejo del costo-beneficio de los pacientes. Resultando el test de ureasa medianamente sensible y específica y la serología sensible y altamente específica al compararla con el patrón estándar que es la histología que resultó significativamente alta. Observamos que la histología y la serología fueron superiores al clotest para la identificación del (H.P.). Y se sugiere su utilización para brindar mayor beneficio para el paciente y reduce el costo social.

RECOMENDACIONES

1. Al realizar los estudios diagnósticos para determinar el H. P. debemos asegurarnos que los pacientes no hayan ingerido medicamentos antes de los procedimientos que puedan alterar los resultados.
2. Utilizar método basado en Elisa, que es más seguro y sensible para la serología.
3. Utilizar la histología y asociarla con uno o dos métodos, preferiblemente no invasivos para determinar (H.P.), para mayor seguridad y costo-beneficio de los pacientes.
4. Establecer pautas y elaborar algoritmos para el manejo de los pacientes con dispepsia y (H.P.) presente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Programas educativos especiales. Presencia del UPR en la reforma de la salud y educación continua para el medico primario. N°4. 1997.
2. David A Peura. MD. FAGG: Helicobacter Pylori. American College of Gastroenterology. Anual postgraduate course. 1997. Pag. 143-149.
3. Tadataka Yamada. and cols. Textbook of Gastroenterology. Disorders Acitpeptic. Third edition. Vol 1. 1999. Pag. 1370-1429.
4. David Y. Graham, M.D. et. al. Epidemiology of Helicobacter Pylori in an asyntomatic population in the United States: Effect of Age, race and socioeconomic status. Gastroenterology. 1991: 100: 1495-501.
5. Mobley Hlt. Defining Helicobacter Pylori as a patogen. Strain heterogenisity and virulence. Am J. Med. 1996; 100 (suple 5-a): 2s.
6. Van Doorn L.J. Figueredo c, et. al. Geografic distribution of vaca allelic types of Helicobacter Pylori. Gastroenterology. 1999. 116: 823-30.
7. Williams B, Luchas M. et. al. Do your Patients With dispepsia need investigation. Lancet. 1988, 1349-1351.
8. Heath and Public policy comitee, American college physicians. Endoscopy in da evaluation of dispepsia. Ann Intem Med. 1985; 102: 266-269.
9. Bytzer. P Hausin J.M. et. al. Empirical H2 Blocker therapy of pront endoscopy in managment of dyspepsia. Lancet 1994; 343: 811-816.
10. Cultor A.F, Haustad S.Mack et. al. Accuracy ofinvasive and noninvasive test to diagnose Helicobacter Pylori infection: Gastroenterology. 1995, 109:136-141.
11. David Y. Graham, M.D, MACG. H. Pylori testing: tips for practice. Anual postgraduate course. American College of Gastroenterology. 1998. Pag: 349-353.
12. NIH Consensus Development panel on Helicobacter Pylori in peptic ulcer disease. Jama. 1994:272:65-9.
13. Silversstein M.D, Petterson. T, tally N.J. Initial endoscopy and empirical therapy with and without. Testing for Helicobacter for dyspepsia. A decision analysis. Gastroenterology. 1996: 110: 72-83.
14. Laine L. Estrada. R. Lewin Dncohen. The Influence of cuarning on rapid ureace test results. Gastrointest. Endose. 1996; 44: 429.
15. Laine L. Chong D. Stein C. Et al. The Influence of size or number or biopsies on rapid Urease test results. A prospective Evaluation. Gastrointest. Endose. 1996: 43: 49.

16. Youssi M. M. El - Zimaity MT, Colera, et al. Detection of helicobacter pylori by rapid Urease test. Is biopsies size a critical variable? *Gastrointest. Endosc.* 1996; 43: 222.
17. Eaine E. Lewucin D. Naritoku M. et al. Prospective Comparison of Commercially Available rapid Urease test for the diagnosis of Helicobacter Pylori. *Gastrointest. Endosc.* 1996; 44: 523.
18. Youssi M. M. El - Zimaity MT, Genta RM Graham DY. Evaluation of a new reagent strip rapid urease test for the detection of Helicobacter pylori infection. *Gastrointest. Endosc.* 1996; 44: 519.
19. Lat. KC, Hyi MM, Lam SK. Bleeding Wars have high falso negativales for antral Helicobacter pylori When tested with Urase test. *Gastroenterology.* 1996; 110: A 167.
20. Lee JM. Breslin NP, Fallón C, O'Morain CA. The rapid Urase test lacks sensivity in ulcers dise-ase *Gastroenterology* 1997; 112: A 195.
21. Robert M. Genta, M.D, David Y. Graham. M.D, Comparision of biopsy sites for the histiopa-tology diagnosis of Helicobacter Pylori: a topografic study of Helicobacter Pylori. Density and dis-tribution. *Gastrointestinal endoscopy.* 1994; 40: 342-345.
22. Genta JM, Gover IE, Graban Dy et al. Adherence of Helicobacter pylori to areas of incom-plete intestinal Metaplasias in the gastric mucosa. *Gastroenterology.* 1996; 11: 1206.
23. Genta RM, Ricadson GO, Graham Dy et al. Simultáneos Visualizantion of Helicobacter pylo-ri and Gastric morfology: A new Stain HUM Pathol. 1994; 25:221.
24. Laine I. Lewin DN. Naritoku M, Cohen H. Prospective Comparison of H y E, Giensa y Genta Stains for the diagnost of Helicobacter pylori. *Gastrointest. Endosc.* 1997; 45: 463.
25. Kames ME y et al. Positive Serun Antibody and negative tissue staining for Helicobacter pylo-ri in subjets with atrofy body Gastris. *Gastroenterology* 1991; 101: 167.
26. Patel A.P. Khilusi S, Mendel M.A, et. al. Prospective Screenig of dyspeptic patients by Helicobacter Pylori serology. *Lancet.* 1995; 346. 1315-8.
27. Sobala. G.M, Crabtree J.E, et. al. Screening dyspepsia by serology to Helicobacter Pylori. *Lancet.* 1991; 338: 946.
28. Evans DJ. jr. Evans DG. Graham Dy, klein PD. A sensitive and specife Serologic test for detec-tion of Camphylobacter pylori Infection. *Gastrointrolgy.* 1989; 96: 1004.
29. Loy et, Irwing. LM, Katelaries PH Talley NT. Do mommercial Serological kits for Helicobacter pylori Infection differ in accuracy? A meta Analysis *AMJ.* *Gastrointrolgy.* 1996; 91: 1138.
30. Cohen A, Retama B, Johason C, et al. Evaluation of a rapid test to detect Igg antibodies to Helicobacter pylori usiny fingerstick whole blood Samples. *Gastroenterology.* 1996, 110: A 83.
31. David Y. Graham, M.D, MACG. Treatment of Helicobacter Pylori. *American College of Gastroenterology, Anual postgraduate course.* 1998. Pag: 67-74.
32. Brown KE., Peura DA. Diagnosis of Helicobacter pylori infection *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 105-15.
33. O'Moraine, Gilvary, J. Erradication of Helicobacter Pylori in patients with non ulcer dispep-sia. *Scand J. Gastroenterology.* 1993; 28 Supply 196: 30-33.
34. Jebbink HJA., Smouth AJP, Van Berge Henegowen Gp. Pathophysiology and treatment of funcional Dyspepsia. *Scand J. Gastroenterology.* 1993; 28 Supply 200: 8 - 4
35. Urrestarazu de García, María I; Serrano de Carrera, Noris; Peñero, Ramón; Aristimuño de Oliver, Liselotte; Lopez de Beaupertuy, Yecenia; Poleo, Jose Ramon. Prueba de la ureasa para el diagnóstico de infección por Campylobacter pylori infections. *GEN;* 43(39); 169-72, jul.-sept. 1989.
36. Guelrud, Moisés; Mendoza, Sonia; Gelrud, Daniel; Essensfeld, Ervin. Comparación entre la prueba de la ureasa (Clotest) y la histología en el diagnóstico del Campylobacter pylori. *GEN;* 43 (4): 279 - 82; oct. - dic. 1989.
37. Pinero, Ramón; Urrestarazu, Marla; Serrano, Noris; González, Ramón; Olvarría Renato; Moncada, Jasmin; Khassale, Munir; Poleo, José Ramón. Frecuencia del Campylobacter pylori en Venezolanos aparentemente sanos y asintomáticos. *GEN;* 43 (4): 276 - 8, oct. - dic. 1989.
38. Hernández, F.; Rivera, P.; Sigaran, M.; Miranda, J. Diagnosis of Helibacter pylori: compari-son of an urease test, histological visualization of curved bacteria and culture. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo;* 33(1); 80-2, jan.-feb. 1991.
39. Valenzuela Escobar, Jorge. Helicobacter Pylori; La revolución Bacteriológica. *Rev. Med. Chile;* 127 (8): 891 - 3. Ago. 1999
- 40.- Mendonça, Ana L. C.; Meneses, AntonioC. O. de; Chapadeiro, Edmundo. Sensibilidade e especificidade de alterações histológicas da mucosa gástrica antral para o diagnóstico do Helicobacter pylori / Sensitivity and specificity of histological alterations of the antral mucosa for Helicobacter pylori. *J bras, batol;* 35(3); 25-32; jul.set. 1999.
41. Miwa, H.; Kikuchi, S.; Chtaka, K.; Kobayashi, O.; Ogihara, A.; Holo, M.; Nagaharañ, A.; Sato, N. Insufficient diagnostic accuracy of imported serological kits for Helicobacter pylori infection in japanese population. *Diagnostic microbiology and infectirous disease.* Vol. 36. Issue: 2. Pags. 95 - 99. Año 2000.
42. Lido, ndria Carla Vito; Palombo, Flávia Pascoal; Ferrari, Guaraciaba Oliveira; Magrini, Enzo. Estudio comparativo entre os testes de histologia, cultura e ureasa para diagnóstico de Helicobacter Pylori. *J. bras. med,* 79 (I); 85-92 Jul. 2000.
43. Luzz F., Imeneo M., Marasco A, Crotta A, Lerardi E., Usai Pet al Evaluation of a commercially sorological kit for detection of slivary immunoglobuling to Helicobacter Pylori: a multicenter study. *Eur J. Gastroentoerol Hepatol* 2000; 1117 - 1120.
44. Malaty HM., Logan ND., Grahan DY., Ramchatosingh JE., Rddy SG., Helicobacter Pylori infection in asymptomatic children: comparison of diagnostic tests. *Helicobacter* 2000, 5: 155-159.
45. Kim N., LimSH., Lee KH., You JY., Kim JM., Lee NR., et al Helicobacter Pylori in dental pla-que and saliva. *Korean J Intern Med* 2000; 15: 187-194.
46. Colin R., Czernichow p., Baty V., Tozue U., Brazier F., Bretagne JF., et al. Low sensitivity of invasive test for the detection of Helicobacter Pylori infection in patients with bleeding peptic ulcer. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24: 31-5.
47. Oderda G., Rapa A., Ronchi B., et al. Detection of Helicobacter Pylori in stool specimens by non-invasive antigen enzyme immunoassay in children; multicentre Italian study, *BMJ* 2000.
48. Grino P., Pascual S., such J., Casellas JA., Niveiro M., Andrew M., et al. Comparison of Diagnostic methods for Helicobacter Pylori infection in patients with upper gastrointestinal bleed-ing. *Seand J Gastroenterol* 2001; 16: 147-52.
49. Chung IK., Hong SJ., Kim EJ., Cho JY., Kim HS., Park SH et al. What is the bast methods to diagnose Helicobacter infection in bleeding peptic ulcer? A prospective trial korean *J Inform Med.* 2001; 16: 147-52.
50. Ogara, S. K.; Kawakrri, E.; Patricio, F. R. S.; Pedroso, M. Z.; Santos, A. M.C Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in symptoma-tic children and adolescents. *Sao Paulo medical journal.* Vol. 119. Issuye: 2. Pags. 67-71. Año 2001.
51. Odaka T., Yamoguchi T., Koyama H., Sisho H., Nombra F., Evaluation of the Helicobacter Pylori stool antigen test for monitoring eradication therapy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 595-9.
52. Vaira D., Vakil N., Menegatti M., et al. The stool antigen test for detection of Helicobacter Pylori after eradication therapy. *Am Intern Med* 2002; 136-280.
53. Van Leerdam ME., Van der Ende A., Ten Kate FJW., Raws EAJ., Tytgat GNJ., lack of accuary of the non-invasive Helicobacter Pylori stool antigen test in patients with gastroduodenal ulcer bleed-ing. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 798-801.
54. Stephen J., Bickston MD., David A., Peura MD. Diagnostic test for Helicobacter Pylori infec-tion. Up to Date version 112 CDRoom 2003.

Para cualquier información o separata contactar a la:
 Dra. Marianela Añez. Servicio de Gastroenterología Hospital Universitario de Maracaibo.
E-mail: marianep@cantv.net
 Fecha de Recepción Sep. 2005- Fecha de Revisión Feb. 2006- Fecha de Aprobación. Abr. 2006