

Desarrollo de un método serológico propio para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* y su comparación con dos juegos comerciales

Lino E. Torres, Ludisleydis Bermúdez, Yampier Roblejo, Arlenis Moreno, Marcia Samada, Juan Cansino,** Margot Martínez,* Carlos Sabatier,** Rafael Fando, Mayrín Hernández y Boris L Rodríguez.**

Departamento de Microbiología e Inmunología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana. Departamentos de *Microbiología, **Gastroenterología y ***Anatomía Patológica del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: boris.rodriguez@cnic.edu.cu

Recibido: 28 de agosto de 2007.

Aceptado: 23 de octubre de 2007.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, diagnóstico, serología, Western Blot.

Key words: *Helicobacter pylori*, diagnosis, serology, Western Blot.

RESUMEN. El diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori*, presenta múltiples ventajas sobre las técnicas directas (cultivo, análisis histológico, prueba de la ureasa y PCR), siendo la principal la de ser menos invasivo para el paciente. Los objetivos del presente estudio consistieron en desarrollar un método serológico basado en una preparación antigénica de la cepa de referencia de *H. pylori* CCUG-17874 y evaluar su eficacia en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en pacientes dispépticos. La técnica empleada fue el Western blot y su efectividad se evaluó comparando sus resultados con los obtenidos con dos juegos serológicos comerciales, para el mismo grupo de sueros. La positividad o negatividad de cada paciente a la infección por *H. pylori* se determinó en un estudio previo, donde se emplearon las técnicas estándar de oro para el diagnóstico de esta infección. De los 116 sueros evaluados por las tres técnicas serológicas, 94 (81 %) resultaron positivos por Western Blot; siendo la técnica que mayor cantidad de positivos detectó y la de mayor coincidencia (83,6 %) con las técnicas estándar de oro. Además, el método serológico desarrollado exhibió también mayor sensibilidad (95,2 %) y exactitud (83,6 %) que los dos juegos comerciales empleados. La técnica serológica desarrollada en este estudio, presentó mejor efectividad en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* que los dos juegos comerciales, por lo que puede ser empleada en estudios epidemiológicos, así como para realizar la estrategia del análisis serológico previo a la endoscopia en los pacientes dispépticos.

ABSTRACT. Serological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection offers several advantages in comparison with direct techniques (culture, histology, urease test and PCR), been the most important one to be less invasive for patients. The aims of this study were the development of a serological test based on an antigenic preparation from CCUG-17874 *H. pylori* reference strain and the evaluation of its efficacy to diagnose *H. pylori* infection in dyspeptic patients. Western Blot was the selected technique and its efficacy was evaluated comparing its results with the obtained using two commercial serologic kits and the same sera set. *H. pylori* status of each patient was determined in a previous study, using *H. pylori* gold standard diagnostic techniques. From 116 serum tested in all serological techniques, 94 (81 %) were positive by Western Blot, which was the best assay to detect positive results and also showed the highest coincident (83.6 %) with gold standard techniques. Additionally, the major values of sensitivity (95.2 %) and accuracy (83.6 %) were also obtained by Western Blot. The serological technique developed here was more effective to diagnose *H. pylori* infection than both commercial kits, therefore, It can be used in epidemiological studies and for the test and scope strategy in dyspeptic patients.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria gram-negativa de morfología bacilar, microaerófila y que coloniza exitosamente la mucosa gástrica humana. Dicho microorganismo fue aislado por primera vez en 1983 por los investigadores australianos Marshall y Warren.¹ Este patógeno es el principal agente etiológico de diversas patologías del tracto gastro-intestinal e infecta aproximadamente a la mitad de la población mundial.²

Las técnicas empleadas para el diagnóstico de *H. pylori* se dividen en dos grupos: técnicas invasivas

(cultivo, tinciones histológicas, prueba rápida de la ureasa y PCR), que requieren la realización de una endoscopia gástrica para la toma de biopsias y técnicas no invasivas (serología, la prueba del aliento y detección de antígenos en heces fecales) que son menos agresivas para el paciente.³ La serología es una técnica poco invasiva, fácil de realizar, reproducible, económica y ampliamente empleada en estudios epidemiológicos.³ Existen múltiples juegos serológicos comerciales que detectan la respuesta de anticuerpos contra antígenos de *H. pylori*,⁴ pero dada la heterogeneidad de las cepas y la variedad de las preparaciones antigénicas empleada

en cada juego comercial, resulta necesario la validación de cada uno de ellos en la población donde se pretenda hacer extensivo su empleo para el diagnóstico.⁵ A pesar de sus ventajas, en Cuba no se ha desarrollado ningún juego serológico para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* y sólo se han empleado algunos comerciales para la detección serológica de la infección en los estudios realizados.⁶⁻¹⁰ Por todo lo anterior, los objetivos de este trabajo consistieron en: desarrollar un Western Blot (WB), a partir de un extracto proteico acuoso de *H. pylori*, para el diagnóstico serológico de la infección por este patógeno, así como comparar la efectividad en la detección de la infección del método desarrollado con respecto a dos juegos serológicos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de la cepa CCUG-17874

En este estudio se empleó la cepa de referencia de *H. pylori* CCUG-17874.¹¹ Con el objetivo de preparar extractos proteicos de esta cepa, la que fue cultivada a partir de la colección de cultivos del laboratorio, donde estaba conservada a -70 °C en viales con 500 µL de medio Brucella (BioCen, Cuba), suplementado con suero fetal bovino (5 %) y glicerol al 20 %. Los viales se vertieron en placas con medio de cultivo agar Base Columbia (BioCen, Cuba) suplementado al 7 % con sangre humana y se esparció el contenido en forma de césped. Estas placas se incubaron a 37 °C en jarras anaeróbicas con ambiente de microaerofilia durante 72 h y luego, se observaron en estereoscopio. Las colonias características de *H. pylori* fueron identificadas por las pruebas bioquímicas de: ureasa, oxidasa y catalasa, así como también, se les realizó la tinción de Gram.¹²

Extracto proteico acuoso

Después de haber cultivado satisfactoriamente la cepa CCUG-17874, se procedió a preparar un extracto proteico acuoso, tal y como se ha descrito previamente.^{13,14} Con este fin, se tomaron de cuatro a seis placas totalmente crecidas y se colectó la biomasa en 25 mL de disolución salina estéril. Luego, se centrifugó a 4 500g por 15 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril. Esta suspensión se agitó vigorosamente mediante un vórtex y se centrifugó a 12 000g por 20 min. Finalmente, se colectó el sobrenadante y se conservó en un vial a -20 °C hasta su utilización. La concentración de proteínas fue determinada con el método de Bradford.¹⁵

SDS-PAGE

Para analizar el perfil de proteínas que se obtuvo mediante el método de extracción acuosa, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).¹⁵ Para ello, los geles se prepararon a una concentración de 12 % de acrilamida y en diferentes carriles se aplicaron 5 µg del extracto proteico y 5 µL de un patrón de peso molecular (Promega, USA), que cubre el espectro de tallas moleculares en el que se encuentran la mayoría de las proteínas de *H. pylori* (de 10 hasta 225 kDa).¹⁶ Las imágenes de los geles fueron captadas con el equipo de bioimágenes Gene Genius (Syngene, Reino Unido) y procesadas con el programa de computación Gene tools.

Western blot

La técnica del WB se desarrolló según el procedimiento descrito¹⁷ y se emplearon membranas de nitrocelulosa HybondTM-C (Amersham, Reino Unido). Luego de la

transferencia, los fragmentos de membranas pertenecientes al patrón de peso molecular fueron teñidos durante 10 min con rojo ponceau al 0,5 % (disuelto en una disolución de ácido tricloroacético 5 %) y luego, lavados con agua destilada hasta visualizar las bandas.

Para corroborar la inmunorreacción del extracto proteico obtenido, se prepararon mezclas independientes con tres sueros de pacientes positivos y tres negativos a la infección por *H. pylori*. La negatividad o positividad de los sueros escogidos fueron determinadas en un trabajo previo⁶ y la clasificación de dichos sueros coincidía en todas las técnicas de diagnóstico empleadas.

Diferentes tiras de nitrocelulosa se incubaron con las dos mezclas de sueros (diluidas 1:100 en disolución estabilizadora de fosfato salino con tween-20 0,05 %) durante 5 hrs con agitación y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las tiras se lavaron e incubaron durante una hora con un anticuerpo monoclonal específico para la cadena pesada de la IgG humana conjugado a peroxidasa (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) y diluido 1 : 1000 en disolución estabilizadora de fosfato salino con tween-20 0,05 % y leche descremada al 1 %. Finalmente, se visualizaron las bandas con una disolución de diaminobenzidina (0,24 %) disuelta en disolución estabilizadora Tris (20 mmol/L, pH 7,6), al que se le añadieron 15 µL de peróxido de hidrógeno 30 %.

Los 116 sueros de pacientes dispépticos cubanos, del estudio anterior de Roblejo y cols.⁶ fueron analizados para la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Todas las imágenes de los WB fueron procesadas con el mismo equipo y programa descrito en el acápite de SDS-PAGE.

Luego de tener en cuenta los criterios de positividad y negatividad establecidos para el WB por diferentes autores^{16,18,19} y sobre la base de los propios resultados, se estableció un criterio propio para adjudicar la positividad o negatividad de los sueros analizados. Este criterio incluyó dividir el perfil de bandas de inmunorreacción de los sueros en tres zonas: la alta, con bandas por encima de 70 kDa; la intermedia, con bandas entre 45 y 70 kDa y la baja, con bandas por debajo de los 45 kDa. Atendiendo a este criterio, un paciente es positivo si en su perfil de inmunorreacción se observan una de las combinaciones siguientes: dos o más bandas en la zona alta, al menos tres bandas en la zona intermedia; donde una sea 64 kDa y ninguna sea 59 kDa o al menos dos bandas en la zona baja.

Juegos serológicos comerciales

Los 116 sueros en estudio fueron también evaluados con dos juegos serológicos comerciales: Oxoid Pylori Test (Oxoid, Reino Unido), que se basa en la aglutinación en látex y Hexagon *H. pylori* (Human, Alemania) cuyo principio es la inmunocromatografía. Ambos juegos detectan cualitativamente anticuerpos anti-*H. pylori* de las clases IgG, IgA, e IgM. Cada evaluación se ejecutó según las instrucciones de los fabricantes.

Cálculo de las variables de desempeño de las técnicas de diagnóstico

Para comparar los resultados obtenidos con la técnica de WB con los dos juegos serológicos comerciales, se calcularon varios indicadores de desempeño diagnóstico. Para ello, se tuvo en cuenta la negatividad o positividad real a la infección con *H. pylori* de cada uno de los 116 pacientes, clasificación que había sido realizada previamente en el trabajo de Roblejo y cols.⁶ Las fórmulas empleadas en los cálculos se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Predicción de positividad} &= \frac{\text{Verdaderos positivos detectados por la técnica}}{\text{Positivos totales detectados por la técnica}} && \bullet 100 \\ \text{Predicción de negatividad} &= \frac{\text{Verdaderos negativos detectados por la técnica}}{\text{Negativos totales detectados por la técnica}} && \bullet 100 \\ \text{Sensibilidad} &= \frac{\text{Verdaderos positivos detectados por la técnica}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos detectados por la técnica}} && \bullet 100 \\ \text{Especificidad} &= \frac{\text{Verdaderos negativos detectados por la técnica}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos detectados por la técnica}} && \bullet 100 \\ \text{Exactitud} &= \frac{\text{Verdaderos negativos} + \text{Verdaderos positivos detectados por la técnica}}{\text{Total de muestras analizadas}} && \bullet 100 \end{aligned}$$

RESULTADOS

Cultivo de la cepa, obtención del extracto proteico y análisis en SDS-PAGE

El cultivo de la cepa 17874 se logró satisfactoriamente. Cada placa sembrada con esta cepa fue observada al estereoscopio y fueron identificadas las colonias características de *H. pylori*, las cuales resultaron positivas a las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y ureasa. La tinción de Gram evidenció la presencia de bacilos espiralados y Gram-negativos. Lo anterior confirmó que se trabajó con cultivos puros de *H. pylori*.

El crudo proteico acuoso de la cepa de referencia 17874 se obtuvo en aproximadamente 2 mL y la concentración de proteínas fue de 2,3 mg/mL. Al realizar la corrida electroforética de este crudo en SDS-PAGE, se pudo apreciar la presencia de unas 10 bandas de proteínas mayoritarias, que se correspondieron con los pesos moleculares aproximados de: 80, 70, 66, 59, 45, 40, 26, 21, 12,5 y 12 kDa y aproximadamente 9 bandas de las minoritarias (Fig. 1).

Western blot

La mezcla de sueros de los pacientes que habían sido clasificados como negativos por las técnicas estándar en el estudio de Roblejo y cols.,⁶ solo reaccionó con una banda a la altura de los 59 kDa (Fig. 2, panel A). La mezcla de sueros de los pacientes positivos a la infección por *H. pylori*, mostró una fuerte reacción en las tallas moleculares de: 16, 26, 40, 45, 48, 59 y 80 kDa y otra serie de bandas de inmunorreactividad evidente, pero menos intensa, a la altura de los 12, 17, 19, 22 y 32 kDa (Fig. 2, panel A).

Los 116 sueros de pacientes dispépticos fueron también evaluados por WB con el extracto proteico acuoso (Fig. 2, panel B), de ellos 94 resultaron positivos (81 %) y 22 negativos (19 %). La mayor parte de los sueros positivos mostraron un perfil de inmunorreactividad muy similar al de la mezcla de sueros positivos y los negativos que reaccionaron contra el extracto acuoso, solo mostraron una o dos bandas en la zona de 60 kDa (Fig. 2, panel B).

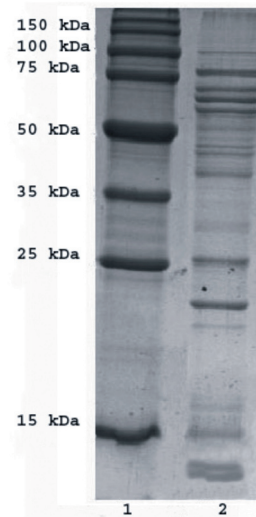


Fig. 1. SDS-PAGE del crudo proteico acuoso de la cepa de referencia de *H. pylori* CCUG-17874 en un gel al 12 %. Carril 1: 5 µL de patrón de peso molecular (Promega, USA), se indican las tallas moleculares de las bandas correspondientes al patrón de peso. Carril 2: 5 µg del crudo proteico acuoso extraído de la cepa CCUG-17874.

Comparación del WB con los juegos serológicos comerciales

Los resultados de positividad y negatividad se evaluaron en los 116 sueros de los pacientes diagnosticados por las tres técnicas serológicas comparadas en este estudio de los que además, se poseían los resultados de las técnicas directas estándar de oro (Tabla 1). Como se puede observar, la técnica serológica que más positivos detectó fue el WB, mientras que los dos juegos comerciales detectaron porcentajes similares de positividad.

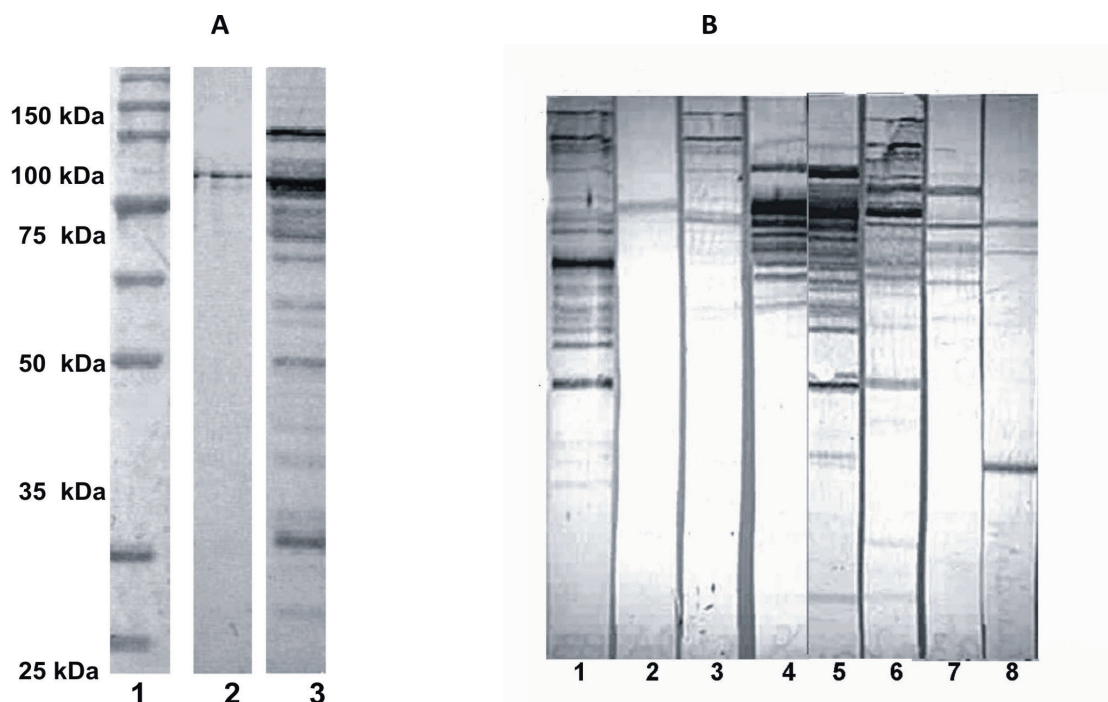


Fig. 2. Panel A: Western blot del crudo proteico acuoso de la cepa de *H. pylori* CCUG-17874, con mezclas de sueros de pacientes positivos y negativos a la infección por *H. pylori*. Carril 1: Patrón de peso molecular (Promega, USA). Carril 2: tira incubada con la mezcla de sueros de pacientes negativos. Carril 3: tira incubada con la mezcla de sueros de pacientes positivos. Panel B: Western blot del crudo proteico incubado con sueros de ocho pacientes incluidos en el estudio. Se puede evidenciar la presencia de sueros positivos (carriles 1, 3, 4, 5, 6 y 8) y un suero negativo (carril 2).

Tabla 1. Resultados obtenidos con los dos juegos serológicos comerciales, el WB y las técnicas directas estándares de los 116 pacientes evaluados.

Detección serológica	Western Blot	Prueba Oxoid Pylori	Hexagon <i>H. pylori</i>	Técnicas estándar
Positivos	94 (81 %)	83 (71,6 %)	78 (67,2 %)	83 (71,6 %)
Negativos	22 (19 %)	33 (28,4 %)	38 (32,8 %)	33 (28,4 %)

Tabla 2. Valores de predicción de positividad y negatividad del WB y de los juegos serológicos comerciales basados en las técnicas directas estándar.

Valores predictivos de las técnicas	Western Blot	Prueba Oxoid Pylori	Hexagon <i>H. pylori</i>
Positividad (%)	84,1	79,5	84,6
Negatividad (%)	81,8	48,5	55,3

El WB fue la técnica que mostró la mayor coincidencia con las técnicas directas estándar con un 83,6 %, seguido por el juego comercial Hexagon *H. pylori* (75 %) y por último, el Oxoid Pylori Test (70,7 %).

Adicionalmente, se calcularon los valores de predicción de positividad y negatividad del WB y de los juegos comerciales serológicos en base a los resultados obtenidos por las técnicas directas estándares (Tabla 2). Las tres técnicas serológicas de diagnóstico presentan un valor predictivo de positividad cercano, pero solo el WB evidenció un alto valor predictivo de negatividad. Por otra parte, la sensibilidad, especificidad y exactitud de las tres técnicas serológicas, respecto a las técnicas directas estándar fueron también calculados (Tabla 3).

Los valores más elevados de sensibilidad y exactitud se lograron con el WB, siendo ambos indicadores similares para los dos juegos comerciales. La especificidad de las tres técnicas serológicas fue muy baja, siendo el juego comercial Hexagon *H. pylori* el de mejor desempeño.

DISCUSIÓN

Dada la gran incidencia a nivel mundial de la infección por *H. pylori*,² numerosos grupos de investigación han enfocado sus estudios en el desarrollo de técnicas de diagnóstico eficaces para la detección de este microorganismo. Dentro de ellas, se encuentra la serología, que posee la ventaja de ser no invasiva, fácil de realizar, y por su bajo costo ha sido muy utilizada para diagnosticar

Tabla 3. Comparación de los juegos serológicos comerciales y el WB en cuanto a sensibilidad, especificidad y exactitud.

Indicador	Western Blot	Prueba Oxoid Pylori	Hexagon H. pylori
Sensibilidad (%)	95,2	79,5	79,5
Especificidad (%)	54,5	48,5	63,6
Exactitud (%)	83,6	70,7	75

la infección por *H. pylori*, sobre todo en estudios epidemiológicos.²⁰ Además, las técnicas serológicas no están influenciadas por el error asociado a la toma de muestra, lo que sí sucede con las técnicas directas basadas en la toma de biopsias gástricas.²⁰ La principal limitación de las técnicas serológicas es que no discriminan entre una infección previa y una activa, por lo que no pueden ser empleadas para comprobar la erradicación de la infección a corto plazo.⁵ El WB como técnica de diagnóstico serológico, tiene la gran ventaja de permitir establecer asociaciones entre la presencia de determinados factores de patogenia y el desarrollo de patologías más severas,²¹ así como determinar la inmunorreacción de proteínas con mayor valor diagnóstico, que tienen mayor capacidad para indicar la erradicación de la infección.²²

El extracto antigénico empleado para el desarrollo del WB obtenido a partir de la cepa CCUG-17874, mostró el perfil proteico en SDS-PAGE característico de la especie *H. pylori* (Fig. 1).¹³ La inmunorreactividad del extracto se evaluó con una mezcla de sueros de pacientes positivos y otra de sueros de pacientes negativos a la infección por *H. pylori*, clasificados como tal por los resultados obtenidos con las técnicas estándar de diagnóstico en un trabajo previo.⁶ Se escogió una mezcla de sueros con el objetivo de obtener todas las bandas de inmunorreacción posibles, sobre todo, en el caso de los sueros positivos, para que el resultado no estuviese sesgado a la inmunorreactividad de sueros independientes, ya que el perfil de inmunorreacción difiere entre los pacientes (Fig. 2, panel B). La mezcla de sueros positivos reaccionó contra la mayoría de los antígenos de *H. pylori* (Fig. 2, panel A), por lo que el WB coincidió con los resultados obtenidos para estos pacientes con las técnicas estándar de diagnóstico.⁶ Además, los perfiles de inmunorreacción que se obtuvieron coinciden con los reportados para *H. pylori*.^{16,19,23} Por otra parte, con la mezcla de sueros negativos solo se observó inmunorreactividad a la altura de los 59 kDa (Fig. 2, panel A). Esta reacción fue considerada negativa, ya que en este peso molecular se encuentra una proteína de estrés térmico²⁴ que es homóloga a la de otras bacterias Gram negativas^{19,25} y por tanto, los anticuerpos humanos la reconocen, aún cuando los individuos no estén infectados con *H. pylori*. Por esta razón, la banda de inmunorreacción de esa talla molecular fue excluida del criterio de positividad empleado.

Después de corroborar la especificidad del WB, se procedió a realizar los ensayos necesarios para evaluar los 116 sueros de pacientes que formaron parte de este estudio. Se pudo apreciar que existe variabilidad entre los perfiles de inmunorreacción encontrados, particularmente entre los sueros positivos, que podían presentar mayor inmunorreacción en la zona de bajo peso molecular, en la media o en la alta (Fig. 2, panel B). Teniendo en cuenta el criterio de positividad establecido para el WB en este trabajo, el 81 % de los sueros evaluados fueron positivos y el 19 % negativos. Al comparar los resultados del WB con los obtenidos por los dos juegos comerciales, se evidenció la mayor sensibilidad del

primero, ya que fue la técnica que mayor cantidad de positivos detectó (Tabla 1). Lo anterior es consistente con resultados previos, donde el WB ha mostrado una elevada sensibilidad en la detección de la infección por *H. pylori*.^{16,19,26} Adicionalmente, solo el WB mostró valores predictivos de positividad y negatividad elevados (Tabla 2), lo que incidió en que fuera la técnica de mejor concordancia con las técnicas estándar de oro, al alcanzar un 83 % de coincidencia. Por otra parte, la especificidad de los tres métodos serológicos de diagnóstico fue muy baja (Tabla 3). En el caso del WB, el factor que determinó la baja especificidad de la técnica fue la presencia de 15 positivos, clasificados como negativos por el criterio establecido por Roblejo y cols. al emplear las técnicas estándar de oro.⁶ Sin embargo, de estos 15 falsos positivos, 11 habían sido positivos por PCR en el trabajo Roblejo y cols.⁶ y de ellos seis también fueron positivos por las tres técnicas serológicas empleadas en este estudio. Entonces, si se considerara estas seis muestras como verdaderas positivas, la especificidad del WB se incrementaría hasta un 66,6 %, mientras que si las 11 muestras positivas por PCR se clasificaran como verdaderas positivas, la especificidad del WB pudiera alcanzar el 81,8 %. Consecuentemente con este análisis, las otras técnicas serológicas comerciales también verían aumentada su especificidad. Por lo anterior, en futuros estudios comparativos tendrá que cambiarse el criterio de positividad de las técnicas directas y quizás se deberá incluir el resultado de la PCR, por sí solo, para adjudicar la positividad de los pacientes en estudio, lo que estaría avalado por la gran sensibilidad de esta técnica en el diagnóstico de *H. pylori*.^{6,27} Otra posibilidad es que se empleen otras técnicas de diagnóstico directo como la detección de antígenos en heces o el análisis del aliento con urea marcada, complementarios a la PCR, y así evitar las dificultades que introducen el cultivo y la histología en el diagnóstico, las que terminan afectando los indicadores de desempeño de los métodos serológicos.²⁰

La exactitud es la variable de diagnóstico que incluye todos los anteriormente analizados y en consecuencia los mejores valores los alcanzó el WB desarrollado en este trabajo (Tabla 3). La baja eficacia de los juegos serológicos comerciales empleados en este trabajo pudo deberse a diferencias entre las cepas predominantes en esta región geográfica y las que se utilizaron para preparar el juego diagnóstico o a las diferencias entre poblaciones de la respuesta inmune del hospedero.²⁸ Es por ello que se recomienda la validación de cada juego serológico comercial en la población específica donde se quiera emplear.⁵ De hecho, varios juegos comerciales que se basan en la serología para el diagnóstico, han reportado resultados muy por debajo de los indicados por sus fabricantes, cuando se han evaluado en diferentes poblaciones.²⁹

Por todo lo anterior, se considera que los métodos serológicos tienen una gran potencialidad, no totalmente explotada, en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Y pudieran ser utilizados no solo en estudios epidemio-

lógicos o en la estrategia de analizar serológicamente para luego realizar una endoscopia, sino también, en la variante de análisis serológico para indicar tratamiento a los pacientes. Esta última modalidad ha sido recomendada en personas jóvenes con síntomas epigástricos, ya que tienen grandes probabilidades de estar infectados con *H. pylori*.²⁰

CONCLUSIONES

El método de extracción acuoso de proteínas fue eficiente en aportar un crudo proteico útil para la detección serológica de la infección por *H. pylori*. El WB desarrollado mostró una gran sensibilidad para el diagnóstico serológico de la infección por *H. pylori*, por lo que pudiera ser empleado para estudios epidemiológicos y para el diagnóstico de pacientes dispépticos, empleando la estrategia para diagnosticar por serología y luego realizar endoscopia. Se evidenció que los juegos serológicos comerciales evaluados, además de ser caros, no son eficientes en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Adicionalmente, se demostró la potencialidad para desarrollar una técnica serológica propia de diagnóstico para introducirla en el Sistema de Salud cubano.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Anne-Marie Svennerholm de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, por haber donado al laboratorio la cepa de referencia de *H. pylori* CCUG17874.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall B.J. and Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, 1311-1315, 1984.
2. Go M.F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **16 Suppl 1**, 3-15, 2002.
3. Gatta L., Ricci C., Tampieri A. and Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Microbiol. Infect.**, **9**, 489-496, 2003.
4. Sabbi T., De Angelis P., Colistro F., Dall'Oglio L., di Abriola G.F. and Castro M. Efficacy of noninvasive tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, **159**, 238-241, 2005.
5. Treepongkaruna S., Nopchinda S., Taweewongsounon A., Atisook K., Pienvichit P., Vithayasai N. et al. A Rapid Serologic Test and Immunoblotting for the Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Children. **J. Trop. Pediatr.**, 2006.
6. Roblejo Y., Samada M., González J., Alfonso C., Martínez M., Marrero A. et al. Comparación de métodos diagnósticos de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **36**, 191-197, 2005.
7. Valmaseda T., Gisbert J.P., Paniagua M. and Pajares J.M. [*Helicobacter pylori* CagA antibodies in various gastroduodenal diseases from 2 different populations]. **Med. Clin. (Barc.)**, **118**, 90-93, 2002.
8. Cabrera E., Tiberti C., Fuentes M., Perich P., Puig M., Vecchi E. et al. *Helicobacter pylori* y anticuerpos anti islotes pancreáticos en la diabetes mellitus. **Rev. Cubana Endocrinol.**, **13**, 17-27, 2002.
9. Ruiz V., Reboso J. and Henández-Triana M. Asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y anemia en niños de edad escolar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, **24**, 2005.
10. Henández-Triana M., Cabrera A., Álvarez C. and Díaz M.E. *Helicobacter pylori* en niños menores de 2 años de edad aparentemente sanos o afectados por diarreas crónicas. **Rev. Cubana Aliment. Nutr.**, **15**, 37-41, 2001.
11. Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins M.D., Sly L. et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **39**, 397-405, 1989.
12. Megraud F. Diagnostic modalities for the detection of *Helicobacter pylori*. **Drugs Today (Barc.)**, **35**, 419-427, 1999.
13. Sharma S.A., Miller G.G., Perez-Perez G.I., Gupta R.S. and Blaser M.J. Humoral and cellular immune recognition of *Helicobacter pylori* proteins are not concordant. **Clin. Exp. Immunol.**, **97**, 126-132, 1994.
14. Dunn B.E., Roop R., Ching C., Sharma S., Perez-Perez G.I. and Blaser M. Identification and Purification of a cpn60 Heat Shock Protein Homolog from *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, **60**, 1946-1951, 1992.
15. Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. Gel Electrophoresis In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed) Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition., 1847-1855, 1989.
16. Nilsson I., Ljungh A., Aleljung P. and Wadstrom T. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. **J. Clin. Microbiol.**, **35**, 427-432, 1997.
17. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **76**, 4350-4354, 1979.
18. Faulde M., Cremer J. and Zoller L. Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. **Electrophoresis**, **14**, 945-951, 1993.
19. Lepper P.M., Moricke A., Vogt K., Bode G. and Trautmann M. Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **11**, 569-576, 2004.
20. Mégraud F. On Behalf Of The European Paediatric Task Force On *Helicobacter pylori*. Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: Results of a Multicenter European Study. **J. Pediatr.**, **146**, 198-203, 2005.
21. Vilaichone R.K., Mahachai V., Kositchaiwat C., Graham D.Y. and Yamaoka Y. Relation between seroreactivity to low-molecular-weight *Helicobacter pylori*-specific antigens and disease presentation. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **10**, 1025-1028, 2003.
22. Voland P., Weeks D.L., Vaira D., Prinz C. and Sachs G. Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **16**, 533-544, 2002.
23. Aucher P., Petit M.L., Mannant P.R., Pezennec L., Babin P. and Fauchere J.L. Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. **J. Clin. Microbiol.**, **36**, 931-936, 1998.
24. Backert S., Kwok T., Schmid M., Selbach M., Moese S., Peek R.M., Jr. et al. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics.**, **5**, 1331-1345, 2005.
25. Park J.W., Song J.Y., Lee S.G., Jun J.S., Park J.U., Chung M.J. et al. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. **Helicobacter**, **11**, 533-543, 2006.
26. Trautmann M., Moldrzyk K., Vogt J. and Held R. Use of receiver operating characteristic in the evaluation of two commercial enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **13**, 812-819, 1994.
27. Fawcett P., Vinette K., Gibney K. and Proujansky R. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. **BMC Microbiol.**, **5**, 2004.
28. Day A.S. and Sherman P.M. Accuracy of office-based immunoassays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **Helicobacter**, **7**, 205-209, 2002.
29. Megraud F. and Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, **20**, 280-322, 2007.