

Comparación de métodos en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales

Yampier Roblejo Suárez, Marcia Samada,* Juan González Cansino,* Carlos Alfonso Sabatier, Margot Martínez Arroyo,*** Arlenis Marrero, Rafael Fando y Boris Luis Rodríguez González.**

Dpto. de Genética, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. *Dpto. de Gastroenterología, **Dpto. de Anatomía Patológica, ***Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de septiembre de 2004. Aceptado: 3 de noviembre de 2004.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, PCR, métodos de diagnóstico.
Key words: *Helicobacter pylori*, PCR, diagnostic methods.

RESUMEN. En este trabajo se emplearon tres métodos directos (histología, cultivo microbiológico y PCR) y uno indirecto (serología) para la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes con diferentes patologías gastrointestinales. En la detección histológica se empleó la coloración de hematoxilina-eosina y para el cultivo un medio de crecimiento específico. En la PCR se evaluaron dos juegos de cebadores específicos, uno que amplifica en el gen que codifica para la enzima fosfoglucoamina mutasa (*glmM*) y el otro en el *16S ADNr*. Asimismo, la detección serológica se realizó empleando un juego de diagnóstico comercial. Se estudiaron 141 pacientes. Se observó la presencia del microorganismo en el 57,6 y 64,4 % de los individuos, por cultivo e histología, respectivamente. Con la PCR y el juego de cebadores para el gen *glmM* se detectó el mayor número de casos positivos, 116 (82,3 %), seguido por los cebadores para el gen *16S ADNr*; 93 (66 %). También se detectaron anticuerpos específicos contra *H. pylori* en el 61,1 % de los pacientes. La concordancia entre todas las técnicas de diagnóstico directo fue de 66,1 %. Además, en pacientes con úlcera, tanto por cultivo-histología como por la PCR (con cebadores para *glmM*) la detección sobrepasó el 80 %, siendo de hasta un 94 % en la úlcera duodenal. Se encontró una presencia significativamente mayor de *H. pylori* en pacientes con gastritis ($p < 0,05$) y úlcera duodenal ($p < 0,01$) al evaluarla por las técnicas de cultivo-histología. También se encontraron diferencias significativas en la detección del microorganismo en pacientes con gastritis y úlcera duodenal ($p < 0,05$) al realizar la técnica de PCR con los cebadores para *glmM*. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en la infección por *H. pylori* de pacientes con mucosa gástrica sin alteraciones o con úlcera gástrica, al analizarla por cualquiera de los métodos de diagnóstico empleados. Se demostró que de las técnicas empleadas, la PCR es la mejor para la detección de *H. pylori* y que el juego de cebadores que amplifican en el gen *glmM* tiene la mayor sensibilidad. Además, se observó que entre los pacientes estudiados, la úlcera duodenal resultó la patología con mayor incidencia de casos positivos a *H. pylori*, seguida por la úlcera gástrica y la gastritis.

ABSTRACT. Here it was used three different direct methods (histology, culture and PCR) and one indirect (serology) to detect *Helicobacter pylori* infection in patients suffering several gastrointestinal diseases. The hematoxylin-eosin stain and a specific media were used to detect the microorganism by histology and culture, respectively. Two different sets of primers were used in the PCR methods, one of them amplified in the *16S DNAr* coding gene and the other in the phosphoglucoamine mutase gene (*glmM*). On the other hand, a commercial diagnostic kit was used to detect serological antibodies. From the 141 patients studied, the microorganism was present in 57.6 and 64.4 % of them by culture and histology, respectively. The highest number of *H. pylori* positive patients were detected by the PCR using the *glmM* primer set, 116 (82.3 %), follow by the PCR with the *16S DNAr* primer set, 93 (66 %). Additionally, specific *H. pylori* antibodies were detected in 61.1 % of the patients. A concordance of 66.1 % was obtained among all direct techniques used. Furthermore,

in both, culture-histology and PCR using the *glmM* primers, the infected patients were higher than 80 %, rising up to 94 % in duodenal ulcer. It was found a significantly higher *H. pylori* prevalence in patients with gastritis ($p < 0.05$) and duodenal ulcer ($p < 0.01$) by culture-histology. In addition, statistical differences were also obtained in the infected subjects with gastritis and duodenal ulcer ($p < 0.05$) with PCR using the *glmM* primer set. However, there were not statistical differences in *H. pylori* infection among patients with normal gastric mucous or gastric ulcer, analyzed by all diagnostic methods used in this study. This paper demonstrated that PCR and the *glmM* primer set was the best combination to detect *H. pylori* infection with the highest sensitivity. The authors also observed a higher prevalence of *H. pylori* infection in subjects with duodenal ulcer, follow by gastric ulcer and gastritis.

INTRODUCCION

Helicobacter pylori fue aislado por primera vez en 1983 por Marshall y Warren.¹ Estos microorganismos son espiralados, microaerófilos, Gram negativos y con extremos redondeados cuando se observan directamente de biopsias gástricas. Sin embargo, al cultivarlos sobre medios artificiales, adquieren formas cocoides y las formas en espiral son escasas o no se observan.² Asimismo, están fuertemente asociados con diferentes desórdenes gastroduodenales como gastritis, úlceras pépticas, linfoma MALT de bajo grado y cáncer gástrico.^{3,4}

Uno de los aspectos de la infección por *H. pylori* en los que más se ha trabajado y avanzado es el diagnóstico. Actualmente se dispone de una amplia variedad de técnicas para la detección de estos microorganismos, las cuales tienen una gran fiabilidad. Se pueden realizar métodos directos, que son aquellos que detectan la presencia de la bacteria o el genoma de esta (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares), o indirectos, que son los que aprovechan algunas características del microorganismo (prueba rápida de la urea, prueba del aliento con urea marcada, técnicas serológicas).⁵ Actualmente, se dispone de técnicas menos invasivas tales como: la detección del microorganismo en heces fecales empleando un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales y el cultivo a partir de la ingestión de una cápsula atada a una cuerda.^{6,7} Gracias al desarrollo de estos métodos, se ha podido avanzar en el conocimiento del papel que representa esta bacteria en las patologías gastroduodenales, en la historia natural del microorganismo, en su epidemiología y en la valoración de la eficacia de los diferentes tratamientos empleados para su erradicación.⁸

Hasta el momento no existe una prueba de referencia absoluta para el diagnóstico de *H. pylori*, a pesar de que la histología y el cultivo microbiológico siguen siendo las más empleadas.⁹ En muchas enfermedades infecciosas el cultivo es la técnica patrón, dada su elevadísima sensibilidad, así como su total especificidad.⁵ Sin embargo, en el caso de *H. pylori* el cultivo es una técnica problemática, dadas las características peculiares del microorganismo, por lo que si no se cuenta con las condiciones y experiencia necesaria, la posibilidad de aislarlo se reduce considerablemente.^{10,11} Por todo lo anterior, como metodología de referencia en la detección de la infección por *H. pylori*, debe combinarse el cultivo microbiológico y los estudios histológicos de las biopsias.¹²

De todas las técnicas de detección antes mencionadas, sólo la histología y la prueba rápida de la ureasa han sido empleadas con regularidad en Cuba para la detección del microorganismo en pacientes con diferentes patologías gastroduodenales.^{13,14} Por otra parte, en la detección serológica sólo existe un trabajo previo publicado¹⁵ y algunos

trabajos presentados en diferentes jornadas científicas nacionales. En ambos casos, las determinaciones se han llevado a cabo con diferentes juegos comerciales y el número de muestras ha sido pequeño, lo cual no permite analizar de conjunto esos resultados. Finalmente, sólo se ha publicado un trabajo donde se emplea el cultivo microbiológico en el diagnóstico de *H. pylori*,¹⁶ mientras que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) no ha sido empleada en Cuba con este fin.

Teniendo en cuenta que ninguno de los métodos de diagnóstico de *H. pylori* es reconocido como absoluto y dado que en nuestro país nunca se han realizado estudios comparativos de más de dos métodos, el presente trabajo nos se propuso los objetivos siguientes: 1) comparar la técnica de PCR con el cultivo microbiológico, la histología y la serología en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*; 2) evaluar la prevalencia de la infección por *H. pylori* en pacientes cubanos con diferentes patologías gastroduodenales y, 3) comparar dos juegos de cebadores específicos en la técnica de PCR para detectar la presencia de este microorganismo en pacientes cubanos.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se estudiaron 144 pacientes adultos, 99 hombres y 45 mujeres, con un promedio de edad de 49,6 años, quienes acudieron al servicio de gastroenterología del Centro de Investigaciones Médico-quirúrgicas por presentar diferentes trastornos gastrointestinales. Cada paciente dejó constancia por escrito de su aprobación para participar en el estudio, el cual fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética del hospital. Luego, se le realizó endoscopia digestiva y extracción de sangre.

Obtención y transporte de las muestras

Las observaciones endoscópicas, así como la obtención de las biopsias se llevaron a cabo con un fibroscopio flexible tipo GIPT y el videoscopio EVIS-100 (OLYMPUS), utilizando la técnica tradicional para este procedimiento. De cada paciente se tomaron tres biopsias de antro gástrico, las cuales fueron destinadas para realizar el cultivo microbiológico, el estudio histológico y la PCR. La biopsia para realizar el cultivo se depositó en un tubo con 100 μ L de disolución salina es-

téril a pH 5,5 y se mantuvo a 4 °C hasta su procesamiento, el cual se realizó en el intervalo de las 3 h posteriores a la ejecución de la endoscopia, mientras que la muestra para el estudio histológico fue fijada en papel de parafina. Asimismo, la muestra para realizar la detección por PCR, fue colocada en un tubo con 300 μ L de disolución reguladora de extracción (20 mmol/L de Tris pH 8,0; 0,5 % de tween 20 y 0,5 mg/mL de proteínaasa K) y se mantuvo igualmente a 4 °C hasta su procesamiento. Finalmente, a cada paciente se le realizó una extracción de sangre con el objetivo de obtener el suero, el cual fue conservado a -20 °C hasta su análisis.

Procesamiento de las muestras

Cultivo microbiológico

Una vez macerada la biopsia se procedió a realizar el cultivo microbiológico en agar *Brucella* con 7 % de sangre de carnero más suplemento selectivo para el aislamiento de *H. pylori* (Oxoid). Luego, las placas se incubaron durante cinco días en atmósfera de microaerofilia a 37 °C. Posteriormente, los microorganismos fueron identificados sobre la base de su morfología colonial, tinción de Gram y reacción positiva a las pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa.

Tinción histológica

Los estudios histológicos se llevaron a cabo mediante tinciones con hematoxilina-eosina.¹⁰ En el diagnóstico, se consideró negativo a la ausencia de formas bacilares y positivo a la detección de bacilos tanto en el epitelio como dentro de las criptas o mucus gástrico. Por otra parte, en las observaciones histológicas se informó sobre el estado del tejido, así como, de la severidad de las lesiones del epitelio gastroduodenal.

Prueba serológica

Los estudios serológicos se realizaron utilizando el juego comercial, Hexagon *H. pylori* (Human) según las instrucciones de la casa comercial. Con este ensayo se logra una rápida detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el microorganismo.

Extracción del ADN

La biopsia contenida en el tubo con disolución reguladora de extracción se calentó a 56 °C durante una hora y luego, diez minutos a 98 °C. Después se centrifugó durante cinco minutos a 14 000 r/min en la microcentrifuga 5415C (Ep-

pendorf) y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Todo el procedimiento se realizó en el local de aislamiento, el cual es independiente de aquel donde se realizó la PCR.

Selección y síntesis de los cebadores

La detección de *H. pylori* por PCR se realizó con dos juegos de cebadores que fueron seleccionados por exhibir 100 % de homología con las secuencias correspondientes en la cepa de referencia utilizada, así como poca o ninguna con otras 35 cepas de microorganismos relacionados o no con *H. pylori*^{12,17}. Los juegos de cebadores fueron sintetizados en el departamento de Síntesis Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB); uno de ellos correspondió a fragmentos de la secuencia del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (*16S ADNr*): con sentido (5' CTT GCT AGA GTG CTG ATA A 3') y antisentido (5' TCC CAC ACT CTA GAA TAG T 3'), cuya amplificación da como resultado una banda correspondiente a una secuencia nucleotídica de 537 pares de bases. Con el otro juego se amplificó una secuencia nucleotídica de 417 pares de bases del gen que codifica para la enzima fosfogluco-samina mutasa (*glmM*): con sentido (5' CCC TCA CGC CAT CAG TCC CAA AAA 3') y antisentido (5' AAG AAG TCA AAA ACG CCC CAA AAC 3').

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la PCR se empleó el equipo de ciclos térmicos PTC150 (MJ Research) y cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, el cual contenía: 5 μ L de disolución reguladora de reacción, 5 μ L de una suspensión de oligonucleótidos (2 mmol/L), 5 μ L de $MgCl_2$ (2,5 mmol/L), 1 μ L de cebador con sentido (0,5 mmol/L), 1 μ L de cebador antisentido (0,5 mmol/L), 0,5 μ L de la enzima Taq polimerasa [2,5U, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, (CIGB) Ciudad de La Habana], 5 μ L de ADN y 27,5 μ L de H_2O . Las reacciones se llevaron a cabo con 40 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 60 °C, 1 min de extensión a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Por último, el producto de la amplificación fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4 %, teñido con bromuro de etidio y fotogra-

fiado después de la excitación con luz UV a 302 nm.

Cepa control positivo

La cepa utilizada como control positivo fue la CCUG 17874, procedente de la colección de cultivo de la Universidad de Gotemburgo, Suecia. Para la purificación de su ADN, fue cultivada en las mismas condiciones descritas con anterioridad, todas las colonias de una placa fueron recogidas en 1 mL de disolución salina estéril y se empleó el método tradicional de alcohol fenol-cloriformo.¹⁸

Detección de la sensibilidad de la PCR

Para determinar la sensibilidad de nuestro sistema de PCR con cada uno de los juegos de cebadores, se empleó el ADN obtenido en la sección anterior y luego, se realizaron diluciones seriadas de a 10 hasta 10^{-10} en un volumen final de 100 μ L. Después, se tomó 1 mL de cada dilución y se realizó la PCR con cada uno de los juegos de cebadores, empleando las mismas condiciones descritas para la detección de las muestras de los pacientes. Por último, los productos amplificados fueron detectados y fotografiados al igual que lo descrito con antelación.

Detección de componentes inhibidores

Para detectar la presencia de componentes inhibidores de la PCR en las muestras de los pacientes que resultaron negativos al primer análisis (por ambos juegos de cebadores), se mezclaron 0,5 μ L del ADN purificado de la cepa CCUG 17874 con 5 μ L de cada muestra y se procedió a realizar la PCR en las mismas condiciones descritas anteriormente. La ausencia de banda de reacción indicó la presencia de componentes inhibidores fuertes en las muestras, mientras que la detección de una banda con menor intensidad que la del control positivo del ensayo (0,5 μ L de ADN purificado por reacción) indicó la presencia de componentes inhibidores débiles en las muestras. Luego, todas las muestras con componentes inhibidores fueron diluidas 1 en 5 (1/5) en disolución reguladora de fosfato salino y 1 μ L de cada una de ellas, se reanalizó por PCR, empleando las condiciones iniciales.

Análisis estadístico

Para analizar las frecuencias de infección por *H. pylori* con respec-

to a la presencia de las diferentes patologías gastroduodenales estudiadas, se realizaron pruebas de independencia (tabla de 2 x 2) y la probabilidad exacta de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSION

Según los hallazgos endoscópicos, la distribución por patologías de los 144 pacientes estudiados fue la siguiente: 2 (1 %) presentaron mucosa gástrica sin alteraciones (MGSA), 85 (59 %) gastritis (ligera, moderada o severa), 20 (13,9 %) úlcera gástrica y 37 (25,7 %) úlcera duodenal.

Se pudo observar que la PCR con el juego de cebadores para el gen *16S ADNr* (PCR-*16S ADNr*, panel A), se detectó señal positiva hasta el carril 9, que se corresponde con 19 pg (aproximadamente 100 bacterias); mientras que con el juego de cebadores para el gen *glmM* (PCR-*glmM*, panel B), se observó señal positiva hasta el carril 10, que se corresponde con 1,9 pg, (aproximadamente 10 bacterias) (Fig. 1). Teniendo en cuenta que solo la subunidad ribosomal 16S presenta más de dos copias en el genoma de *H. pylori*¹⁹ y que para ambos juegos de cebadores se ha obtenido una sensibilidad similar,^{12,20} la PCR-*16S ADNr* debió ser al menos tan sensible como la PCR-*glmM*. Sin embargo, en un estudio donde se compararon cinco juegos de cebadores para la detección de *H. pylori* por PCR directo de biopsias, incluidos los de la subunidad ribosomal 16S y el gen *glmM*, se demostró que este último fue más sensible y específico.²¹ Por otra parte, la sensibilidad encontrada en este estudio fue inferior a la encontrada por Thoreson y col. y por Lu y col., quienes detectaron 100 y 10 veces menos bacterias por la PCR-*16S ADNr* y la PCR-*glmM* respectivamente. Esta menor sensibilidad pudo deberse a que la Taq polimerasa producida en el CIGB pudiera ser menos efectiva en la amplificación de los fragmentos de ADN que las producidas por las casas comerciales especializadas. Por lo anterior, se deberá realizar un estudio donde se compare la sensibilidad de esa enzima con otras polimerasas de diferentes casas comerciales.

Los porcentajes de positividad obtenidos mediante el cultivo microbiológico y las tinciones histológicas fueron inferiores a los obtenidos por otros grupos de trabajo^{16,22} (Tabla 1), lo cual pudo estar dado porque en este estudio solo se tomó una biop-

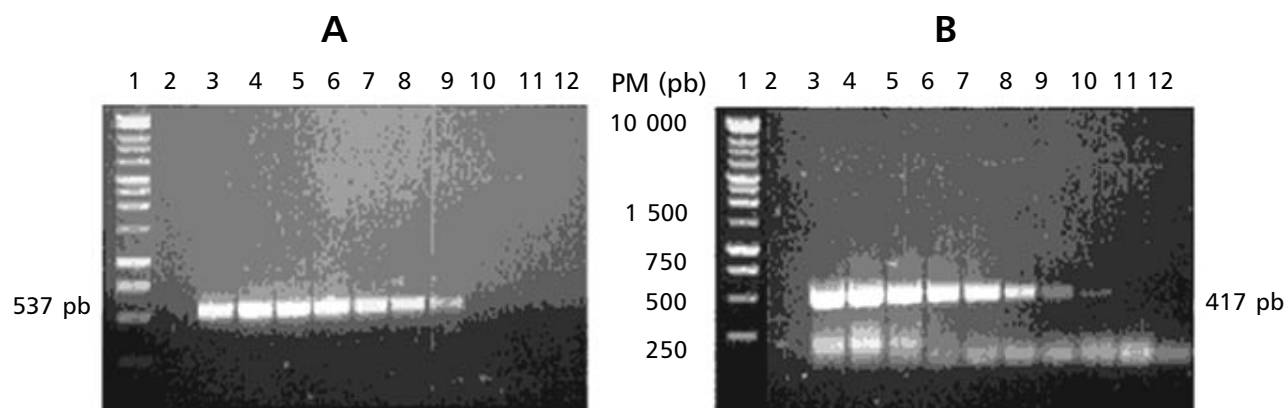


Fig. 1. Estudio de sensibilidad de la PCR empleando los juegos de cebadores que amplifican en los genes 16S ADNr (panel A) y glmM (panel B). En los paneles A y B, carriles del 3 al 12, ADN purificado de *H. pylori* (190 mg/mL) diluido desde 10^{-1} hasta 10^{-10} . En los paneles A y B carril 2, se muestran los controles negativos de la PCR. Además, se muestra el patrón de pesos moleculares con un intervalo de 250 a 10 000 pares de bases (pb).

Tabla 1. Comparación entre los métodos de detección.

Método	Positivo	Negativo	NE*
	(%)		
Cultivo	57,6	42,4	5
Histología	64,4	35,6	9
Serología	61,1	38,9	31
PCR-16S ADNr ^a	66	34	3
PCR-glmM ^b	82,3	17,7	

* Muestras no evaluadas en los diferentes métodos de detección. ^{a,b} PCR con cebadores que amplifican en los genes 16S ADNr y glmM de *H. pylori*, respectivamente.

sia de antro gástrico para la detección de *H. pylori* por cada una de las técnicas, según lo estipulado por el comité de ética. Como se sabe, para que estos análisis tengan una buena sensibilidad son necesarias al menos tres biopsias, dos de antro y otra del cuerpo o *fundus* del estómago.⁵ Además, en el caso de la histología, se empleó la tinción de hematoxilina-eosina, la cual es más económica, pero menos sensible que la de Warthin-Starry.²³ De igual modo, la detección de anticuerpos contra *H. pylori*, fue inferior a lo encontrado por otros autores con otros juegos de diagnóstico similares.^{24,25} Esto pudo deberse a que las proteínas utilizadas en el juego comercial no son representativas de las cepas de *H. pylori* que circulan en Cuba. Por lo anterior, en próximos estudios, se deberán analizar diferentes juegos comerciales para escoger el que mejores resultados arroje en la población cubana. Por otra parte, los resultados obtenidos con la PCR (Tabla 1) están en concordancia con los de estudios similares en los que se han empleado estos dos juegos de cebadores.^{17,21,20,26} La PCR resultó la técnica más sen-

sible, no obstante, en algunos casos pudieran ser falsos positivos, aspecto que se analizará más adelante. Dentro de los factores que tributan a la aparición de falsos positivos se encuentran: la contaminación de los endoscopios o la falta de especificidad de los juegos de cebadores. Sin embargo, estos factores fueron reducidos al mínimo, ya que se empleó un desinfectante específico en la limpieza de los primeros y de las pinzas. Además, se escogieron los dos juegos con mayor especificidad de los que se conocen.^{17,21,20,26}

Por otra parte, al comparar los resultados de cada hallazgo endoscópico con la presencia de *H. pylori* detectada con la PCR y el cultivo más histología (cultivo-histología, metodología "Gold Standard" en la detección de la bacteria¹²) (Tabla 2), se observó la mayor infección en los pacientes con úlcera duodenal. Lo anterior se corresponde con lo reportado, pues se plantea que este microorganismo puede estar presente hasta en un 97 % de los pacientes con esta patología.²⁷ Además, en los pacientes con úlcera gástrica y gastritis, los resultados del diagnóstico también concuerdan con los ob-

tenidos por otros investigadores, ya que se ha detectado *H. pylori* hasta en un 83 y 70 % de los pacientes con estas enfermedades, respectivamente.²⁷ Nótese que sólo se obtuvo significación estadística, al analizar la presencia del microorganismo en la úlcera duodenal y la gastritis por cultivo-histología y por la PCR-glmM; sin embargo, es clara la tendencia hacia la positividad en todas las otras determinaciones con las diferentes patologías. Esto hace pensar que una vez que se estudie un mayor número de pacientes, se deberá alcanzar la significación estadística en cada una de las enfermedades. En el caso de las mucosa gástrica sin alteraciones no se deben sacar conclusiones dado el pequeño tamaño de la muestra.

Desde hace algunos años, diferentes autores han detectado la presencia de componentes que inhiben la PCR, como por ejemplo, el complejo polisacárido de las bacterias y restos de tejidos de las biopsias.^{28,29} Estos resultados fueron corroborados por Thoreson y col., quienes encontraron que el 42 % de las muestras analizadas por ellos presentaban dichos componentes y por tanto, daban lugar a falsos negativos.²⁰ En este estudio, también se detectó la presencia de inhibición de la PCR (Tabla 3). Del total de muestras analizadas por PCR, con los juegos de cebadores 16S ADNr y glmM, se detectó la presencia de componentes inhibidores en el 25,5 y 22,7 %, respectivamente. La menor presencia de componentes inhibidores encontrada en este trabajo, con relación al estudio de Thoreson y col., pudo deberse a diferencias entre los sistemas de extracción de ADN empleados en ambos estudios. Además, se pudo comprobar que existen grada-

Tabla 2. Hallazgos endoscópicos en pacientes con desórdenes gastroduodenales y su infección por *H. pylori* según los métodos directos de detección estudiados.

Hallazgos endoscópicos	Cultivo-Histología ^a n = 144			PCR-16S ADNr ^a n = 141			PCR-glmM ^a n = 141		
	Hp+	Hp-	p	Hp+	Hp-	p	Hp+	Hp-	p
MGSA n = 2	0	100	n.s.	50	50	n.s.	50	50	n.s.
Gastritis n = 85	69,4	30,6	< 0,05	65,5	34,5	n.s.	77,4	22,6	< 0,05
UG n = 20	80	20	n.s.	63,2	36,8	n.s.	84,2	15,8	n.s.
UD n = 37	94,6	5,4	< 0,01	69,4	30,6	n.s.	94,4	5,6	< 0,05
Total n = 144	76,4	23,6		66	34		82,3	17,7	

Hp *H. pylori*. MGSA Mucosa gástrica sin alteraciones. UG Úlcera gástrica. UD Úlcera duodenal. n.s Sin significación estadísticamente. ^aSuma de los resultados obtenidos por las técnicas de cultivo e histología.

ciones en cuanto a la concentración de los componentes inhibidores, lo cual no ha sido reportado por otros grupos de trabajo. De no haberse encontrado la presencia de componentes inhibidores en las muestras, se hubiera dejado de detectar el microorganismo en 12 y 10 pacientes por la PCR-glmM y PCR-16S ADNr, respectivamente. Entre las muestras que continuaron siendo negativas después de la segunda determina-

ción por la PCR (Tabla 3), pudieran existir algunas positivas, ya que la dilución pudo haber sido insuficiente para eliminar el componente inhibidor o, por otra parte, pudo haber diluido tanto el ADN presente en la muestra que escapó a los límites de detección de este ensayo.

De los 127 pacientes a los que se les realizaron todas las técnicas de diagnóstico directo (cultivo-histo-

logía y PCR con ambos juegos de cebadores), sólo 84 (66,1%) tuvieron concordancia (Tabla 4). Al comparar los métodos directos, se puede apreciar que la PCR-glmM detectó la mayor cantidad de casos positivos. Tanto el porcentaje de concordancia entre los métodos directos de detección como la mayor positividad de la PCR-glmM son similares a lo encontrado por Lu y colaboradores. Ahora bien, en tres casos el diagnóstico fue positivo por cultivo-histología, pero negativo por la PCR. En estas tres muestras se detectó la presencia de componentes que inhibían la PCR, lo que indica que estos casos pudieran ser falsos negativos. Además, es de destacar que mediante la PCR, se detectó el microorganismo en 14 pacientes reportados como negativos por cultivo-histología, de ellos 12 fueron positivos por la PCR con ambos juegos de cebadores y ocho de los 14 tenían anticuerpos específicos contra *H. pylori*. Lo anterior sugiere que estas ocho muestras fueron falsos negativos por cultivo-histología. Se debe recordar que aún cuando la unión del cultivo y la histología es considerada el diagnóstico más certero, en este trabajo solo fue posible contar con una muestra de biopsia para realizar cada una de estas técnicas, lo que disminuyó su sensibilidad. La presencia de la bacteria en las seis muestras restantes fueron detectadas únicamente por la PCR. Teniendo en cuenta que los juegos de cebadores empleados en este estudio han demostrado una gran sensibilidad y especificidad en la detección de *H. pylori*,^{12,21} los autores se inclinan a pensar que estas muestras fueron falsos negativos

Tabla 3. Detección de componentes inhibidores de la PCR en las muestras.

Muestras negativas Primera determinación	Muestras con componentes inhibidores	Segunda determinación ^c	
		Hp+	Hp-
16S ADNr ^a n = 60	36	12	24
glmM ^b n = 35	32	10	22

^{a,b}Cebadores que amplifican en los genes 16S ADNr y glmM de *H. pylori* respectivamente. ^cPara analizar por PCR las muestras con componentes inhibidores, diluidas 1/5.

Tabla 4. Concordancia entre cultivo-histología y la PCR con cada juego de cebadores.

Cultivo-Histología	16S ADNr ^a	glmM ^b	Total
Hp+	Hp+	Hp+	67
Hp-	Hp-	Hp-	17
Hp+	Hp+	Hp-	4
Hp+	Hp-	Hp+	22
Hp-	Hp+	Hp+	12
Hp-	Hp-	Hp+	2
Hp-	Hp+	Hp-	0
Hp+	Hp-	Hp-	3

^{a,b}Cebadores que amplifican en los genes 16S ADNr y glmM de *H. pylori* respectivamente. Hp *H. pylori*.

del cultivo-histología. Por otra parte, si se compara la positividad encontrada por la PCR-16S *ADNr* y la PCR-*glmM* con respecto a los resultados de cultivo/histología (Tabla 4), se puede observar que la PCR-*glmM* coincide con la metodología *gold standard* en 22 casos positivos que fueron negativos por la PCR-16S *ADNr* y en solo uno de ellos, se detectó la presencia de componentes inhibidores. Estos resultados demuestran la menor sensibilidad de la PCR-16S *ADNr*. Por otro lado, en las cuatro muestras que fueron negativas por la PCR-*glmM*, pero positivas con el otro juego de cebadores, se detectaron componentes inhibidores en todas ellas.

En este estudio los valores predictivos de positividad de la PCR comparada con el cultivo-histología fueron mayores para la PCR-*glmM*. Mientras que, los valores predictivos de negatividad fueron bajos y similares para la PCR con ambos juegos de cebadores (Tabla 5). La PCR-*glmM* solo dejó de detectar siete muestras que fueron positivas por cultivo-histología y en todos los casos, se encontraron componentes que inhibieron la PCR, mientras que la PCR-16S *ADNr* dejó de detectar 25 muestras y de ellas solo en tres, se encontraron componentes inhibidores. Por lo anterior, el bajo valor predictivo de positividad de la PCR-16S *ADNr* se debe a su menor sensibilidad. Por otro lado, los resultados de predicción de la negatividad obtenidos para la PCR (Tabla 5), sugieren la presencia de falsos positivos en esta técnica; sin embargo, es reconocido que la PCR es la más sensible en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Además, los juegos de cebadores empleados en este trabajo han mostrado una gran sensibilidad y especificidad en estudios anteriores.^{16,17,22} Por lo anterior, los autores consideran que los bajos valores de predicción negativa de este estudio se deben fundamentalmente a falsos negativos obtenidos por cultivo-histología. No obstante, en próximos estudios será necesario sumar al menos otro método de diagnóstico, como la prueba del aliento con urea marcada radioactivamente²⁷ o la detección de antígenos del microorganismo en heces fecales,⁷ para confirmar los resultados de la PCR.

CONCLUSIONES

En conclusión, la técnica de PCR-*glmM* fue la mejor en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*

y mostró la mayor concordancia con el cultivo-histología. Y, finalmente, la úlcera duodenal resultó la patología con más incidencia de casos positivos a *H. pylori*, seguido por la úlcera gástrica y la gastritis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al analizar la presencia del microorganismo en los pacientes con úlcera duodenal y gastritis por cultivo-histología y por la PCR-*glmM*.

BIBLIOGRAFIA

- Warren J.R. and Marshall B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, **1**, 1273-1275, 1983.
- Bode G., Mauch F. and Malferttheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. **Epidemiol. Infect.**, **111**, 483-490, 1993.
- Marshall B.J., Armstrong J.A., Mc Geachie D.B. and Glancy R.J. Attempt to fulfill Koch's postulates for *Campylobacter pyloric*. **Med. J. Aus.**, **142**, 436-439, 1985.
- World Health Organization: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. World Health Organization. Geneva, 61, 177-240, 1994.
- Alarcón T. Diagnóstico microbiológico de la infección producida por *Helicobacter pylori*. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, **6**, 37-41, 1994.
- Samuels A.L., Winsord H.M., Ho G.Y., Goodwin L.D., Marshall B.J. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. **J. Clin. Microbiol.**, **6**, 2438-2439, 2000.
- Kolezco S., Konstantopoulos N., Bosman D., Feydt-Schmidt A., van der Ende A., Kalach N., Raymond J., Russmann H. Evaluation of a novel monoclonal for detection of *Helicobacter pylori* antigen instool from children. **Gut**, **52**, 804-806, 2003.
- Megraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic test for the detection of *Helicobacter pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.**, **31**, (Suppl. 215), 57-62, 1996.
- Thijs J.C., van Zwet A.A., Thijs W.J. and Oey H.B. Diagnostic test for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. **Am. J. Gastroenterol.**, **91**, 2125-2129, 1996.

- Loffeld R.J., Stobebing E., and Arends J.W. A review of diagnostic techniques for *Helicobacter pylori*. **Dig. Dis.**, **11**, 173-180, 1993.
- van Zwet A.A., Thijs J.C., Roosendaal R., Kuipers E.J., Peña S. and de Graff J. Practical diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, **8**, 501-507, 1996.
- Thoreson A.C.E., Borre M.B., Andersen L.P., Jorgensen F., Elsborg L., Holck S., Conway P., Henrichsen J., Vuust J. and Krogfelt K.A. Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **10**, 325-334, 1995.
- Quintero M., Moderos I., Buesa F., González R. and Haedo W. Influence of colloidal bismuth subcitrate, metronidazole, and amoxicillin on *Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer healing. **GEN**, **49**, 116-122, 1995.
- Hernández A. *Helicobacter pylori* y gastritis en la enfermedad ulcerosa péptica. Tesis de Especialidad en Medicina Interna. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, La Habana, Cuba, 2001.
- Valmaseda T., Gisbert J.P., Paniagua M. and Pajares J.M. *Helicobacter pylori* CagA positive strains in gastroduodenal diseases from two different populations. **Med. Clin. Barc.**, **118**, 90-93, 2002.
- Gutiérrez B., Vidal T., Valmaña C.E., Santiesteban N., González N., Lionard I., Ruiz J., Diaz-Canel O., Martínez R., Escobar M., Grá B., Galván E., González M. y Sierra G. Primer informe sobre el aislamiento de *Helicobacter pylori* asociado a enfermedades digestivas en Ciudad de La Habana. **VaccinMonitor**, Año **10**, 22-25, 2001.
- Li C., Musich P.R., Ha T., Ferguson D.A., Patel N.R., Chi D.S. and Thomas E. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. **J. Clin. Pathol.**, **48**, 662-666, 1995.
- Gingeras T.R., Davis G.R., Whilfield K.M., Chappelle H.L., Di Michele L.J. and Kwok D.Y. A transcription based amplification system. In: PCR protocols. A guide to methods and applications (INNISMA, ed.). Academic press, San Diego, CA. 245-253, 1995.
- Taylor D.E., Eaton M., Chang N. and Salama S.M. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the ge-

Tabla 5. Predicción de positividad y negatividad de la PCR con ambos juegos de cebadores comparado con los resultados por cultivo-histología.

Valores	Resultados para cada juego de cebadores (%)	
Predicción de positividad ^a	74	92,7
Predicción de negatividad ^b	61,3	54,8

^a Comparado con las 96 muestras positivas por cultivo-histología. ^b Comparado con las 31 muestras negativas por cultivo-histología.

- nome level. **J. Bacteriol.**, **174**, 6800-6806, 1992.
20. Thoreson A.C.E., Borre M.B., Andersen L.P., Jorgensen F., Kiilerrich S., Scheibel J., Rath J. and Krogfelt K.A. *Helicobacter pylori* detection in human biopsies: a comparative PCR assay with internal control reveals false results. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **24**, 201-208, 1999.
21. Lu J.J., Perng C.L., Shyu R.Y., Chen C.H., Lou Q. y Lee C.H. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. **J. Clin. Microbiol.**, **3**, 772-774, 1999.
22. Lage A.P., Godfroid E., Fauconnier A., Burette., Butzler J.P., Bollen A. and Glupczynski D. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other technique and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **10**, 2752-2756, 1995.
23. López-Brea M., Alarcón T. and Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, **13**, 13-19, 1997.
24. Shart M.A. and Simjee A.E. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Natal/KwaZulu, South Africa. **Eur J. Gastroenterol. Hepatol.**, **6**, 37-41, 1994.
25. Tinnert A., Mattson A., Bolin I., Dalenback G., Hamlet T. and Svennerholm A.M. Local and systemic immune response in human against *Helicobacter pylori* antigens from homologous and heterologous strains. **Microb. Path.**, **23**, 1-12, 1997.
26. Andersen L.P., Kiilerick S., Pedersen G., Thoreson A.C.E., Jorgensen F., Rath J., Larsen N.E., Borup O., Krogfelt K., Scheibel J. and Rune S. An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. **Scan. J. Gastroenterol.**, **1**, 24-30, 2000.
27. López-Brea M., Domingo D. y Alarcón T. *Helicobacter pylori* y patología gástrica: una visión actual. **Farmacoterapia**, **16**, 23-30, 1999.
28. Lanz P.G., Matsson M., Wadstrom T. and Radstrom P. Removal of PCR inhibitors from humans faecal samples through the use of an aqueous two phase system for sample preparation prior to PCR. **J. Microbiol. Methods**, **28**, 159-167, 1997.
29. Monteiro L., Bonnemaision D., Vekris A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J. and Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors on faces: *Helicobacter pylori* model. **J. Clin. Microbiol.**, **35**, 995-998, 1997.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

LA CALIDAD DE LAS MIELES DE ABEJAS ESPECIFICAS CUBANAS

Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana y Estación Experimental Apícola del Ministerio de la Agricultura.

Con el nombre de mieles de abejas específicas se agrupan todas aquellas procedentes mayoritariamente de una misma fuente floral o de una región geográfica determinada. A estas mieles se les atribuyen las propiedades terapéuticas de las plantas que les dan origen y junto con este aspecto está el hecho de que presentan un delicado aroma y sabor que las identifica y diferencia, los cuales las hacen muy atractivos, con una gran demanda y precios en el mercado internacional. Por lo anterior, se realizan importantes esfuerzos en la caracterización de las mieles uniflorales o específicas encaminados a lograr la certificación de su origen botánico.

En Cuba, las mieles uniflorales carecían del certificado de autenticidad, por lo que se dificultaba su inserción en el mercado internacional bajo esta condición. Por esta razón, se decidió acometer un estudio dirigido a la caracterización de cuatro tipos de mieles de abejas procedentes de las plantaciones de campanilla blanca (*Turbina corymbosa*); mangle prieto (*Avicennia germinans*); romerillo de costa (*Viguiera helianthoides*) y leñatero (*Govania polygama*).

Una de las primeras tareas acometidas fue la determinación de los indicadores de calidad de la miel. Un primer grupo lo constituyeron los de composición química. Se utilizaron los propuestos por la Comisión Internacional de la Miel, empleando métodos de análisis armonizados con los de la Unión Europea, el Códex Alimentarius y las Normas Cubanas. Algunos de estos indicadores son: perfil de azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa, maltosa y otros); humedad, sólidos solubles, pH, acidez libre, actividad de la diastasa, contenido de minerales (calcio, magnesio, sodio y hierro) y compuestos nitrogenados, entre otros. El segundo grupo de indicadores de calidad determinado fue el de las propiedades físicas de la miel (color, conductividad eléctrica, tendencia a la cristalización, entre otros).

Otra tarea importante acometida fue la evaluación sensorial de las mieles, para lo cual, se creó una comisión de evaluación sensorial, basada en un proceso de preselección, evaluación y selección de candidatos a jueces y su adiestramiento posterior, tanto práctico como teórico para integrar finalmente un equipo de catadores compuesto por cinco jueces quienes realizaron la evaluación de las muestras seleccionadas según diseño experimental, empleando el método de análisis descriptivo cuantitativo.

Los principales atributos descriptores de la calidad sensorial de la miel evaluados fueron: brillo, aspecto homogéneo, transparencia, color ámbar, olor floral, olor dulce, olor característico, sabor dulce, sabor floral, sabor amargo, sabor residual pungente, viscosidad y pegajosidad.

De 52 variables descriptivas estudiadas para la caracterización de las cuatro mieles uniflorales cubanas, se emplearon solo 32 para la diferenciación y bastaron 11 para la correcta clasificación de las mieles según su procedencia, lo cual implica un ahorro de tiempo y recursos.

La investigación permitió describir por primera vez en el país, el comportamiento de un grupo de indicadores físico-químicos que hasta el momento eran desconocidos para mieles de abejas cubanas y se logró por primera vez la caracterización sensorial de mieles uniflorales mediante técnicas analíticas de evaluación sensorial.