

## **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**17.**

Diagnóstico microbiológico  
de la infección por  
*Helicobacter pylori*

2 0 0 4

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

**Coordinador: Manuel López-Brea**

**Autores: Teresa Alarcón  
Margarita Baquero  
Diego Domingo  
Manuel López-Brea  
Gloria Royo**



ISBN: 84-609-392-0

# INDICE:

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

### 1. INTRODUCCIÓN

### 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

- 2.1. Gastritis
- 2.2. Úlcera péptica
- 2.3. Cáncer gástrico
- 2.4. Linfoma gástrico tipo MALT
- 2.5. Manifestaciones extradigestivas

### 3. TRATAMIENTO

- 3.1. Indicaciones de tratamiento
- 3.2. Pautas de tratamiento
- 3.3. Causas del fracaso del tratamiento

### 4. DIAGNÓSTICO

- 4.1. Histología y visión microscópica
- 4.2. Prueba de la ureasa
  - 4.2.1. Propósito
  - 4.2.2. Métodos de detección de la ureasa
- 4.3. Cultivo de *Helicobacter pylori*
  - 4.3.1. Recogida de la muestra
  - 4.3.2. Transporte y conservación de la muestra
  - 4.3.3. Procesamiento de la muestra y medios de cultivo
  - 4.3.4. Condiciones de incubación
  - 4.3.5. Criterios para interpretación de resultados
    - 4.3.5.1. Identificación del microorganismo
    - 4.3.5.2. Subcultivos y conservación de las cepas
- 4.4. Métodos moleculares
- 4.5. Prueba del aliento (*urea breath test*, UBT)
- 4.6. Serología
  - 4.6.1. Características de los métodos serológicos
  - 4.6.2. Utilidad clínica
  - 4.6.3. Recogida de la muestra
  - 4.6.4. Transporte y conservación de la muestra
  - 4.6.5. Procesamiento de la muestra
  - 4.6.6. Criterios para interpretación de resultados
- 4.7. Antígeno en heces
  - 4.7.1. Características de la técnica
  - 4.7.2. Recogida de la muestra
  - 4.7.3. Transporte y conservación de la muestra
  - 4.7.4. Procesamiento de la muestra
  - 4.7.5. Criterios para interpretación de resultados

### 5. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

- 5.1. Dilución en agar
- 5.2. Difusión con E-test®
- 5.3. Difusión con discos
- 5.4. Técnicas moleculares

### 6. BIBLIOGRAFÍA

## **ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS**

- 1. PROPÓSITO Y ALCANCE**
- 2. FUNDAMENTO**
- 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA**
- 4. MUESTRAS**
- 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS**
- 6. APARATOS Y MATERIAL**
- 7. PROCESAMIENTO**
- 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**
- 9. RESPONSABILIDADES**
- 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO**
- 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**
- 12. BIBLIOGRAFÍA**

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **17. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. 2004**

**Coordinador: Manuel López-Brea**

**Autores: Teresa Alarcón**

**Margarita Baquero**

**Diego Domingo**

**Manuel López-Brea**

**Gloria Royo**

## 1. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un bacilo gramnegativo, curvado y microaerófilico que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano asociado a diferentes enfermedades digestivas. *H. pylori* tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales. Presenta unas dimensiones de 0,5 a 1,0 µm de ancho y de 3 µm de largo y las características estructurales típicas de los bacilos gramnegativos, con una membrana externa. Tiene de 4 a 8 flagelos polares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación por el medio ácido. Su característica bioquímica más importante es la ureasa, considerablemente más potente que la de otras bacterias. Tiene otras dos enzimas muy útiles para su identificación cuando crece en medios de cultivo que son la oxidasa y la catalasa.

La infección por *H. pylori* es una de las más comunes en el hombre y aunque ocurre en todo el mundo, es más frecuente en los países en desarrollo y la prevalencia disminuye cuando aumenta el nivel socioeconómico.

La adquisición natural de *H. pylori* ocurre con frecuencia en la infancia y una vez que se establece, la infección persiste durante toda la vida, aunque también se ha descrito su eliminación natural. Se considera que su adquisición es por contacto interpersonal, aunque el contacto con animales o con agua contaminada también se han considerado ocasionalmente como fuentes potenciales de infección.

## 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas desarrollar una úlcera péptica (duodenal o gástrica) o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico. También puede desarrollarse un tipo de linfoma, poco frecuente, que es el linfoma gástrico tipo MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*).

Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Existen factores genéticos predisponentes en el paciente, como el grupo sanguíneo, el tipo de antígeno Lewis o el tipo de HLA. También existen factores ambientales como las condiciones socioeconómicas, el consumo de tabaco o la dieta (la ingestión de sal actúa como factor agresivo de la mucosa mientras que el consumo de alimentos anti-oxidantes actúa como factor protector), que pueden influir en el desarrollo de un tipo u otro de enfermedad. Por otro lado, los factores de

patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad.

### 2.1. Gastritis

La gastritis que se origina después de la infección por *H. pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas y vómitos). La gastritis aguda por *H. pylori* es un diagnóstico poco frecuente y cuando se ha descrito ha sido tras ingestión accidental o en voluntarios. Su curso es de 7 a 10 días y puede evolucionar a la eliminación espontánea de *H. pylori* o, más frecuentemente, a su cronicidad.

La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad (infiltración inflamatoria aguda). La gastritis crónica por *H. pylori* es un proceso dinámico que evoluciona hacia la atrofia que afecta al antro y a la mucosa transicional y se extiende en dirección al cuerpo. También se puede asociar a metaplasia intestinal como respuesta a la agresión crónica. En áreas metaplásicas no se detecta *H. pylori* y la inflamación es menor que en las no metaplásicas. La atrofia y la metaplasia son dos procesos diferentes que pueden presentarse de forma independiente.

### 2.2. Úlcera péptica

La asociación de *H. pylori* con la úlcera duodenal es clara ya que el 90-95% de los pacientes con úlcera duodenal presentan este microorganismo y la úlcera cicatriza al erradicar la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica también existe una clara relación aunque sólo un 70% de este tipo de úlcera está asociado con la presencia de *H. pylori*, debido a que el resto de ellas están producidas por consumo de anti-inflamatorios no esteroides.

### 2.3. Cáncer gástrico

En el año 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (IARC) incluyó a *H. pylori* como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncer gástrico.

Por otra parte el papel de *H. pylori* en el cáncer gástrico también se comprende porque la gastritis crónica es un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer. Además, el 70% de los pacientes con cáncer gástrico son positivos para *H. pylori*.

### 2.4. Linfoma gástrico tipo MALT

El 90% de los pacientes con linfoma MALT son positivos para *H. pylori*. Es un tipo de linfoma que se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. Además, varios estudios apoyan la asociación de *H.*

*pylori* con esta enfermedad puesto que tras la erradicación de la bacteria se ha observado la regresión del linfoma.

## 2.5. Manifestaciones extradigestivas

Se ha intentado asociar la infección por *H. pylori* con diferentes enfermedades no digestivas como cardiovasculares (aterosclerosis, cefalea primaria, fenómeno de Raynaud primario), de piel (rosacea, alopecia areata, urticaria idiopática crónica), autoinmunes (Síndrome de Sjögren, neuropatía isquémica óptica anterior no arterítica), hepáticas (encefalopatía hepática) y respiratorias (bronquitis crónica, asma bronquial, cáncer de pulmón).

## 3. TRATAMIENTO

### 3.1. Indicaciones de tratamiento

En los últimos años se han realizado diferentes reuniones de consenso sobre la infección por *H. pylori*. Entre ellas destacan la del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. por ser el primero que recomendó el tratamiento erradicador en pacientes infectados por *H. pylori* y úlcera duodenal, pero también las que se realizaron en Canadá en 1997 y 1999, el Consenso Asiático (Asia Pacific Consensus Conference, 1999), el Consenso Latino-americano (2000), el Consenso Europeo (Europeo: Maastrich Consensus, 1997 y 2000), y el Consenso Español (1999).

El Consenso de Maastrich del año 2000 considera que existe una indicación clara de tratamiento en el caso de:

- (a) enfermedad ulcerosa péptica: duodenal activa o cicatrizada, gástrica o complicada,
- (b) linfoma MALT de bajo grado,
- (c) gastritis atrófica,
- (d) resección después de cáncer gástrico.

El Consenso Español realizado en 1999 recomienda también tratamiento en la duodenitis erosiva y el de Maastrich considera una indicación clara para diagnosticar y tratar:

- (a) los familiares en primer grado de pacientes con cáncer gástrico,
- (b) por deseo del paciente.

Sería una indicación posible de tratamiento los pacientes con dispepsia funcional, con enfermedad por reflujo gastroesofágico o los pacientes que toman AINEs aunque estos temas son más discutibles.

### 3.2. Pautas de tratamiento

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 o 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso, que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. Numerosos antimicrobianos han demostrado actividad *in vitro* frente a *H. pylori*. Sin embargo, cuando se han aplicado en pautas de tratamiento han demostrado escasa actividad. Entre los antimicrobianos que han mostrado buena utilidad clínica se encuentran:

amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina. La furazolidona, rifabutina o las fluoroquinolonas son otras opciones terapéuticas.

Entre los compuestos anti-ulcerosos se han utilizado con preferencia inhibidores de la bomba de protones (IBP) (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol), seguido de compuestos de bismuto (citrato de bismuto, salicilato de bismuto, RBC: ranitidina citrato de bismuto) y en mucha menor frecuencia los antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> (ranitidina, cimetidina, famotidina, etc).

La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 10 días, aunque algunos autores han probado pautas cortas, de 3 a 5 días que incluyen 3 antibióticos y otros recomiendan pautas largas, de más de 10 días.

Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. Se recomienda la pauta de tratamiento triple con un IBP y dos antimicrobianos como primera opción. Si este tratamiento falla, se debe evitar repetir dos veces la misma pauta y recomienda realizar estudios microbiológicos antes de iniciar una nueva pauta.

La primera pauta eficaz utilizada fue la "triple clásica" que asocia un imidazol (metronidazol o tinidazol) con tetraciclina y amoxicilina durante dos semanas. Ésta fue sustituida por otras que combinan un IBP (normalmente omeprazol) con dos antibióticos (fundamentalmente amoxicilina, claritromicina y metronidazol). Son más fáciles y cómodas para el paciente, logrando tasas de erradicación superiores al 90%. La asociación de un IBP (generalmente omeprazol) con claritromicina y amoxicilina (conocida como la OCA) es la pauta más utilizada. También se puede utilizar una triple terapia con un IBP, amoxicilina y metronidazol. Es preferible reservar la pauta que incluye IBP con metronidazol y claritromicina como de segunda línea para evitar que se pueda desarrollar resistencia a los dos antimicrobianos.

La combinación de un IBP y dos antibióticos con las sales de bismuto se conoce como "terapia cuádruple", alcanza altas tasas de erradicación pero debe reservarse también para cuando fallen otras terapias. Recientemente se han propuesto pautas que asocian un IBP con fármacos como rifabutina o levofloxacino y amoxicilina, aunque con ellas se tiene todavía poca experiencia.

### 3.3. Causas de fracaso del tratamiento

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento, factores del paciente y factores de las cepas. Entre los primeros podemos citar las dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento y el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones utilizado. Entre los factores del paciente destaca el cumplimiento del tratamiento (por el elevado número de dosis, por los efectos secundarios, etc) y el país donde se realizó el

ensayo. Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa.

El desarrollo de resistencia a amoxicilina y tetraciclina es poco frecuente. Sin embargo, la resistencia al metronidazol es muy elevada en algunas poblaciones y a la claritromicina está aumentando en diferentes poblaciones, siendo un problema cada vez mayor. La infección por cepas resistentes a claritromicina o a metronidazol supone una importante contrariedad porque se relaciona con fallo del tratamiento.

#### 4. DIAGNÓSTICO

Para diagnosticar la infección por *H. pylori* se pueden realizar métodos invasivos (requieren endoscopia con toma de biopsia gástrica) o métodos no invasivos (no requieren endoscopia previa).

A la hora de elegir uno u otro método hay que tener en cuenta el objetivo del diagnóstico (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro en el que nos encontramos (experiencia del personal y disponibilidad de medios) y las características del paciente (prevalencia de *H. pylori* en la población, edad del paciente, medicación previa, etc). No se debe olvidar que mientras que todos los métodos pueden servir para diagnosticar la infección por *H. pylori* (con diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad), la endoscopia con toma de biopsia para estudio histológico permite además diagnosticar el tipo de enfermedad. Por otra parte, el cultivo es imprescindible para conocer la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de aplicar el tratamiento más efectivo en cada paciente, pero también para conocer los porcentajes de sensibilidad en cada población.

##### 4.1. Histología y visión microscópica

El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de metaplasia intestinal. Revisaremos únicamente las tinciones que se pueden realizar desde el punto de vista microbiológico para diagnosticar la infección por *H. pylori*.

La técnica de tinción a partir de biopsia gástrica es una técnica fácil, rápida, de muy bajo coste y alta utilidad en el estudio de la infección por el microorganismo. Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Gram modificada o bien el examen en fresco utilizando un microscopio con contraste de fases. Otras tinciones son útiles, además de para determinar el diagnóstico de la infección, para conocer el grado de patología gástrica. Entre ellas destacan las tinciones de Giemsa, carbolfuchina, Genta, la tinción triple de carbolfuchina/azul de Alcina/hematoxilina-eosina y tinciones de inmunohistoquímica.

Se han hecho modificaciones sobre las tinciones previamente descritas, como la realizada en nuestro laboratorio que consiste en una tinción de Gram modificada, utilizando como contracolorante carbolfuchina y dejándola actuar durante un tiempo superior al habitual (de 2-5 minutos).

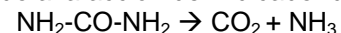
La visión microscópica tiene una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo y para obtener buenos resultados es necesario realizar una impronta densa en el portaobjetos, lo cual se consigue bien impregnando intensamente la biopsia a lo largo del mismo, bien colocando sobre el portaobjetos 2-3 gotas de la biopsia homogeneizada. Para conseguir una buena sensibilidad se recomienda partir de dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo.

#### 4.2. Prueba de la ureasa

##### 4.2.1. Propósito

*H. pylori* posee una ureasa que le capacita para la colonización y persistencia en la cavidad gástrica. Se localiza tanto en la membrana externa como en el espacio periplásmico y está compuesta por complejos de una estructura hexamérica. Se ha comprobado que mutantes isogénicos carentes de la enzima son incapaces de colonizar animales de experimentación. La potencia de la ureasa es muy superior a la de otras bacterias, incluida *Proteus spp.* La enzima cumple tres funciones principales: protección frente al ácido de la mucosa gástrica, provisión de nitrógeno en forma de amonio y como factor de virulencia en la patogenia de la úlcera gástrica.

El fundamento de la prueba rápida de la ureasa consiste en detectar la presencia de la enzima de la siguiente forma: *H. pylori* descompone la urea en anhídrido carbónico y amoniaco, lo cual genera un pH básico que va a ponerse en evidencia mediante el cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa fuerte debido a la acción del indicador de pH.



##### 4.2.2. Métodos de detección de la ureasa

La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica, obtenida mediante endoscopia digestiva alta. Se recomiendan dos biopsias, una de cuerpo y otra de antro para el diagnóstico. Las muestras pueden ser inoculadas en la misma sala de endoscopias por lo que no necesitan ningún medio de transporte.

Existen diferentes reactivos comerciales dirigidos a detectar la enzima a partir de biopsia. Todos ellos contienen urea a diferentes concentraciones (se estima que hasta un máximo del 6% porque concentraciones superiores pueden inhibir la enzima) y un indicador de pH y varían en el diseño de los mismos: existen "test" de gelosa como Clotest®, HUTtest® y Hfast® en los que la muestra se introduce en un medio semisólido que contiene los reactivos, "tests" de membrana, en los que los reactivos están contenidos en una tira de

papel, como Pyloriteck® y Pronto Dry® y “tests” en medio líquido como Helicochek®.

En general son sistemas comerciales muy sencillos de utilizar y los resultados se interpretan en un intervalo corto de tiempo (media hora), observando el cambio en el color del reactivo. Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%, respectivamente.

También se puede utilizar una solución preparada en el laboratorio que contenga urea al 3-4% e indicador de pH, sin embargo los resultados de sensibilidad pueden ser algo menores. La solución se puede preparar con 60 g/L de urea, 0,012 g/L de rojo fenol, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl y 10 g/L de glucosa en agua destilada.

### 4.3. Cultivo de *Helicobacter pylori*

El aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* es sin duda el método más específico en el diagnóstico del microorganismo. No obstante su sensibilidad varía notablemente en relación con diferentes variables como la recogida, transporte y almacenamiento de la muestra, los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación (porcentaje de CO<sub>2</sub> y humedad, principalmente). Se puede considerar como un método tedioso e incluso de difícil realización, pero debe efectuarse de rutina si se realiza la endoscopia ya que aporta un gran número de ventajas en el estudio de la bacteria. Entre ellas destaca el conocimiento de la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad del tipado de cepas con fines epidemiológicos.

#### 4.3.1. Recogida de la muestra

La muestra más habitual para el cultivo de *H. pylori* es la biopsia a partir de mucosa gástrica. El microorganismo se encuentra predominantemente en la parte antral del estómago, excepto en individuos tratados con IBP y antihistamínicos anti-H<sub>2</sub>, en los que se encuentran densidades más grandes en el cuerpo. Se encuentra, igualmente en mayor proporción en el antro gástrico en comparación con duodeno incluso en pacientes con duodenitis. Debido a la distribución parcheada se recomiendan varias biopsias para el aislamiento. Para obtener resultados óptimos se requieren cuatro biopsias, si bien se acepta de una manera general y de acuerdo con la clasificación modificada de Sydney que para asegurar un diagnóstico suficiente se deben procesar para cultivo al menos una muestra de antro y, si es posible, dos de cuerpo.

Se han utilizado otras muestras gástricas como jugo gástrico, la obtenida mediante la prueba del hilo (“string test”) y el aislamiento a partir de vómitos, aportando diferentes resultados. *H. pylori* se ha cultivado puntualmente también de muestras

extragástricas como placa dental, esófago, recto y vejiga urinaria.

Cualquier antibiótico con actividad frente a *H. pylori* reducirá considerablemente el número de bacterias en el estómago. Si el paciente ha estado en tratamiento con antibióticos es necesario esperar al menos cuatro semanas tras la última dosis para obtener resultados satisfactorios en lo que respecta al cultivo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la limpieza de los fórceps con los que se realizan las biopsias. Estos dispositivos deben desinfectarse adecuadamente para evitar contaminaciones entre los pacientes, si bien si la desinfección es demasiado fuerte puede perjudicar la viabilidad de la bacteria.

#### 4.3.2. Transporte y conservación de la muestra

*H. pylori* es un microorganismo lábil y el procesamiento de la muestra debe realizarse de una forma rápida una vez que esta ha sido obtenida.

Si el procesamiento es inmediato se debe introducir la biopsia en un tubo estéril con 0,5 ml de suero salino, si bien otros autores recomiendan dejar la muestra sobre la pared del tubo sin introducirla en el suero. *H. pylori* permanece viable en suero salino hasta 6 horas, de forma que si la siembra se realiza con posterioridad, la biopsia debe introducirse en medio de transporte semisólido para aumentar la viabilidad de la bacteria hasta 48 h si se conserva en nevera a 4°C.

No obstante la mejor alternativa parece ser procesar la biopsia durante las cuatro horas posteriores tras la recogida de la muestra.

#### 4.3.3. Procesamiento de la muestra y medios de cultivo

Previa a la inoculación es conveniente realizar una homogeneización de la biopsia bien mediante un mortero de cristal o preferiblemente con un triturador eléctrico en un volumen pequeño de suero fisiológico. El objetivo no es romper completamente el tejido sino mejorar la liberación de las bacterias de la superficie del mismo. Una vez realizada la homogeneización de la muestra se deben colocar dos gotas del homogeneizado en un medio selectivo y otras dos en otro no selectivo.

*H. pylori* es un microorganismo capaz de crecer en distintos medios de cultivo si bien requiere diferentes factores de crecimiento. Es difícil de cultivar en medio líquido aunque se logra con menor dificultad a partir de caldo de *Brucella*, cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con nutrientes, siendo el más común el suero bovino fetal.

Los medios de cultivo sólidos base más frecuentes son agar Mueller-Hinton y agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. Otros suplementos son el suero de caballo, lisado de eritrocitos y hemina, extracto de levadura, peptona, e Isovitalex, si bien los resultados no son mejores que los obtenidos con suero bovino fetal o sangre. Recientemente se ha mostrado



prometedor en el cultivo del microorganismo un extracto obtenido de cianobacterias.

Dos aspectos importantes a considerar en relación con la sangre son, en primer lugar la cantidad utilizada, ya que un aumento en la proporción al 7-10% mejora significativamente el crecimiento en comparación con el 5%. En segundo lugar el tipo de sangre utilizada, encontrándose un crecimiento más denso con sangre de caballo al 10% y lisada al 7%.

Con el objeto de evitar el sobrecrecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *H. pylori* en la biopsia es necesaria la utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad. *H. pylori* es resistente *in vitro* a la vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cefsulodina y polimixina B, los cuales pueden utilizarse en los medios selectivos para su aislamiento.

#### 4.3.4. Condiciones de incubación

*H. pylori* es un microorganismo microaerófilo que requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 80-90% de N<sub>2</sub> a 35-37°C, una humedad del 95% y una incubación de hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo. Estas condiciones se obtienen bien utilizando cabinas de microaerofilia o con sobres comerciales que proporcionen las características anteriores. Estos últimos proporcionan resultados muy buenos pero tienen como inconveniente la necesidad de reemplazar los sobres una vez abiertas las jarras.

#### 4.3.5. Criterios para interpretación de resultados.

4.3.5.1. Identificación del microorganismo. La identificación se realiza mediante visualización en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver la morfología o bien mediante una tinción de Gram. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación como *H. pylori*.

4.3.5.2. Subcultivos y conservación de las cepas. Una vez realizado el aislamiento se debe subcultivar cada 48-72 horas en medios no selectivos en las condiciones anteriormente expuestas. Las cepas se pueden conservar en caldo tripticasa soja o infusión de cerebro corazón con glicerol al 20% en congelador a -80°C o en nitrógeno líquido.

### 4.4. Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del ADN de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica pero también en otras muestras como heces, saliva o agua. La mayoría de las técnicas se basan en la PCR, tanto clásica como en tiempo real. El objetivo de todas ellas ha sido:

- detección de genes específicos de la bacteria. Permite detectar *H. pylori* en diferentes muestras. Se ha utilizado el estudio del gen de la ureasa (*ureA* o *ureC*), el gen 16S ARNr u otros genes,

- detección de factores de virulencia. Aunque se han realizado numerosos estudios actualmente no tienen una clara aplicación práctica pues no se puede caracterizar a una cepa como más patógena con el fin de tratar o no, en base a la presencia de estos genes de virulencia.
- detección de mecanismos de resistencia (principalmente a claritromicina, ver apartado 5).

### 4.5. Prueba del aliento (*urea breath test*, UBT)

Es un método indirecto que se basa en la presencia de la ureasa de *H. pylori*. El paciente ingiere una solución con urea marcada isotópicamente con <sup>13</sup>C (no radioactivo) o <sup>14</sup>C (radioactivo) y se recoge el aliento 30 minutos después de la ingestión de la solución de urea; previamente se habrá recogido otra muestra de aliento basal. Si *H. pylori* se encuentra en el estómago, éste hidroliza la urea gracias a su ureasa y se libera CO<sub>2</sub> marcado (<sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C) que se absorbe, difunde a sangre y transporta a los pulmones y es liberado con el aliento.

Los resultados se miden como la relación de <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C de la prueba con respecto al estándar. Tanto el sistema radiactivo como el no radiactivo presentan similares porcentajes de sensibilidad aunque generalmente se prefiere el no radiactivo si se dispone del espectrómetro de masas.

Estas pruebas tienen una excelente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento antimicrobiano con la ventaja de ser una prueba global que valora la presencia de *H. pylori* en el estómago y no se ve sometido al sesgo que pueden tener otras pruebas por la distribución parcheada de la bacteria en el estómago. También tienen otras ventajas, como el ser una prueba no invasora y no depender de las condiciones de transporte, ni de la experiencia del personal técnico. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado.

Recientemente, se está utilizando un nuevo analizador con espectrometría de infrarrojos que permite la realización de la técnica en la consulta del clínico en pocos minutos.

### 4.6. Serología

#### 4.6.1. Características de los métodos serológicos

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero, saliva u orina. La serología es útil en el estudio de poblaciones seleccionadas, sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo. El rendimiento de las pruebas serológicas puede verse afectado por el método diagnóstico considerado como referencia (*gold estándar*), la clase de anticuerpo, el tipo de antígeno y

la técnica serológica utilizada, así como por la población estudiada.

*H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica. El sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico.

La prevalencia de anticuerpos tipo IgG en adultos sanos en España es alta, por lo que su detección en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* origina un elevado porcentaje de falsos positivos y por tanto, hacen falta técnicas complementarias para llegar a un diagnóstico correcto. Un meta-análisis de 21 sistemas comerciales de detección de IgG mostró una sensibilidad del 85% y una especificidad del 79%. En cuanto al valor diagnóstico de la IgA, existen discrepancias entre los autores y no parece añadir mayor eficacia a la determinación de anticuerpos IgG.

Se han utilizado varias clases de antígenos, que van desde células enteras o sonicadas hasta antígenos parcial o altamente purificados (ureasa, etc.). La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA puede tener especial interés en estudios sobre virulencia. Puesto que la detección de anticuerpos depende del antígeno utilizado, considerando la heterogeneidad genética de *H. pylori* y las variaciones geográficas, algunos autores recomiendan el uso de mezclas de antígenos procedentes de varias cepas para mejorar la sensibilidad de estas técnicas así como su valoración en cada medio.

La técnica más utilizada es el EIA cuantitativo, que permite, además del diagnóstico primario, la monitorización del tratamiento. Los métodos serológicos cualitativos muestran peores resultados y los métodos rápidos no se recomiendan. Las técnicas que detectan anticuerpos en saliva y en orina son atractivas, ya que estas muestras son fáciles de obtener, pero en ellas, la concentración de anticuerpos es más baja que en suero. Los resultados prometedores de algunos trabajos no se han confirmado en estudios multicéntricos por lo que no se recomiendan en el diagnóstico.

Los métodos basados en la técnica del Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos concretos, como CagA y VacA.

#### 4.6.2. Utilidad clínica

Mientras los estudios serológicos son de indudable valor para conocer la epidemiología de este patógeno, su valor en el diagnóstico debe interpretarse con cautela ya que existe una elevada seroprevalencia en poblaciones sanas, por lo que en nuestro medio, los resultados positivos para adultos pueden ser no concluyentes.

Una importante ventaja de los métodos serológicos, es que sus resultados no se ven afectados por el tratamiento reciente con antibióticos o inhibidores de la bomba de protones, que pueden inducir falsos negativos con otros métodos.

El Grupo de Consenso Europeo para el Estudio de *Helicobacter* recomienda la realización de técnicas serológicas en el ámbito de atención primaria, en pacientes menores de 45 años con síntomas de dispepsia y sin signos de "alarma" (anemia, pérdida de peso, etc.). En atención especializada, no existe consenso sobre la utilidad de la serología como método de filtrado preendoscópico.

En menores de 12 años, la sensibilidad de la serología es demasiado baja para utilizarse como cribado. Puesto que la especificidad está entorno al 90%, un resultado positivo podría considerarse diagnóstico de infección por *H. pylori* en este grupo de pacientes.

En caso de hemorragia digestiva, la serología es una de las técnicas más sensibles, pero también plantea problemas de especificidad y de bajo valor predictivo negativo, por lo que no debe emplearse como único método diagnóstico de la infección por *H. pylori* en caso de úlcera péptica sangrante.

En la monitorización de la respuesta al tratamiento, y debido al lento descenso del título de anticuerpos (3-6 meses) no es ésta la técnica de elección, sin embargo, varios estudios han mostrado que los EIA cuantitativos pueden ser útiles en algunos casos.

La eficacia de la serología en el seguimiento de la respuesta al tratamiento se relaciona directamente con el nivel de anticuerpos pretratamiento y el tiempo de seguimiento entre las muestras pre y postratamiento. Se recomienda realizar pruebas cuantitativas con los dos sueros del paciente (pre y postratamiento) analizados simultáneamente. En pacientes con altos títulos pretratamiento se observa un descenso significativo en el título de anticuerpos después de 3-6 meses de tratamiento efectivo. Este descenso de anticuerpos sólo se mantiene en pacientes curados.

Existen diferentes métodos comerciales que se basan fundamentalmente en la detección de IgG mediante ELISA. Son muy útiles para la realización de estudios epidemiológicos. Cada uno de los métodos tiene distinta sensibilidad y especificidad.

#### 4.6.3. Recogida de la muestra

Las técnicas serológicas se realizan con una muestra de suero que se debe recoger y procesar de acuerdo con la normas microbiológicas habituales (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.6.4. Transporte y conservación de la muestra

Las muestras de suero deben transportarse y conservarse según la normativa habitual (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el

laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.6.5. Procesamiento de la muestra

Las muestras de suero deben procesarse según la normativa habitual (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.6.6. Criterios para interpretación de resultados

Los criterios de interpretación de los resultados dependen de cada uno de los equipos comerciales y por lo tanto es necesario seguir rigurosamente las recomendaciones de cada fabricante.

### 4.7. Antígeno en heces

#### 4.7.1. Características de la técnica

Es un método directo no invasivo que permite la detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales o monoclonales y pueden existir pequeñas diferencias entre ellos.

Se ha descrito como válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección. Se trata de un ensayo cualitativo (no cuantitativo). La técnica aporta una información muy valiosa por la fácil obtención y conservación de las muestras, se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología y no necesita la colaboración del paciente (como en el caso de la prueba del aliento). Es muy útil en niños pequeños. Puede utilizarse tanto para el diagnóstico de colonización por *H. pylori* como para el seguimiento después del tratamiento erradicador.

El primer equipo comercializado fue el Premier Platinum HpSA (Meridian diagnostics) consiste en una técnica de enzimoimmunoanálisis preparado con anticuerpos policlonales anti-*H. pylori*. Presenta excelente especificidad pero existen datos variables de sensibilidad (de 57,7% a 96,6% según los estudios).

El equipo FemtoLab (Connex, Munich, Germany) también comercializado con el nombre Amplified-IDEAa-HpSTAR (Dako, Glostrup, Denmark) consiste en una técnica de enzimoimmunoanálisis realizado con anticuerpos monoclonales anti-*H. pylori* que presenta mejores resultados de sensibilidad (de 88 a 98% según los estudios).

Recientemente se ha desarrollado un sistema de inmunocromatografía ImmunoCard STAT HpSA (Meridian Diagnostics) realizado con anticuerpos monoclonales que presenta valores de sensibilidad de 73 a 96% aunque todavía está poco estudiado.

Por lo tanto, en función de los estudios actualmente disponibles, el sistema más recomendable es el sistema de EIA con anticuerpos monoclonales por sus

mejores resultados en cuanto a sensibilidad de la técnica y por la buena reproducibilidad.

#### 4.7.2. Recogida de la muestra

La muestra para detección de antígeno es una muestra de heces que debe recogerse y conservarse según la normativa habitual (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.7.3. Transporte y conservación de la muestra

Las muestras de heces deben transportarse y conservarse según la normativa habitual (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.7.4. Procesamiento de la muestra

Las muestras de heces deben procesarse según la normativa habitual (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología, PNT-RTP-01, SEIMC 2003).

#### 4.7.5. Criterios para interpretación de resultados

Los criterios de interpretación de los resultados varían según los equipos comerciales y por lo tanto es necesario seguir rigurosamente las recomendaciones de cada fabricante.

## 5. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de *H. pylori* a los agentes antimicrobianos es importante ya que la resistencia primaria o adquirida a varios antibióticos se asocia con la ausencia de erradicación de la bacteria en el estómago.

Actualmente existe una recomendación del *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) que aconseja el método de dilución en agar y establece puntos de corte para claritromicina. Sin embargo, la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) recomienda difusión con E-test. Por último, la difusión con disco también se ha utilizado por diferentes autores.

### 5.1 Dilución en agar

Es el método de referencia pero no aplicable de forma rutinaria para cada cepa aunque es válido para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos y realizar estudios con el objeto de conocer la tasa global de resistencia en un área determinada. La metodología que recomienda el NCCLS es la siguiente:

- Medio: Mueller-Hinton agar suplementado con 5% de sangre de carnero (de más de 2 semanas).
- Inóculo: Preparar un 2 de MacFarland ( $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  ufc/mL) en solución salina a partir de un subcultivo de 72 horas de *H. pylori* en agar sangre.

- Incubación: 3 días en atmósfera microaerófila producida con sobre generador de gas válido para *Campylobacter*.
- Se debe utilizar la cepa control *H. pylori* ATCC 43504 para la que existen límites aceptables de valor de CMI de: amoxicilina (0,016-0,12 mg/L), claritromicina (0,016-0,12 mg/L), metronidazol (64-256 mg/L), telitromicina (0,06-0,5 mg/L) y tetraciclina (0,12-1,0 mg/L).
- El punto de corte de resistencia a claritromicina se recoge en la tabla 1, considerando que el antibiótico se utiliza en una de las pautas aprobadas por la FDA junto con un inhibidor de la bomba de protones o ranitidina-citrato de bismuto.

### 5.2. Difusión con E-test

Es un método cuantitativo para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* basado en la difusión. El método del epsilómetro está especialmente recomendado en organismos exigentes y cuando se deben probar pocos microorganismos o pocos antibióticos. Tiene diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales de dilución en agar, dilución en caldo o difusión en agar. La correlación de este método con la dilución en agar no es buena cuando se estudia metronidazol. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) recomienda:

- Medio de cultivo: Mueller-Hinton o Wilkins-Chalgren suplementado con 5-10% de sangre de caballo.
- Inóculo: resuspender colonias de un cultivo de 2 a 3 días de incubación en agua destilada estéril y ajustar a un 3 de McFarland, e inocular la superficie de una placa con una torunda empapada en esta suspensión. Aplicar la tira de E-test después de dejar que se seque el inóculo aplicado.
- Incubación: a 35°C en microaerofilia durante 3 a 5 días y leer la CMI como el punto en el que existe una inhibición completa del microorganismo.
- Los puntos de corte de resistencia se muestran en la tabla 1.

### 5.3. Difusión con discos

Es el método más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*, pero no hay muchos estudios de correlación entre los valores de CMI y los diámetros de inhibición en el caso de *H. pylori*, por lo que no es el método más adecuado. Teniendo en cuenta que el método de dilución en agar no es aplicable de rutina y el método del E-test es caro y que también se observan discrepancias con metronidazol, McNulty en 2002 realizó una revisión de los estudios en los que se había utilizado difusión con disco, recomendando:

- Medio de cultivo: Mueller-Hinton o Columbia suplementado con 5 a 10% de sangre (de caballo o carnero).

**Tabla 1. Puntos de corte recomendados por la NCCLS o por la BSAC.**

Método	NCCLS			BSAC	
	Dilución en agar			E-test	
	Punto corte (mg/L)			Punto corte (mg/L)	
	S	I	R	S	R
Amoxicilina				≤1	≥2
Claritromicina	≤0.25	0.5	≥1	≤1	≥2
Tetraciclina				≤2	≥4
Metronidazol				≤4	≥8

- Inóculo: preparar un inóculo de un 4 de McFarland ( $10^8$  ufc/mL) a partir de un cultivo de menos de 4 días de incubación.
- Concentración de discos y puntos de corte: para metronidazol recomienda utilizar un disco de 5 µg y considera resistente si el halo es <16 mm, intermedio si 16-21 mm y sensible si >21 mm. En las cepas con sensibilidad intermedia se recomienda la realización de un método de determinación de CMI. Para claritromicina es preferible la utilización de un disco de 2 µg considerando resistente cuando no existe halo de inhibición. También se puede utilizar un disco de 15 µg de claritromicina y considerar resistente si el halo es de <18 mm.

### 5.4 Técnicas moleculares

La resistencia a la claritromicina se produce por una mutación puntual en el ARN ribosomal 23S en la posición 2142 (cambio de adenina por guanina o citosina) o en la posición 2143 (cambio de adenina por guanina). Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para detectar esta resistencia, que se han utilizado en cepas cultivadas *in vitro* pero también directamente en muestras de biopsia gástrica.

La detección de las mutaciones que confieren resistencia a claritromicina en *H. pylori* se ha realizado mediante PCR. Se amplifica un fragmento de 1,4 Kpb correspondiente al dominio V de la región 23S del ARNr y se detecta la mutación en A2142G y A2143G tras digestión con las enzimas *MbolI* y *BsaI*, respectivamente.

También se han utilizado técnicas de secuenciación, de PCR "mismatchheada", de PCR y ensayo de unión con oligonucleótido (PCR-OLA) y de hibridación tanto en fase sólida (LiPA) como en líquida. Recientemente se ha utilizado con éxito la PCR en tiempo real; esta última permite detectar cualquier tipo de mutación en la región de la sonda y el proceso se realiza en 1 hora.

La ventaja de las técnicas moleculares es la rapidez en obtener resultados y la excelente correlación con la sensibilidad obtenida por métodos fenotípicos. La principal desventaja es que sólo sirve para detectar resistencia a macrólidos y que se requiere disponibilidad de este tipo de técnicas en el laboratorio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

### General

1. Asaka M, Dragosics BA. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter* 2004; 9:35-41.
2. Glupczynski Y. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI*. Microbiología, clínica y tratamiento. Manuel López-Brea (editor). Prous Science, Barcelona 1999, pp. 41-54.
3. Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9:7-14.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPGS). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastrich 2-2000 Consensus report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:167-180.
5. Megraud F, Lamouliatte H. The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:1333-1343.
6. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994; 272:65-69.
7. Sainz R, Borda F, Dominguez E, Gisbert JP. *Helicobacter pylori* infection. The Spanish consensus report. The Spanish Consensus Conference Group. *Rev Esp Dig* 1999; 91:777-784.
8. Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* (8 Ed). ASM Press Washington, 2003 pp. 915-928.

### Específica

#### Ureasa rápida

1. Laine L, Lewin D, Naritoku W, Estrada R, Cohen H. Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 1996; 44:523-526.
2. Morio O, Rioux-Leclercq N, Pagenault M, Corbinais S, Ramee MP, Gosselin M, Bretagne JF. Prospective evaluation of a new rapid urease test (Pronto Dry) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28:569-573.

### Cultivo

1. Fresnoy M, Martínez MJ, Rodríguez Rincón M, Blázquez de Castro AM, García Sánchez E, García Sánchez JE, Trujillano Martín I, Cordero Sánchez M, Alvarez Alvarez P, Paz Bouza J, García-Rodríguez JA. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter* 1997; 2:36-39.

2. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:616-622.

### Serología

1. Herbrink P, Van Doorn LJ. Serological methods for diagnosis of *H. pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:164-173.
2. Vakil N, Vaira D. Non-invasive tests for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Rev Gastroenterol Dis* 2004; 4:1-6.

### Antígeno en heces

1. Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong VS, Wood E, Kelsey M. Comparison of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. *J Clin Pathol* 2001; 56: 769-771.
2. Koletzko S, Konstantopoulos N, Bosman D, Feydt-Schmidt A, van der Ende A, Kalach N, Raymond J, Russmann H. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. *Gut* 2003; 52: 804-806.

### Sensibilidad

1. Domingo D, Alarcón T. Mecanismo de resistencia a antibióticos en *Helicobacter pylori*. En *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI*. Microbiología, clínica y tratamiento. Manuel López-Brea (editor). Prous Science, Barcelona 1999, pp. 307-325.
2. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, Soussy CJ, Petit JC, Delchier JC, Tankovic J. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4573-4577.
3. López-Brea M, Alarcón T. Sensibilidad a los antimicrobianos en la infección por *Helicobacter pylori*. En *Helicobacter pylori: retos para el siglo XXI*. Microbiología, clínica y tratamiento. Manuel López-Brea (editor). Prous Science, Barcelona 1999, pp. 281-305.
4. McNulty C and the PHLS *Helicobacter* Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:601-609.
5. NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 14<sup>th</sup> informational supplement. NCCLS document M100-S14 (M7). NCCLS, Wayne, Pa.
6. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, Shortridge D, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother* 1997; 40:283-286.

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-HP-01**  
**CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori***

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°** ..... **ASIGNADA A**.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología	<b>Cultivo e identificación de <i>Helicobacter pylori</i></b>	Fecha: PNT-HP-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 4

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento de muestras para el diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante cultivo, técnica de ureasa rápida y técnicas de visión microscópica. Se describe el tipo de muestra, su procesamiento en el laboratorio, las condiciones de cultivo y los métodos de identificación.

## 2. FUNDAMENTO

*H. pylori* es una bacteria gramnegativa microaerófila que coloniza el estómago del 50% de la población mundial y está relacionada con la producción de gastritis, úlcera péptica, linfoma MALT y cáncer gástrico. El cultivo del microorganismo a partir de biopsias gástricas permite además de realizar el diagnóstico microbiológico de la infección, el conocimiento de los determinantes de virulencia, sensibilidad a antimicrobianos y la posibilidad de tipado de cepas con fines epidemiológicos.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad: La actuación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser estrictamente cumplimentado y en el deberá constar la filiación, edad, número de historia, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), tratamiento previo y diagnóstico del paciente, así como el código del clínico que realiza la petición.

### 4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra para el cultivo de *H. pylori* debe ser biopsia gástrica. Se deben cultivar al menos una biopsia de antro y dos de cuerpo gástrico.

### 4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Los resultados del cultivo están en dependencia de la demora en el transporte y de las condiciones de conservación de la muestra.

- Procesamiento inmediato o menor a 6 horas: introducir la muestra en un tubo de plástico que contenga 0,5 ml de suero salino al 0,8%. La biopsia puede quedar sumergida en el suero o

quedar adherida en la superficie del tubo. Mantener el tubo en nevera a 4°C.

- Procesamiento posterior a 6 horas tras la obtención de la muestra: introducir la muestra en medio de transporte semisólido de Stuart y conservar en nevera hasta el cultivo.

## 4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben ser cuidadosamente observadas las siguientes incidencias relacionadas con la muestra:

1ª Defectos encontrados en la identificación de la misma: etiquetado erróneo e inadecuada o incompleta cumplimentación de la hoja de petición.

2ª Mala conservación (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado).

3ª Muestras con aspecto de mala conservación (biopsias secas).

Todas estas incidencias deben ser comunicadas al clínico correspondiente, indicando el procesamiento o no de la muestra e incidiendo en la interpretación de los resultados si se llevara a cabo el mismo.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1. MEDIOS DE CULTIVO NO SELECTIVOS

Agar Columbia con 10% de sangre caballo o cordero  
Agar chocolate con 1% de Isovitalex  
Columbia agar con 10% de yema de huevo, 1% Isovitalex y 0,04% de cloruro de trifetil tetrazolium  
Agar de cerebro y corazón con 10% de suero bovino fetal, 1% de extracto de levadura y 0,04% de cloruro de trifetil tetrazolio

### 5.2. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

Agar de Wilkins-Chalgren con 10% de sangre (caballo o cordero) y suplemento antibiótico.  
Agar Columbia con 10% de sangre (caballo o cordero) y suplemento antibiótico.  
Agar Pylori (BioMerieux). Medio comercial que contiene suero de caballo, extracto de levadura y suplemento antibiótico, diseñado para aislamiento primario de *H. pylori*.

### 5.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Sistemas comerciales generadores de atmósfera microaerófila  
Colorantes para tinciones  
Reactivos para realización de las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa

## 6. APARATOS Y MATERIAL

Neveras  
Cabina de microaerofilia o jarras de anaerobiosis  
Cabina de seguridad biológica  
Microscopio óptico  
Congeladores de -80°C  
Sistema de nitrógeno líquido  
Homogeneizador eléctrico, de teflón o de vidrio  
Otro material  
Asas desechables  
Torundas de algodón  
Portaobjetos, cubreobjetos

Servicio de Microbiología	<b>Cultivo e identificación de <i>Helicobacter pylori</i></b>	Fecha: PNT-HP-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 4

Guantes

Tubos estériles de polipropileno de 10 ml

Mechero incinerador

## 7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

### 7.1 PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Homogeneizar la muestra en un volumen de 0,5 ml de suero salino mediante un homogeneizador eléctrico a 10.000 r.p.m. durante 10-20 segundos o bien mecánicamente con un homogenizador de teflón durante 1 minuto.

Inocular 2-4 gotas del homogeneizado en 2 placas con medio selectivo y 2 placas con medio no selectivo. Esparcir el inóculo por toda la superficie de la placa.

### 7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Incubar una placa inoculada en medio selectivo y otra en no selectivo en jarras de microaerofilia utilizando generadores comerciales. Las jarras se incubarán a 35-37°C durante un periodo de 10-14 días.

Incubar una placa inoculada en medio selectivo y otra en medio no selectivo en un incubador de CO<sub>2</sub> al 10% y 95% de humedad, a 37°C durante un periodo de 10-14 días.

### 7.3. OBSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Examinar los cultivos cada 24 horas tras el tercer día de incubación.

Las colonias sospechosas (gris claro, pequeñas y brillantes) deben identificarse de la siguiente manera:

1. Visión en fresco
2. Tinción de Gram
3. Prueba de la ureasa. Inocular varias colonias del microorganismo en 0,25 ml de caldo de urea e incubar a 37°C. A los pocos minutos se podrá observar un color rojo.
4. Prueba de la oxidasa. Transferir varias colonias a una tira de oxidasa o a un papel de filtro impregnado en dihidro-cloruro de N,N,N',N' tetrametil-p-fenilendiamina al 1%. Una reacción azul oscura indica la presencia de la enzima oxidasa.
5. Prueba de la catalasa. Inocular un asa con colonias en una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% depositada en un portaobjetos. La formación de burbujas indica una prueba de catalasa positiva.

### 7.4. SUBCULTIVO DEL MICROORGANISMO

Puede llevarse a cabo de dos maneras:

- 1) Preparar una suspensión densa del microorganismo, obtenido a partir de cultivo puro, en caldo BHI o solución salina e inocular dos gotas de la misma en placas no selectivas y esparcirlas siguiendo la metodología del apartado PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA. Incubar en ambiente microaerofílico. Tiene como inconveniente la

contaminación por cualquier microorganismo existente en el cultivo inicial, pero se obtiene un subcultivo con una gran cantidad de microorganismo.

- 2) Realizar un subcultivo directamente con el asa o con un hisopo de algodón estéril recogiendo toda la biomasa de un aislamiento de *H. pylori* en cultivo puro e inocularlo en un medio no selectivo. Incubar en ambiente microaerofílico. De esta forma la densidad de microorganismo en el subcultivo es menor pero se evitan contaminaciones.

Tras 48-72 horas de incubación puede hacerse uso de los mismos para diferentes requerimientos (conocimiento de la sensibilidad a antimicrobianos, caracterización de factores de virulencia, etc.)

### 7.5. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y DE LAS CEPAS AISLADAS

Con el objeto de futuros estudios tanto las muestras (biopsias) como los aislamientos de *H. pylori* obtenidos, pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo.

- Conservación de la muestra: introducir la biopsia en un criotubo que contenga 0,5 ml de BHI con 20% de glicerol e incubar bien a -80°C, bien en nitrógeno líquido a -196°C.

- Conservación de los aislamientos de *H. pylori*:

- a) Subcultivar la cepa en dos placas de agar no selectivo
- b) Recoger tras 48 horas de incubación todo el crecimiento observado e inocularlo en 2-3 ml de BHI con 20% de glicerol.
- c) Distribuir en criotubos (alícuotas de 0,5 ml) y congelar a -80°C o nitrógeno líquido a -196°C.

### 7.6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA PRUEBA DE LA UREASA RÁPIDA

#### 7.6.1. Objetivo y fundamento de la prueba de la ureasa

Detección de la ureasa del microorganismo a partir de muestra de biopsia gástrica. La enzima produce CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub> a partir de urea, lo cual se traduce en un cambio de color debido a la presencia de un indicador de pH.

#### 7.6.2. Realización de la prueba

Inocular la muestra de biopsia gástrica en el reactivo para la detección rápida de ureasa. Los reactivos utilizados pueden ser comerciales o preparados en el laboratorio y están reflejados en el documento científico.

La inoculación se puede realizar tanto en la sala de endoscopias como en el laboratorio de microbiología, lo más rápidamente posible.

#### 7.6.3. Lectura e interpretación de los resultados

Un cambio en el color del medio de amarillo-naranja a rosa-fucsia se considera una reacción positiva. La lectura se debe realizar en un intervalo de tiempo que oscila entre 5 minutos y una hora.

No obstante cada fabricante debe especificar claramente las escalas de colores para la



Servicio de Microbiología	<b>Cultivo e identificación de <i>Helicobacter pylori</i></b>	Fecha: PNT-HP-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 4

interpretación de cada prueba y los tiempos de lectura, con el objeto de obtener los mejores resultados de sensibilidad y especificidad.

## 7.7. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRA PARA VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA

### 7.7.1. Objetivo de la visualización de *H. pylori* en mucosa gástrica

Diagnosticar de una forma sencilla y rápida la infección por el microorganismo mediante la visión microscópica de la morfología helicoidal en muestras de biopsia gástrica.

### 7.7.2. Tipo de muestra, transporte y almacenamiento de la misma

La muestra utilizada es biopsia gástrica. Si es posible, deben procesarse dos muestras (una de antro y otra de cuerpo gástrico) exclusivamente para la técnica de tinción. Si esto no es posible, las muestras procesadas para cultivo deben utilizarse para las técnicas de tinción.

El transporte y almacenamiento de las biopsias se deben realizar de la misma forma que se especifica en el apartado de CULTIVO.

### 7.7.3. Visualización de *H. pylori* a partir de biopsia

1º Sobre un porta limpio previamente desengrasado se debe proceder eligiendo una de estas dos técnicas:

- Colocar 2-3 gotas del homogeneizado de la biopsia descrito en el sub-apartado de PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA del apartado de CULTIVO en el portaobjetos. Dejar secar.
- Realizar una impronta arrastrando la biopsia mediante una torunda por toda la superficie del portaobjetos.

Es preferible la opción a).

2º Fijar con calor con mechero tipo Bunsen.

3º Realizar la tinción

Pueden utilizarse las técnicas de tinción referidas en el apartado DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI* MEDIANTE TÉCNICAS DE TINCIÓN DE BIOPSIA GÁSTRICA del Documento Científico, si bien recomendamos la técnica de tinción de Gram modificada que se indica a continuación:

- Añadir cristal violeta durante 1 minuto
- Lavar con agua del grifo
- Fijar con lugol durante 1 minuto
- Lavar con agua del grifo
- Decolorar con alcohol-acetona durante 5-10 segundos
- Lavar con agua del grifo
- Añadir carbol fuchina durante 5 minutos
- Lavar con agua del grifo

Visualizar con el microscopio de 100 aumentos utilizando aceite de inmersión.

### 7.7.4. Visualización en microscopio de contraste de fases

1º Añadir 1-2 gotas de homogeneizado de la biopsia y 1 gota de suero salino en un portaobjetos.

2º Cubrir la preparación con un cubreobjetos.

3º Examinar con el objetivo de 40 aumentos del microscopio de contraste de fases.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se obtiene el cultivo de *H. pylori* y se logra la identificación definitiva se debe informar junto con la sensibilidad a antimicrobianos habituales (PNT-HP-04). Si se observan los microorganismos gramnegativos curvados en la tinción realizada a partir de muestras de biopsia gástrica pero no se recupera en cultivo se debe informar de la siguiente forma: Presencia de bacilos gramnegativos curvados compatibles con *Helicobacter pylori*. Un resultado de la prueba de ureasa rápida positivo sin ninguna otra prueba positiva se debe valorar con precaución.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de las técnicas. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los informes emitidos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

No existe un procedimiento internacionalmente aceptado para el procesamiento de las muestras para el cultivo de *Helicobacter pylori*. El procedimiento descrito se basa en la experiencia de los investigadores que han trabajado en este tema y en la bibliografía recomendada.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La contaminación excesiva de la muestra con flora orofaríngea puede impedir el crecimiento de *H. pylori* incluso en los medios selectivos. La incubación prolongada de las placas en medios microaerófilos con alta tasa de humedad puede favorecer el crecimiento de hongos contaminantes que dificultan o imposibilitan el cultivo del microorganismo.

El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede alterar los resultados de los cultivos.

Otras bacterias que produzcan ureasa pueden positivizar falsamente la prueba de la ureasa. De igual forma esto puede ocurrir en pacientes con úlcera sangrante.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Fresnadillo Martínez MJ, Rodríguez Rincón M, BIÁzquez de Castro AM, García Sánchez E, García Sánchez JE, Trujillano Martín I, Cordero Sánchez M, Alvarez Alvarez P, Paz Bouza J, García-Rodríguez JA. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter*. 1997; 2: 36-39.
- Hua J, Yeoh KG, Ng HC, Zheng PY, Lim SG, Ho B. Improving the success of culturing *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Microbios* 1998; 96: 95-101.
- Laine L, Lewin D, Naritoku W, Estrada R, Cohen H. Prospective comparison of commercially available rapid rease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 523-526.
- Piccolomini R, Di Bonaventura G, Festi D, Catamo G, Laterza F, Neri M. Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1541-1544.

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-HP-02**  
**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori***

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°. ....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología	Serología <i>Helicobacter pylori</i>	Fecha: PNT-HP-02	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 2 de 2

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este documento pretende ser una guía de los métodos serológicos para el estudio de anticuerpos frente a *Helicobacter pylori*, siguiendo las recomendaciones del documento científico. Puesto que es imposible describir detalladamente todos los métodos serológicos disponibles actualmente, expondremos un procedimiento genérico, que pueda servir de guía para que cada laboratorio confeccione su PNT teniendo en cuenta su práctica habitual.

## 2. FUNDAMENTO

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori*, generalmente de tipo IgG. Estos métodos pueden utilizarse para el diagnóstico de la infección, el posible seguimiento serológico de la respuesta al tratamiento así como para conocer la prevalencia de anticuerpos frente a este microorganismo.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad: la actuación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
- Manuales de instrucciones de los distintos equipos comerciales utilizados en cada laboratorio.

## 4. MUESTRAS

Estas determinaciones deben realizarse en suero o en plasma.

Cada laboratorio debe protocolizar la forma de identificación, transporte al laboratorio y conservación de las muestras hasta realizar la detección de anticuerpos y debe rechazarse las muestras que no cumplan estos protocolos.

No se aceptará suero hemolítico ni hiperlipémico.

Como para el control del tratamiento es importante realizar estudios cuantitativos de sueros del mismo paciente a lo largo del tiempo, es importante conservar una alícuota congelada de cada muestra.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Todos los ensayos son de origen comercial, por lo que el manejo y la conservación de los reactivos se ajustarán a las instrucciones del fabricante.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función de las características del sistema empleado y de las condiciones de cada laboratorio, estas determinaciones se realizarán en sistemas automatizados o de forma manual.

## 7. PROCESAMIENTO

Cada laboratorio debe describir detalladamente los pasos a seguir para realizar el ensayo, desde la descongelación de los sueros y el atemperamiento de los reactivos hasta las diluciones a realizar, los controles, etc. Deben respetarse las instrucciones del fabricante.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para la aceptación de los resultados, es imprescindible la validación del ensayo en función del resultado de los controles y los criterios establecidos por el fabricante.

Para minimizar la variabilidad interensayo, a la hora de estudiar la variación en el título de anticuerpos en un paciente a lo largo del tiempo, deben analizarse simultáneamente todos los sueros del paciente (pre y postratamiento).

Una vez validado un ensayo, se genera un resultado que se ha de informar de un modo interpretado.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de las técnicas. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los informes emitidos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Debido a que la prevalencia de anticuerpos frente a *H. pylori* en población sana de cada zona influye en el valor predictivo de estos sistemas, es necesario validar cada equipo comercial a nivel local.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se debe establecer el rango de linealidad de las técnicas cuantitativas.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Herbrink P, van Dorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 164-173.
2. Loza E, Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica, Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica, 2000. Coordinadora: Elena Loza, Ed. JJ Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-HP-03**  
**DETECCIÓN DE ANTIGENO EN HECES DE *Helicobacter pylori***

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N° .....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de antígeno en heces</b>	Fecha: PNT-HP-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este documento pretende describir el procesamiento, lectura e interpretación de la técnica de detección de antígeno de *H. pylori* en heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales y con anticuerpos monoclonales y pueden existir pequeñas diferencias entre ellos, en este protocolo se describen las características de uno de ellos y será necesario la adaptación del protocolo a cada laboratorio si es necesario.

## 2. FUNDAMENTO

Se trata de una técnica de enzimoimmunoensayo en formato de placas de microtitulación basada en anticuerpos monoclonales. Permite establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección. Es un ensayo cualitativo, no cuantitativo. Actualmente el diagnóstico y el seguimiento de la infección por *H. pylori* se realiza por métodos invasores como la endoscopia y por métodos no invasores como la serología (detección de anticuerpos) y la prueba aliento (UBT), pero en algunos casos puede estar recomendada una técnica que utilice una muestra fácil de obtener y conservar, que se pueda realizar en cualquier laboratorio de microbiología y que no necesite la colaboración del paciente (como en la prueba del aliento).

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad: la actuación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
- Manual de instrucciones del equipo comercial utilizado en cada laboratorio.

## 4. MUESTRAS

Se realiza con muestras de heces que pueden ser frescas o congeladas a -20°C.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los ensayos son de origen comercial, por lo que el manejo y la conservación de los reactivos se ajustarán a las instrucciones del fabricante.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función de las características del sistema empleado y de las condiciones de cada laboratorio, estas determinaciones se realizarán en sistemas automatizados o de forma manual.

## 7. PROCESAMIENTO

Los pocillos de la placa de microtitulación están recubiertos de anticuerpos monoclonales contra antígenos de *H. pylori*. Se elabora una suspensión de material fecal y anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa (conjugado enzimático). El material sobrenadante se coloca en los pocillos. Tras un tiempo de incubación de 60 minutos, si existen antígenos de *H. pylori* se unen tanto a los anticuerpos de la placa de ensayo como a los marcados con peroxidasa, formando un complejo tipo "sandwich".

Después de eliminar el conjugado no adherido lavando la placa, se coloca en los pocillos un sustrato incoloro (tetrametilbencidina) que es oxidado por la peroxidasa formando un producto de color azul que virará a amarillo después de añadir una solución de parada de la reacción.

Interpretación: la intensidad de color se determina por espectrofotometría en los 15 minutos siguientes a la interrupción de la reacción, en un lector de placas de microtitulación, con una longitud de onda de 450 nm y de referencia a 620 nm.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se interpretan en función de un umbral ya establecido.

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de las técnicas. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los informes emitidos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Siendo la endoscopia el método de elección para el cultivo y para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de *H. pylori* así como para los hallazgos anatomopatológicos hay circunstancias en las que su realización puede presentar algunas dificultades como la inaccesibilidad de la técnica o el coste económico.

Es en estos casos cuando esta técnica aporta una información muy valiosa por la facilidad de su obtención y conservación de las muestras:

- Se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología.
- No necesita la colaboración del paciente como en el caso de la detección de ureasa por la prueba del aliento por lo que es muy útil en niños pequeños.
- Es útil tanto para el diagnóstico de colonización por *H. pylori* como para el seguimiento después del tratamiento erradicador.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se ha descrito menor sensibilidad y especificidad de la técnica en pacientes con cirrosis.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de antígeno en heces</b>	Fecha: PNT-HP-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

1. Cullen KP, Broderick BM, Javaram J, Flynn B, O'Connor HJ. Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen tests in routine clinical practice. *Ir Med J* 2002; 95:305-306.
2. Kato S, Ozawa K, Okuda M, Fujisawa T, Kagimoto S, Konno M, Maisawa S, Inuma K. Accuracy of stool antigen test for diagnosis of childhood *Helicobacter pylori* infection, a multicenter Japanese study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 296-300.
3. Perri F, Manes G, Neri M, Vaira D, Nardone G. *Helicobacter pylori* antigen tests and 13-C urea breath test in patients after eradication treatments. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2756-2762.

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-HP-04**  
**DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN *Helicobacter pylori***

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA Nº. ....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital ..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este documento pretende ser una guía de los principales métodos utilizados para detectar la resistencia a antimicrobianos en *Helicobacter pylori*: métodos fenotípicos (E-test y difusión con disco).

## 2. FUNDAMENTO

La resistencia a determinados antimicrobianos (metronidazol, claritromicina) es un factor de riesgo de fallo de tratamiento por lo que está recomendado determinar la sensibilidad *in vitro* para elegir el régimen antimicrobiano más apropiado.

Se recomienda determinar la actividad *in vitro* de amoxicilina y tetraciclina por motivos epidemiológicos. También se puede determinar la actividad de otros antimicrobianos que pueden tener utilidad clínica en éste microorganismo (fluoroquinolonas, rifabutina, nitrofurantoina).

Si no se dispone de la sensibilidad *in vitro* antes de iniciar la primera pauta de tratamiento, sí es imprescindible realizarlo cuando ha habido uno o dos fallos. Los métodos fenotípicos tienen la ventaja de que están más estandarizados y sirven para probar cualquier antimicrobiano aunque tienen como desventaja que requiere varios días para la obtención de resultados.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad: la actuación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
- NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 14<sup>th</sup> informational supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S14. NCCLS, Wayne, Pa.

## 4. MUESTRAS

La mayoría de las técnicas de detección de resistencia se realiza sobre el microorganismo cultivado en medios artificiales.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Medios de cultivo: Mueller Hinton agar suplementado con 7% sangre de caballo o carnero.

Discos de antibióticos: claritromicina 15 µg, metronidazol 5 µg, amoxicilina 10 µg, tetraciclina 30 µg.

E-test: claritromicina, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

Neveras

Cabina de microaerofilia, jarras de anaerobiosis o estufa de CO<sup>2</sup>

Cabina de seguridad biológica

Congeladores de -80°C

Asas desechables

Torundas de algodón

## 7. PROCESAMIENTO

Utilizar un cultivo reciente de *H. pylori*, de no más de 4 días, para preparar el inóculo. Resuspender colonias de un cultivo de 2 a 3 días de incubación en solución salina estéril y ajustar a un 3 de la escala de McFarland, e inocular la superficie de una placa con una torunda empapada en esta suspensión. De forma alternativa se puede utilizar una torunda para recoger el cultivo de media placa de agar del microorganismo bien crecido y extenderlo directamente sobre la superficie del medio de cultivo. Se recomienda Mueller-Hinton o Wilkins-Chalgren suplementado con 5-10% de sangre de carnero o caballo.

Después de dejar que se seque el inóculo aplicado se pueden aplicar las tiras de E-test (una por placa de 10 cm) o los discos (no más de 3 discos por placa lo más alejado posible uno de otro).

Las placas se incubarán a 35°C en condiciones de microaerofilia durante 3 a 5 días. Se realizará la lectura a los 3 días de incubación y si no es posible leer con claridad las zonas de inhibición se re-incubará durante 2 días más. Se leerá la CMI por el método de E-test como el punto en el que la zona donde existe inhibición completa del microorganismo cruza con la tira, y en el caso de la técnica de difusión con discos, los halos de inhibición de los discos con los antimicrobianos.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En el caso de los métodos fenotípicos obtendremos un valor de CMI o unos milímetros del halo de inhibición que permitirá clasificar al microorganismo como sensible, resistente o intermedio de acuerdo con la siguiente tabla:

TABLA

Método	E-test			Difusión disco		
	Punto corte (mg/L)			Punto corte (mm)		
	S	I	R	S	I	R
Amoxicilina	<1		>2			
Claritromicina	<0,25	0,5	>1	>19 mm		<18 mm
Tetraciclina	<2		>4			
Metronidazol	<4		>8	>21 mm	16-21 mm	<16 mm

**S: sensible; I: intermedio; R: resistente**



Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de resistencia a          antimicrobianos en <i>H. pylori</i></b>	Fecha: PNT-HP-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

## 9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de las técnicas. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los informes emitidos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La técnica de dilución en agar recomendada por la NCCLS no es aplicable de rutina por lo que se ha descrito el procedimiento de difusión con disco y del E-test basándose en la experiencia de los investigadores que han trabajado en este tema y en la bibliografía recomendada.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Es necesario disponer del microorganismo cultivado y con un inóculo abundante para realizar la sensibilidad a antimicrobianos. Se ha observado una buena correlación clínica entre los resultados obtenidos por las técnicas fenotípicas y la respuesta

a los tratamientos que incluyen claritromicina, sin embargo la correlación en el caso de metronidazol es menor.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. King A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (supl 1):77-80.
2. McNulty C and the PHLS *Helicobacter* Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:601-609.
3. NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 14<sup>th</sup> informational supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S14 (M7). NCCLS, Wayne, Pa.