

Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral

Ester Sepúlveda T.⁽¹⁾, Carlos Briceño Casas C.⁽²⁾, María Loreto Spencer L.⁽¹⁾, Sandra Quilodrán V.⁽³⁾, Ursula Brethauer M.⁽¹⁾, Jessica Moreno H.^(3,4) y Apolinaria García C.⁽³⁾

HELICOBACTER PYLORI DETECTION IN GASTRIC AND ORAL MUCOSA

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection has been related to various gastroduodenal disorders. The objective of this study was to detect *H. pylori* in gastric mucosa and relate it to its presence in the oral cavity. Fifty-four patients with medical indication of digestive endoscopy from the Gastroenterology Unit of the Regional Hospital of Concepción, Chile, were studied. Gastric samples were obtained from each patient from antrum and corpus through endoscopic biopsies. Oral samples were obtained from dental plaque and saliva swabs from the floor of the mouth and the base of the tongue. Oral and gastric sample were studied by culture. Oral samples from patients with positive gastric cultures for *H. pylori* ($n = 21$) were studied by culture, conventional PCR and Real Time PCR. All cultures from oral samples were negative (0/21) for *H. pylori*. Only one sample of dental plaque was positive with conventional PCR (1/21), while all samples of saliva were negative. However, samples from all patients were positive with Real Time PCR (20/21 dental plaque, 21/21 saliva from the floor of the mouth, 20/21 saliva from the base of the tongue). The results suggest that there is a correlation between the presence of *H. pylori* in gastric mucosa and the oral cavity. Also, that Real Time PCR the best technique to detect low number of bacteria in the oral cavity.

Key words: *Helicobacter pylori*, dental plaque, PCR, Real time.

Introducción

La infección por *Helicobacter pylori* se ha vinculado en los últimos años al desarrollo de patologías gástricas tales como gastritis, úlcera péptica y cáncer. La bacteria posee reconocidos factores de virulencia^{1,2} que le permiten adherirse y colonizar la mucosa gástrica de un individuo para ejercer su efecto patógeno³.

Si bien es cierto que actualmente se cono-

cen las características de patogenicidad de este microorganismo, aún no se ha comprobado su vía de transmisión, a pesar de que hay estudios que indican que las vías oral-fecal y oral-oral serían las más importantes⁴.

Existen investigaciones que señalan que la bacteria puede ser encontrada en la cavidad bucal (placa bacteriana, saliva, dorso de la lengua) constituyendo así un reservorio para ella⁵⁻¹³. Otros estudios no están completamente de acuerdo con esta posición^{14,15}. Las investigaciones

⁽¹⁾ Departamento Patología y Diagnóstico, Facultad de Odontología. Universidad de Concepción.

⁽²⁾ Departamento Medicina Interna, Facultad de Medicina. Universidad de Concepción.

⁽³⁾ Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

⁽⁴⁾ Facultad de Medicina Universidad Católica de la Santísima Concepción.

que han establecido una relación entre ambos nichos, sin embargo, no han sido determinantes debido a diversas variables, como la prevalencia del microorganismo, estudios realizados en diferentes grupos poblacionales, pesquisas con diferentes frecuencias de muestreo o diferentes métodos de identificación, lo que hace que los resultados varíen según la sensibilidad y especificidad del método utilizado.

La alta relevancia clínica de la infección por *H. pylori* ha estimulado el desarrollo de numerosos y diversos métodos de diagnóstico. Estos métodos pueden ser clasificados como invasivos; por ejemplo aquellos que requieren una endoscopia digestiva alta para detectar *H. pylori* directamente a partir del cultivo de una biopsia gástrica, histopatología, test de ureasa rápida y PCR o no invasivos: test en aire espirado, serología, detección de *H. pylori* en orina, heces y saliva^{16,17}, los cuales pueden indicar indirectamente la presencia de *H. pylori*¹⁸.

La detección de *H. pylori* en la cavidad oral también es posible mediante técnicas de PCR, pese a la enorme microbiota que se allí se encuentra. El marcador genético más conveniente para la detección de *H. pylori* sería el correspondiente a una región conservada que esté flanqueada por regiones hipervariables. Esta secuencia sería específica para la especie *H. pylori*, no así la detección en base al gen *glmM* (*ureC*), que es específico para el género *Helicobacter*¹⁹.

Los cultivos de muestras orales sólo parecen factibles en pacientes que presentan reflujo gastroesofágico el que aumenta la probabilidad de encontrar *H. pylori* en la cavidad oral, en su forma espiralada y cultivable, ya que normalmente, esta bacteria podría estar inhibida en la cavidad oral por la presencia de otros microorganismos como *Lactobacillus* spp²⁰ y microorganismos de los géneros *Fusobacterium* y *Porphyromonas*²¹.

La técnica de PCR en tiempo real tiene la ventaja de definir límites dentro de la epidemiología, ya que detecta concentraciones mil veces menores que la técnica de PCR convencional. Esto podría ayudar a determinar inóculos de infección, y, por lo tanto, indicar posibles vías de transmisión.

En base a estos antecedentes nos parece

interesante establecer la posibilidad de inferir la infección gástrica mediante la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral en pacientes dispepticos, mediante PCR Convencional y PCR en Tiempo Real.

El objetivo general fue determinar la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral de pacientes con cultivo positivo para *H. pylori* en biopsia gástrica.

Material y Métodos

El universo estuvo constituido por pacientes que acudieron a la Unidad de Gastroenterología del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente de la ciudad de Concepción, Chile, a realizarse Endoscopia Digestiva Alta (EDA) por indicación médica. Se excluyeron pacientes que estuvieran en tratamiento de erradicación de la bacteria. La muestra estuvo constituida por aquellos pacientes que presentaron cultivo positivo para *H. pylori* en la mucosa gástrica. A todos se les solicitó consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, Chile. Para cada paciente se confeccionó una ficha con datos generales y bucales.

De cada uno de ellos se obtuvo: 3 muestras bucales (placa bacteriana del área subgingival, saliva de la base de la lengua y del piso de boca). Durante la realización de la EDA, de cada uno de ellos se obtuvo 4 muestras de mucosa gástrica del antro y 4 del cuerpo. Tanto las muestras de mucosa gástrica, como las muestras orales fueron sembradas para cultivo en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de caballo y suplemento antibiótico DENT para inhibir la microbiota acompañante. Los cultivos se realizaron en condiciones de microaerofilia generada mediante el sistema GasPak, durante 4 días, a 37° C²². Las muestras gástricas de los pacientes que presentaron cultivos positivos para *H. pylori* y las muestras orales de estos pacientes, fueron sometidas a análisis de la reacción de PCR convencional y tiempo real mediante la amplificación de una región del gen 16 - 23S rDNA, especie específico.

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de la cepa de bacterias ATCC 43504 cultivada de la manera tradicional se utilizó el protocolo utilizado por Dowsett et al²³. En muestras orales se realizó mediante el kit *BIO 101 Protocol Fast DNA kit*, *Catalog 6540-400*, siguiendo las indicaciones de los proveedores y en muestras de biopsias gástricas se utilizó un Kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System, Promega).

Condiciones de PCR

Los partidores y sonda para *H. pylori 16S rRNA*, (Yamazaki et al, 2005) y utilizados para el PCR de Tiempo Real (Ruskovics et al, 2001) fueron verificados teóricamente usando el programa "OLIGO ver 6.62" (Tabla 1).

a) Condiciones para PCR convencional

Preparación de la mezcla: La amplifica-

ción por PCR simple fue realizada para los genes descritos en la Tabla 1 utilizando 10 µL de ADN total, 2,5 µL de amortiguador (10X), 0,5 µL dNTPs (10 mM), 1,25 µL MgCl (50 mM), 1,25 µL del partidador directo y 1,25 µL del inverso, 0,125 µL de la enzima *Taq DNA polimerasa* (500 U) y completar con agua estéril sin nucleasas en un volumen final de 25 µL.

Programación del equipo: Se realizó una amplificación en termociclador de gradiente para elegir la Tm adecuada para maximizar la optimización del Tiempo Real (Tabla 2).

Como controles negativos de amplificación se utilizó agua y ADN de *lactobacillus* spp; como controles positivos se usó productos de amplificación de ADN genómico de las cepas *H. pylori* ATCC 43504 o los productos de PCR. El análisis se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% (p/v) y TBE al 1% agregando Bromuro de Etidio para su visualización en transiluminador UV. Los geles fueron cargados con 9 µL de producto de PCR.

Tabla 1. Partidores utilizados y tamaño de los productos de amplificación

Nombre	Secuencia 5'-3'	Acceso NCBI	posición	producto	Referencia
16SrRNA HpTR Directo	TGC GAA GTG GAG CCA ATC TT	U00679	1381 1480	119	Yamazaki et al., 2005
16SrRNA HpTR Inverso	GGA ACG TAT TCA CCG CAA CA				
Sonda 16SrRNA	(FAM) CCT CTC AGT TCG GAT TGT AGG CTG CAA C (TAMRA)	U00679	1408 1435	27	Yamazaki et al., 2005

Tabla 2. Condiciones para PCR convencional

Programa	Parámetro	Tiempo	Temperatura °C	Nº Ciclos
1	Preincubación	15 minutos	95	1
2	Denaturación	30 segundos	95	1
2 Gradiente	Alineamiento	30 segundos	50 a 60	40 a 45
2	Extensión	2 minutos	72	1
3	Extensión	5 minutos	72	1
4	Enfriamiento	Hold on	4	1

b) Condiciones para PCR de tiempo Real LightCycler 2.0 (Roche) con Sonda TaqMan

La preparación de la mezcla master (Master Mix TaqMan) para PCR en tiempo real según las recomendaciones del kit lleva las siguientes cantidades: 4 μ L de MIX, 9,1 μ L de H₂O Grado PCR, 0,5 μ L de Sonda TAQMAN 10 μ M, 0,7 μ L de Partidor 16S directo 10 μ M, 0,7 μ L de Partidor 16S inverso 10 mM y 5 μ L de ADN templado de la muestra.

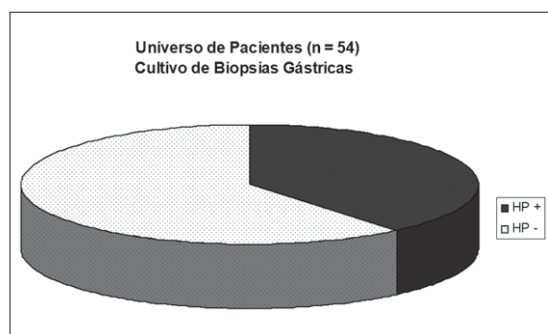


Figura 1. Detección de *H. pylori* en Biopsias de Mucosa Gástrica mediante la técnica de Cultivo. El gráfico circular representa el universo de pacientes (54) en el que se detectó la presencia de HP en muestras de biopsia de mucosa gástrica. El color negro representa a las muestras que resultaron positivas (n = 21; 39%) para *H. pylori* (HP+). El área punteada representa a los que resultaron negativos (n = 33; 61%) para *H. pylori* (HP-).

Programa de amplificación para el gen 16rS: Temperatura de denaturación a 95 °C, tiempo de pre-incubación: 10 minutos, tiempo de denaturación: 10 segundos, temperatura de alineamiento: 55 °C, tiempo de alineamiento: 10 segundos, temperatura de elongación: 72°, tiempo de elongación: 8 segundos

Resultados

Se estudiaron 54 pacientes, 31 de sexo femenino y 23 de sexo masculino (rango = 12-82 años, $\bar{x}$ = 51,18 años). Al someter las muestras de biopsias gástricas a cultivo, se detectó *H. pylori* en el 39% de los pacientes (n = 21) (Figura 1). Las muestras de los pacientes que presentaron positividad en la mucosa gástrica por cultivo, se verificaron genéticamente mediante PCR convencional. Los resultados obtenidos para las muestras orales de los 21 pacientes, que presentaron cultivos de biopsia gástrica positivos para *H. pylori*, fueron: cultivo 100% negativos (0/21) (Figura 2), con PCR convencional se detectó *H. pylori* sólo en una muestra (de las 3 de un paciente) en placa bacteriana (1/21) (Figura 2), mientras que todas las muestras de saliva de piso de boca y base de la lengua fueron negativas. Veintiún pacientes resultaron positivos para la bacteria por la técnica de PCR de Tiempo Real en las muestras orales (Figura 2): 20/21 en muestras

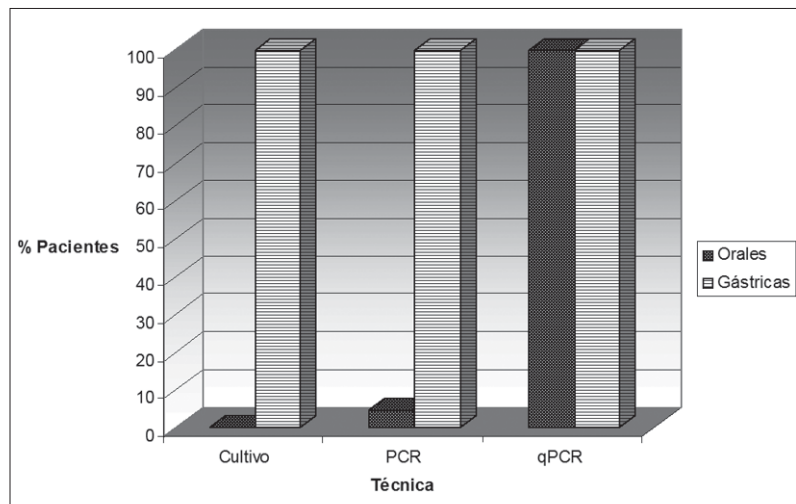


Figura 2. Detección *H. pylori* en Muestras de Cavidad Oral y Gástrica mediante Cultivo, PCR y qPCR. En el gráfico se comparan 3 técnicas de detección para *H. pylori*. A la izquierda por Cultivo, en el centro por PCR Convencional (PCR) y a la derecha por PCR en Tiempo Real (qPCR). Las columnas achuradas con puntos representan la detección positiva para *H. pylori* en muestras orales y las achuradas con líneas horizontales la detección positiva para *H. pylori* en muestras de mucosa gástrica.

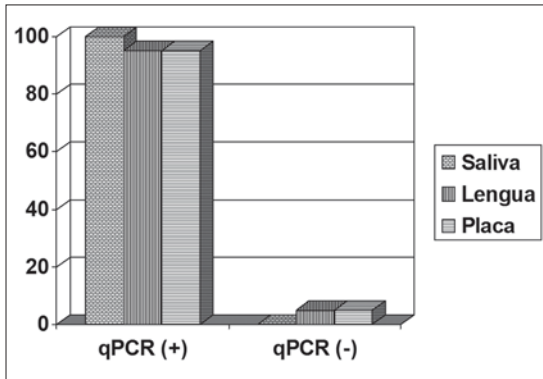


Figura 3. Distribución de *H. pylori* orales por PCR de Tiempo Real (qPCR). Las columnas de la izquierda representan la detección por PCR de Tiempo Real (qPCR) positiva cualitativa y cuantitativa de *H. pylori*. La barra achurada con ladrillos son las muestras del ADN humano extraído de saliva; achurada vertical, de la base de lengua; achurada horizontal, la placa bacteriana. Las columnas de la derecha representan las muestras en las que no se logró detectar *H. pylori*.

de placa bacteriana, 21/21 en saliva de piso de boca y 20/21 en base de lengua (Figura 3).

Discusión

Este estudio estuvo enfocado a estudiar la presencia concomitante de *H. pylori* en la mucosa gástrica y en la cavidad bucal. No encontramos en la literatura información de determinación de *H. pylori* en la cavidad oral mediante PCR tiempo real por lo que pensamos que el estudio es un aporte novedoso.

Diversos estudios apuntan hacia la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral en relación con la mucosa gástrica en porcentajes variables (6,9-100%) de acuerdo a la población estudiada, toma de muestras ó técnicas de detección empleadas.

Kim et al⁵, reportaron un 6,9% de *H. pylori* en saliva y 28,6% en placa bacteriana mediante PCR. Song et al⁶, detectaron *H. pylori* en el 100% mediante PCR, pero las secuencias del ADN diferían entre las distintas ubicaciones orales y las muestras gástricas. En otro trabajo Song et al²⁴, concluyeron que el microorganismo estaba presente en el 97% de los pacientes analizados con una distribución ca-

racterística de 82% en placa bacteriana (64% en zona de molares y 59% en premolares). Mapstone et al²⁵, concluyeron que la presencia del microorganismo en la boca de pacientes dispépticos tiene relevancia para la diseminación de *H. pylori* e identifica una fuente potencial de reinfección posterior a la erradicación del microorganismo del estómago. Krajden et al⁷, estudiaron biopsias gástricas. El 40,8% de ellos fue positivo para *H. pylori* a través del cultivo, en saliva fueron todas negativas y en placa bacteriana sólo una fue positiva.

Shames et al¹⁰, demostraron la correspondencia genética en una cepa en mucosa gástrica y en la placa bacteriana dental. Berroteran et al²⁶, determinaron que todos los pacientes positivos para *H. pylori* en la placa bacteriana dental presentaron gastritis crónica.

Karczevska et al¹⁵, concluyeron que *H. pylori* es comúnmente detectado en la cavidad oral de pacientes con dispepsia. Ozdemir et al¹³, estudiaron 63 pacientes con gastritis crónica en donde el microorganismo *H. pylori* fue erradicado de la mucosa gástrica pero no de la placa bacteriana ni de la saliva, concluyendo entonces que *H. pylori* de estos dos últimos habitats jugarían un rol importante en el proceso de la reinfección.

En nuestro estudio podríamos explicarnos el cultivo negativo de *H. pylori* en las muestras orales debido a que no se utilizó la metodología de cultivo como señala Song et al²⁷, lo que puede explicar la baja sensibilidad del método utilizado en este estudio. Además, pudo haber existido falsos negativos (forma cocoide no cultivable o forma espiralada, cultivable, inhibida por la microbiota acompañante oral), inóculo insuficiente, ausencia de *H. pylori* o falla en la toma o traslado de la muestra.

El resultado negativo para la técnica PCR convencional podría explicarse por: baja sensibilidad del método, inóculo insuficiente para generar cantidad adecuada de ADN, ausencia de *H. pylori*, falla en la toma ó traslado de la muestra ó falla en la aplicación de la técnica.

Si comparamos los métodos, la técnica de PCR tiene una muy buena sensibilidad (> 94%) y una especificidad de un 100% que la hace ser superior a otros métodos como IgG sérica

(sensibilidad 94%, especificidad 98%), test de ureasa (sensibilidad 78%, especificidad 96%), cultivo (sensibilidad 70%, especificidad 98%), Western blotting (sensibilidad 96%, especificidad 93%) o a los métodos basados en anticuerpos, ya sean mono o policlonales, (sensibilidad entre 58-96%, sensibilidad $\geq 90\%$ ^{28,29}.

La desventaja de las técnicas de PCR es que no define si el microorganismo detectado es o no viable, por lo que siempre debe ser guiado en paralelo con el cultivo de la biopsia gástrica.

Estamos concientes del limitado número de pacientes incluidos en el estudio, sin embargo este trabajo podría servir de partida a nuevos y más amplios estudios que avalen la relación entre ambos nichos para la bacteria, con el fin de poder sospechar de una infección gástrica mediante la detección del microorganismo en la cavidad oral con el consiguiente beneficio para la prevención de patologías gástricas asociadas a la presencia de *H. pylori*.

Con nuestros resultados podríamos concluir que: existe correlación en la presencia de *H. pylori* en mucosa gástrica y oral, no habría diferencias en el hallazgo de *H. pylori* en las distintas zonas de la cavidad bucal y que la técnica PCR tiempo real sería la técnica más adecuada para detectar baja cantidad de *H. pylori* oral.

Como proyecciones pensamos sería interesante realizar un estudio del genotipo asociado a virulencia de *H. pylori* en muestras gástricas y orales.

Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* está vinculada a diversas patologías gastroduodenales. El objetivo de este estudio fue detectar *H. pylori* en la mucosa gástrica y relacionar su presencia con *H. pylori* en la cavidad oral. Se estudiaron 54 pacientes de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Regional de Concepción, con indicación de endoscopia digestiva alta. Para cada paciente se realizó biopsia de mucosa gástrica (antro y cuerpo), y se obtuvieron 3 muestras orales (placa bacteriana, saliva de la base de la lengua y piso de boca). Las muestras gástricas y orales fueron culti-

vadas. Las muestras orales de los pacientes que presentaron cultivos de biopsia gástrica positivos para *H. pylori* (n = 21) fueron sometidas a análisis de detección de la bacteria mediante cultivo, PCR convencional y PCR de Tiempo Real. Los resultados obtenidos para las muestras orales fueron: cultivo 100% negativos (0/21), con PCR convencional se detectó *H. pylori* sólo en un paciente (una muestra de las 3 en placa bacteriana) (1/21), mientras que todas las muestras de saliva de piso de boca y base de la lengua fueron negativas. Veintiún pacientes resultaron positivos para la bacteria por la técnica de PCR de Tiempo Real en las muestras orales, 20/21 en muestras de placa bacteriana, 21/21 en saliva de piso de boca y 20/21 en base de lengua. Los resultados sugieren que existe correlación entre la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica y en la cavidad oral. Además, que la técnica de PCR de Tiempo Real es la más adecuada para detectar el bajo número de bacterias de *H. pylori* de la cavidad oral.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, placa bacteriana, PCR, tiempo real.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por los Proyectos DIUC N° 206.103.017-1.0 y Fondef N° D03i1105.

Bibliografías

- 1.- Marais A, Mendz G L, Hazell S L, Mégraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. Microbiol Mol Biol Reviews 1999; 63: 642-674.
- 2.- Ding Y H, Zhang S P, Tomb J F, Ferry J G. Genomic and proteomic analyses reveal multiple homologs of genes encoding enzymes of the methanol:coenzyme M methyltransferase system that are differentially expressed in methanol- and acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. FEMS Microbiology Letters 2002; 215: 127-132.
- 3.- Amieva M and El-Omar E. Host Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. Gastroenterology 2008; 134: 306-323.
- 4.- Dunn BE, Cohen H, Blaser M J. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews 1997; 10: 720-741.
- 5.- Kim N, Lim S H, Lee K H, You J Y, Kim J M, Lee

- N R, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva. Korean J Intern Med 2000; 15: 187-194.
- 6.- Song Q, Spahr A, Schmid R M, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. Dig Dis Sci 2000; 45: 2162-2167.
 - 7.- Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, et al. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1989; 27: 1397-1398.
 - 8.- Majmudar P, Shah S M, Dhunjibhoy K R, Desai H G. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. Indian J Gastroenterol 1990; 9: 271-272.
 - 9.- Desai H G, Gill H H, Shankaran K, Mehta P R, Prabhu S R. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol 1991; 26: 1205-1208.
 - 10.- Shames B, Krajden S, Fuksa M, Babida C, Penner J L. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter Pylori* in the stomach and dental plaque. J Clin Microbiol 1989; 27: 2849-2850.
 - 11.- Hu W, Cao C, Meng H, Zhang J, Ma D, Zhang L. Detection and analysis of *Helicobacter pylori* in oral cavity and stomach from chronic gastritis patients. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2002; 82: 1037-1041.
 - 12.- Allaker R P, Young K A, Hardie J M, Domizio P, Meadows N J. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. J Med Microbiol 2002; 51: 321-327.
 - 13.- Ozdemir A, Mas M R, Sahin S, Saglamkaya U. Detection of *Helicobacter pylori* colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. Quintessence International 2002; 32: 131-134.
 - 14.- Cheng L H H, Webberley M, Evans M, Hanson N, Brown R. *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996; 81: 421-423.
 - 15.- Karczewska E, Konturek J E, Konturek P C, Czesnikiewicz M, Sito E, Bielanski W, et al. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci 2002; 47: 978-986.
 - 16.- Welsh J, Peterson W L. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. New England Journal of Medicine 1995; 333: 984-991.
 - 17.- Davies R, Crabbe D, Roderick P, Goddard J, Raftery J, Patel P. A simulation to evaluate screening of *Helicobacter pylori* infection in the prevention of peptic ulcer and gastric cancers. Health Care Management Science 2002; 5: 249-258.
 - 18.- Monteiro L, Gras N, Megraud F. Magnetic immune-PCR- assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. J Clin Microbiol 2001; 39: 3778-3780.
 - 19.- Shahamat M, Alavi M, Watts J E M, González J M, Sowers K R, Maeder D W, et al. Development of two PCR-Based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2004; 42: 3613-3619.
 - 20.- Coconnier M H, Lievin V, Hemery E, Servin A L. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strains LB. Applied and Environmental Microbiology 1998; 64: 4573-4580.
 - 21.- Okuda K, Kimizuka R, Katakura A, Nakagawa T, Ishihara K. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. J Periodontol 2003; 74: 123-128.
 - 22.- Gilbert J, Ramakrishna J, Sunderman F W, Wright A, Plut A. Protein Hpn: Cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. Infect Immun 1995; 63: 2682-2688.
 - 23.- Dowsett S A, Archila L, Segreto V A, González C R, Silva A, Vastola K A, et al. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral and fingernail carriage. J Clin Microbiol 1999; 37: 2456-2460.
 - 24.- Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. J Med Microbiol 2000; 49: 349-353.
 - 25.- Mapstone N P, Lynch D A, Lewis F A, Axon A T, Tompkins D S, Dixon M F, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993; 46: 540-543.
 - 26.- Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazzi C, Goncalvez R, et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. J Med Microbiol 2002; 51: 764-770.
 - 27.- Song Q, Zirstein G W, Swaminathan B, Gold B D. Pretreatment with urea-hydrochloric acid enhances the isolation of *Helicobacter pylori* from contaminated specimens. J Clin Microbiol 2001; 39: 1967-1968.
 - 28.- Krogfelt K, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2005; 10: 5-13.
 - 29.- Elitsur Y. *Helicobacter pylori* diagnostic tools: is it in the stools? The Journal of Pediatrics 2005; 146: 164-167.

Correspondencia a:
Dra. Ester Sepúlveda Tebache
E-mail: esepulve@udec.cl