

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



TESIS DOCTORAL

**Características del microbioma gástrico e
intestinal en relación al estado de *Helicobacter
pylori* en una población pediátrica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Llorca Otero

DIRECTORES

**Teresa Alarcón Rivero
Manuel López-Brea Calvo
Ángela Gómez Alférez**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Características del microbioma gástrico e
intestinal en relación al estado de
Helicobacter pylori en una población
pediátrica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Llorca Otero

Directores

Teresa Alarcón Cavero

Manuel López-Brea Calvo

Ángela Gómez Alférez

Madrid, 2016

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología

**Características del microbioma
gástrico e intestinal en relación al
estado de *Helicobacter pylori* en una
población pediátrica**

Tesis Doctoral

Laura Llorca Otero

Madrid 2016

Teresa Alarcón Cavero, Doctora en Ciencias Biológicas, Facultativo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa y Profesora Asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Manuel López-Brea Calvo, Doctor en Medicina, ex Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa y ex Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Ángela Gómez Alférez, Doctora en Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Profesora Titular de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Características del microbioma gástrico e intestinal en relación al estado de *Helicobacter pylori* en una población pediátrica**” realizada por Laura Llorca Otero para optar al Grado de Doctor en Microbiología y Parasitología, ha sido desarrollada bajo mi dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Para que así conste, se expide le presente certificado.

Madrid, 3 de Febrero del 2016

Fdo: Dra Teresa Alarcón Cavero

Fdo: Dr. Manuel López-Brea Calvo

Fdo: Dra Ángela Gómez Alférez

**Los que creen en lo imposible,
son los más felices.**

Emilia Escolano

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a los Directores de esta Tesis. A la Dra. Teresa Alarcón, la persona que más me ha ayudado a conseguir este objetivo. Su esfuerzo y su paciencia inagotables, su forma de buscar siempre el lado bueno de las cosas, su constante apoyo, y por supuesto su mente prodigiosa, han hecho que además de ser mi Directora de tesis sea mi amiga y mi modelo profesional a seguir. Al Dr. López-Brea quiero agradecerle haberme inculcado tanto interés por este microorganismo y haberme dado la oportunidad, entre consejos y refranes, de completar mi formación con este proyecto. A la Dra. Ángela Gómez Alférez, le agradezco su continua colaboración y su total disposición para ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Guillermo Pérez Pérez, le quiero agradecer muy sinceramente todo su apoyo tanto a nivel profesional como personal, por acogerme tan cariñosamente en su Laboratorio. Sin su ayuda, su motivación, su confianza y sus ideas hoy no estaría escribiendo estas líneas. Mi estancia en Nueva York hizo posible la realización de este trabajo, y sin él no habría sido posible. También quiero agradecer a Tadasu y al resto de compañeros, quienes me ofrecieron su ayuda y su amistad.

A todo el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa, por haberme acogido con tanto afecto. Al Dr. Diego Domingo, por ser la alegría en persona y siempre un gran apoyo. Al Dr. Ventura por aportar esa tranquilidad tan necesaria. A la Dra. Laura Cardeñoso por confiar en mí, y darme la oportunidad de trabajar en este gran Servicio. A todos los técnicos del Servicio, por hacer fácil lo difícil, y por su continua colaboración y ayuda. A los residentes, o como yo les llamo “mi familia madrileña”, por hacer que la residencia haya sido una de las

etapas más bonitas de mi vida. Gracias mis princesitas, por tantos ratos juntas, y los que nos quedan. En especial, a Ana Blanco, que desde que se unió al “equipo microbiómico” me ha ayudado mucho con este trabajo, además de haber sido amiga del alma.

A mis farmacéuticas y mis “maristeñas”, por ser tan buenas amigas, por preocuparos siempre, por apoyarme siempre, por animarme y por consolarme, por darme tanto, por desprender tanta vida, y volar siempre a mi lado.

Quiero agradecer de corazón a mi familia. A mis padres, por ser mis consejeros, por vuestro apoyo, esfuerzo y dedicación absoluta y por confiar siempre en mí. A mis hermanos, los cómplices de mi vida a los que tanto quiero, gracias por todo, por ser mis mejores amigos, por estar siempre a mi lado y darme tanto, tanto cariño. A mis cuñadas y mis suegros, por estar en mi vida y ser tan especiales. A mis vallisoletanos y mis valencianos por vuestra preocupación constante y vuestro cariño. Sentirse querida ha sido mi fuente de inspiración.

Por último, el mayor de los agradecimientos para mi marido, Tomy. Gracias por tanto, gracias por tu apoyo incondicional, por tanto amor que me das, por sacarme siempre una sonrisa. Por llenarme la vida de ilusiones y alegrías, por tu comprensión y por tu energía. Por ser siempre mi persona favorita en el mundo. Por cumplir sueños conmigo y por seguir soñando juntos.

A todos y cada uno de vosotros GRACIAS. Esta tesis es también un poquito vuestra.

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. SUMMARY	6
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.1.1. Antecedentes históricos	11
3.1.2. Características microbiológicas	14
3.1.3. Patogenia y factores de virulencia	16
3.1.4. Epidemiología	25
3.1.5. Manifestaciones clínicas	27
3.1.6. Métodos diagnósticos	37
3.1.7. Tratamiento	45
3.1.8. Detección de resistencias	53
3.2. Microbioma	56
3.2.1. Generalidades	56
3.2.2. Microbioma oral	59
3.2.3. Microbioma esofágico	60
3.2.4. Microbioma gástrico	61
3.2.5. Microbioma intestinal	61
3.2.6. Evolución de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo	63
3.2.7. Técnicas de estudio de microbioma: Metagenómica	64
3.2.8. Análisis bioinformático de los datos	66
3.2.9. Medidas de la diversidad	68
3.2.10. Composición taxonómica de las comunidades microbianas	69
3.2.11. Heatmap	69
3.2.12. LEfSe (LDA Effect Size)	69
3.2.13. PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States)	70

4. OBJETIVOS	72
5. MATERIAL Y MÉTODOS	75
5.1. Selección de pacientes y muestras	75
5.2. Transporte de las muestras	76
5.3. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico de <i>H. pylori</i>	76
5.3.1. Test rápido de la ureasa (TRU)	76
5.3.2. Cultivo	76
5.3.3. Histología	77
5.3.4. PCR cuantitativa específica para <i>H. pylori</i>	78
5.4. Estudio fenotípico de la sensibilidad	79
5.5. Extracción de ADN	80
5.5.1. Extracción de ADN a partir de biopsias gástricas	80
5.5.2. Extracción de ADN a partir de los exudados rectales	81
5.5.3. Determinación de la concentración del ADN	82
5.6. Detección del gen <i>cagA</i>	83
5.7. Estudio de la densidad bacteriana mediante PCR cuantitativa a tiempo real	84
5.7.1. Densidad de <i>H. pylori</i>	84
5.7.2. Densidad de bacterias totales	85
5.8. Secuenciación de alto rendimiento	86
5.8.1. Preparación de la librería de amplicones	86
5.8.2. Cuantificación de la concentración de ADN de los amplicones	87
5.8.3. Preparación del pool de amplicones	88
5.8.4. Purificación del pool de amplicones	89
5.8.5. Cuantificación del ADN tras la purificación del pool de amplicones	89
5.8.6. Combinación de múltiples pooles para secuenciación	90
5.8.7. Secuenciación	90
5.9. Análisis bioinformático	90

5.10. Estimación de la diversidad microbiana	91
5.11. Análisis taxonómico	92
5.12. Heatmap	92
5.13. LEfse	92
5.14. Predicción metagenómica de las comunidades microbianas con PICRUST	93
6. RESULTADOS	95
6.1. Datos generales de los pacientes estudiados	95
6.2. Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	99
6.2.1. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> por el test rápido de la ureasa	102
6.2.2. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> por cultivo	102
6.2.3. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> por histología	103
6.2.4. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> por PCR cuantitativa	103
6.2.5. Resumen de métodos diagnósticos de <i>H. pylori</i>	105
6.3. Características clínico-demográficas de los pacientes en función del estado de <i>H. pylori</i>	107
6.4. Resistencia antibiótica	108
6.5. Detección del gen <i>cagA</i>	109
6.6. Densidad bacteriana	110
6.6.1. Densidad bacteriana en función del estado de <i>H. pylori</i>	111
6.7. Estudio del microbioma gástrico mediante secuenciación masiva	111
6.7.1. Estudio de la alfa diversidad en muestras gástricas	112
6.7.2. Estudio de la beta diversidad en las biopsias gástricas	119
6.7.3. Análisis taxonómico de las comunidades microbianas gástricas	124
6.7.4. Heatmap de las biopsias gástricas	132
6.7.5. LEfSe (LDA effect size analysis)	133
6.7.6. Predicción metagenómica de las comunidades microbianas con PICRUST	137

6.8. Microbioma de exudados rectales analizado mediante secuenciación de alto rendimiento	139
6.8.1. Estudio de la alfa diversidad en las muestras rectales	139
6.8.2. Estudio de la beta diversidad en las muestras rectales	146
6.8.3. Análisis taxonómico de las comunidades microbianas intestinales	148
6.8.4. Heatmap de los exudados rectales	154
6.8.5. LEfSe (LDA effect size analysis)	155
6.9. Estudio de la diversidad microbiana entre los dos tipos de muestras	156
6.10. Análisis taxonómico en función del tipo de muestra	159
7. DISCUSIÓN	163
7.1. Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	163
7.2. Características clínico-demográficas de los pacientes en función del estado de <i>H. pylori</i>	165
7.3. Microbioma gástrico	166
7.4. Microbioma intestinal	173
8. CONCLUSIONES	177
9. BIBLIOGRAFÍA	181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones extraintestinales asociadas a <i>H. pylori</i>	31
Tabla 2. Pautas para el tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i> en adultos	47
Tabla 3. Pautas para el tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i> en niños	48
Tabla 4. Puntos de corte según EUCAST	79
Tabla 5. Resumen de las características clínico-demográficas de los pacientes del estudio	95
Tabla 6. Características clínico-demográficas de los 51 pacientes	98
Tabla 7. Resultado de los distintos métodos diagnósticos	101
Tabla 8. Resultados obtenidos con el Test Rápido de la Ureasa	102
Tabla 9. Resultados obtenidos con el cultivo	102
Tabla 10. Resultados obtenidos con el examen histológico	103
Tabla 11. Resultados obtenidos con la PCR cuantitativa	103
Tabla 12. Especificidad y sensibilidad obtenida al utilizar cada Cp como criterio de positividad para <i>H. pylori</i>	104
Tabla 13. Muestras con métodos diagnósticos discrepantes	105
Tabla 14. Características clínico-demográficas en función del estado de <i>H. pylori</i>	107
Tabla 15. Número y porcentaje de cepas sensibles y resistentes a los 6 antibióticos probados	109
Tabla 16. Copias de ADN de <i>H. pylori</i> y de bacterias totales en las biopsias gástricas y en exudados rectales	110
Tabla 17. Copias de ADN de <i>H. pylori</i> y de bacterias totales en función del estado de <i>H. pylori</i>	111
Tabla 18. Número máximo, mínimo y media de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva del ADN en biopsias gástricas	111
Tabla 19. Índice Shannon en función del estado de <i>H. pylori</i>	114
Tabla 20. Porcentaje de abundancia relativa del género <i>Helicobacter</i> en pacientes positivos y negativos	131
Tabla 21. Número máximo, mínimo y media de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva del ADN en exudados rectales	139
Tabla 22. Número de secuencias obtenidas tras secuenciación masiva del ADN en función del tipo de muestra	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pruebas características de <i>H. pylori</i> : Ureasa, oxidasa y catalasa	15
Figura 3. Aspecto de las colonias en medio de cultivo Agar sangre	40
Figura 4. Fundamento de la prueba del aliento con urea marcada con ¹³ C	43
Figura 5. Determinación de la sensibilidad de <i>H. pylori</i> por el método del epsilómetro	54
Figura 6. Distribución de los filos bacterianos más abundantes en los distintos sitios anatómicos del cuerpo humano	56
Figura 8. Curva ROC obtenida con cada Cp	104
Figura 9. Resultados obtenidos con los distintos métodos diagnósticos	105
Figura 10. Comparación del método TRU con la PCR cuantitativa	106
Figura 11. Porcentaje de aislamientos de <i>H. pylori cagA</i> +	109
Figura 12. Alfa diversidad de las 51 muestras gástricas incluidas en el estudio en función del número de especies observadas	112
Figura 13. Alfa diversidad gástrica en función del estado de <i>H. pylori</i> representando el número de especies observadas	113
Figura 14. Alfa diversidad gástrica en función del estado de <i>H. pylori</i> representando la distancia filogenética	114
Figura 15. Alfa diversidad en función de los resultados histológicos representando el número de especies observadas	115
Figura 16. Alfa diversidad en los grupos de pacientes con gastritis superficial activa y con gastritis superficial no activa, representando el número de especies observadas	116
Figura 17. Alfa diversidad en función del tratamiento previo recibido representando la distancia filogenética	117
Figura 18. Alfa diversidad gástrica en función del tipo de parto representando el número de especies observadas	118
Figura 19. Alfa diversidad gástrica en función de la nacionalidad representando el número de especies observadas	119
Figura 20. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> . PC1 vs PC2	120

Figura 21. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> PC3 vs PC2	120
Figura 22. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> PC1 vs PC3	120
Figura 23. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> . PC1 vs PC2	121
Figura 24. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> PC3 vs PC2	121
Figura 25. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de <i>H. pylori</i> PC1 vs PC3	121
Figura 26. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función de la presencia de gastritis superficial activa o no activa	122
Figura 27. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función de la presencia de gastritis activa o no activa	122
Figura 28. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función del tratamiento previo recibido	123
Figura 29. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función del tratamiento previo recibido	123
Figura 30. Asignación taxonómica a nivel de phylum de las 51 biopsias gástricas	124
Figura 31. Análisis taxonómico a nivel de phylum en función del estado de <i>H. pylori</i>	125
Figura 32. Análisis taxonómico a nivel de clase en función del estado de <i>H. pylori</i>	126
Figura 33. Análisis taxonómico a nivel de orden en función del estado de <i>H. pylori</i>	127
Figura 34. Análisis taxonómico a nivel de familia en función del estado de <i>H. pylori</i>	128
Figura 35. Análisis taxonómico a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i>	129
Figura 36. Análisis taxonómico a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i> , sustrayendo las secuencias del género <i>Helicobacter</i>	130
Figura 37. Heatmap biopsias gástricas	132
Figura 38. Análisis LEfSe a nivel de phylum (histograma y cladograma) en función del estado de <i>H. pylori</i>	133
Figura 39. Análisis LEfSe (histograma y cladograma) a nivel de clase en función del estado de <i>H. pylori</i>	134
Figura 40. Cladograma en función del estado de <i>H. pylori</i> a nivel de género	135
Figura 44. Alfa diversidad de los 51 exudados rectales incluidos en el estudio en función del número de especies observadas	139

Figura 45. Alfa diversidad intestinal en función del estado de <i>H. pylori</i> representando el número de especies observadas	140
Figura 46. Alfa diversidad intestinal en función del estado de <i>H. pylori</i> representando la distancia filogenética	141
Figura 47. Alfa diversidad intestinal en función de los resultados histológicos representando el número de especies observadas	142
Figura 48. Alfa diversidad intestinal en función de la presencia de gastritis superficial activa o no activa representando la distancia filogenética	143
Figura 49. Alfa diversidad intestinal en función del tipo de parto representando el número de especies observadas	144
Figura 50. Alfa diversidad intestinal en función de la nacionalidad representando el número de especies observadas	145
Figura 51. Análisis cuantitativo de la beta diversidad intestinal en función del estado de <i>H. pylori</i>	146
Figura 52. Análisis cualitativo de la beta diversidad intestinal en función del estado de <i>H. pylori</i>	146
Figura 53. Análisis taxonómico a nivel de phylum de los 51 exudados rectales	148
Figura 54. Asignación taxonómica a nivel de phylum en función del estado de <i>H. pylori</i>	149
Figura 55. Asignación taxonómica a nivel de clase en función del estado de <i>H. pylori</i>	150
Figura 56. Asignación taxonómica a nivel de orden en función del estado de <i>H. pylori</i>	151
Figura 57. Asignación taxonómica a nivel de familia en función del estado de <i>H. pylori</i>	152
Figura 58. Asignación taxonómica a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i>	153
Figura 59. Heatmap a nivel de género de la microbiota intestinal	154
Figura 60. Análisis LEfSe a nivel de phylum en función del estado de <i>H. pylori</i>	155
Figura 61. Análisis LEfSe a nivel de género en función del estado de <i>H. pylori</i>	155
Figura 62. Alfa diversidad en función del tipo de muestra representando la distancia filogenética	157
Figura 63. Alfa diversidad en función del tipo de muestra representando las especies observadas	157
Figura 64. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función del tipo de muestra	158
Figura 65. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función del tipo de muestra	158

Figura 66. Asignación taxonómica a nivel de phylum en función del tipo de muestra	159
Figura 67. Asignación taxonómica a nivel de clase en función del tipo de muestra	160
Figura 68. Asignación taxonómica a nivel de orden en función del tipo de muestra	160
Figura 69. Asignación taxonómica a nivel de familia en función del tipo de muestra	161

RESUMEN

1. RESUMEN

Introducción

H. pylori es una bacteria Gram negativa con forma de espiral, que coloniza el estómago humano de aproximadamente 50% de la población mundial. La infección por *H. pylori* está estrechamente asociada con la aparición de gastritis crónica, úlcera péptica, y el desarrollo de cáncer gástrico.

La colonización estable de *H. pylori* en el estómago sugiere que otras bacterias también pueden haber sido capaces de adaptarse al entorno ácido del estómago. Las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN nos permiten entender mejor la composición de nuestro microbioma.

El objetivo principal de este estudio es caracterizar y comparar la microbiota gástrica e intestinal en pacientes pediátricos infectados o no por *H. pylori*.

Métodos

Se estudiaron 51 niños que fueron sometidos a endoscopia digestiva alta debido a síntomas dispépticos (18 *H. pylori* positivos y 33 negativos).

Se obtuvieron biopsias gástricas y un exudado rectal. En las biopsias gástricas se realizaron los siguientes métodos: test rápido de ureasa, cultivo, examen histológico y qPCR (16S ARNr específico de *H. pylori*). Se realizó una PCR a tiempo real para determinar la concentración de bacterias totales en ambos tipos de muestras. Por otra parte, se preparó una librería de amplicones a partir de cada muestra y se estudió el microbioma gástrico e intestinal mediante secuenciación de alto rendimiento de la región V4 del gen 16S ARNr.

La diversidad alfa y beta se estudiaron mediante el software QIIME, las asignaciones taxonómicas se realizaron con la Ribosomal Database Project (RDP) y los algoritmos LEfSe y PICRUSt se realizaron con la plataforma online Galaxy.

Resultados

La realización de la PCR cuantitativa de bacterias totales reveló que la densidad bacteriana en las muestras gástricas es mayor en el grupo de pacientes infectados por *H. pylori*.

Por otra parte, se observó que los pacientes *H. pylori* positivos se asociaron con bajo índice de masa corporal (IMC)($p=0.049$).

En cuanto a la microbiota gástrica, las muestras de pacientes positivos para *H. pylori* fueron menos diversas que las muestras de pacientes negativos según el estudio de la diversidad alfa y estos grupos de pacientes estaban separados de acuerdo a la diversidad beta. El análisis taxonómico confirmó que los pacientes positivos para *H. pylori* tenían una mayor abundancia relativa del género *Helicobacter* (53,6%) en comparación con los pacientes negativos para *H. pylori* (0,6%). Cuatro filos (Proteobacteria, bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) representaron más del 97% de toda las secuencias en ambos grupos.

Teniendo en cuenta la microbiota intestinal, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la diversidad alfa y beta respecto al estado de *H. pylori*. El análisis taxonómico reveló que no había secuencias de *H. pylori* en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* ni en el grupo de los negativos. Los filos más abundante en la composición de las comunidades intestinales eran principalmente Firmicutes, seguido de Bacteroidetes.

Conclusiones

La densidad bacteriana cuantificada mediante la PCR a tiempo real demuestra que hay un mayor número de bacterias en las biopsias gástricas de los pacientes positivos para *H. pylori* que en los pacientes negativos.

Los pacientes positivos para *H. pylori* se asociaron con un menor Índice de Masa Corporal (IMC).

En cuanto a la microbiota gástrica de los niños incluidos en este estudio, se observa que cuando *H. pylori* está presente, este microorganismo domina la comunidad microbiana. Por otra parte, según el estudio de la beta diversidad las comunidades gástricas se separan de acuerdo con el estado de *H. pylori* debido a la composición similar de los pacientes positivos entre sí y de los negativos entre sí.

Los filos más abundantes en la microbiota gástrica fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y en la microbiota intestinal destacan principalmente como filos mayoritarios, Firmicutes y Bacteroidetes.

SUMMARY

2. SUMMARY

Title: “Gut and gastric microbiota characteristics in relation to *Helicobacter pylori* status in a pediatric population “

Introduction

H. pylori is a microaerobic, Gram negative spiral bacterium that colonizes the human stomach of approximately 50% of the world’s population. *H. pylori* infection is closely associated with chronic gastritis, peptic ulcer disease, and development of gastric cancer.

H. pylori usually do not cause clinical problems in the paediatric population, and only a small proportion of children develop nonspecific symptoms such as vomiting, nausea, loss of weight, haematemesis, decreased appetite, etc. that may be associated with *H. pylori* infection. Nevertheless, infection with this bacteria is recognized as a cause of gastritis and peptic ulcer disease in children.

The stable colonization of *H. pylori* in the stomach suggests that other bacteria may also have been able to adapt to the acidic environment of the stomach. Traditionally, microbiota study was performed using culture techniques, although the bacteria that can be grown are only a small fraction of the total number of bacteria present. Nowadays, new DNA sequencing technologies allow us to better understand the composition of our microbiome.

The main goal of this study is to compare the gastric and intestinal microbiota in pediatric patients infected or not by *H. pylori*.

Methods

We studied 51 children that underwent gastric endoscopy due to dyspeptic symptoms (18 *H. pylori* positive and 33 negative). Mean age of this patients was 11.1 years (range:1-17).

Gastric biopsies and rectal swabs were obtained. In gastric biopsies the following methods were performed: Rapid Urease Test, culture (blood and pylori agar plates), histological exam and qPCR (specific 16S *H. pylori* rRNA in LightCycler@480). DNA was extracted from biopsy using UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MoBio) and from rectal swab by using PowerLyzer™ PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Afterwards, real time PCR was performed to determine total bacteria concentration in both gastric biopsies and rectal exudates. On the other hand, a library was prepared from each specimen and gastric and intestinal microbiome were studied by V4-16S rRNA high-throughput sequencing using the MiSeq Illumina platform.

Alfa and beta diversity was studied by QIIME software, taxonomic assignments were performed with the Ribosomal Database Project classifier (RDP classifier) and LEfSe and PICRUSt algorithms were performed with the online interface Galaxy.

Results

Real time PCR specific for *H. pylori* is a good method for the diagnosis of this microorganism. The cut-off was established with the highest sensitivity and specificity, this being 35 cycles.

Performing quantitative PCR of total bacteria revealed that the bacterial density in gastric samples is greater in the group of *H. pylori* infected patients. Moreover, it

was also determined that the bacterial concentration of gastric biopsies was much lower than in rectal swabs.

It was interesting to observe that *H. pylori*-positive patients were associated with low Body Mass Index (BMI). In the group of underweight patients (BMI values <18.5) there were 46.1% of *H. pylori*-positive patients compared with 24% in the non-underweight group (p=0.049).

Regarding gastric microbiota, *H. pylori*-positive specimens were less diverse than negative specimens according to alpha diversity and they were clearly separate according to beta diversity. Taxonomic analysis confirmed that *H. pylori*-positive subjects had a higher relative abundance of *Helicobacter* genus (53.6%) when compared with *H. pylori*-negative subjects (0.6%). Four phyla (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) accounted for >97% of all reads in both groups. *Proteobacteria* was present in both groups but gamma- and beta-proteobacteria were the most abundant for *H. pylori*-negative, whilst epsilon-proteobacteria was for positive.

Considering intestinal microbiota, there were no statistical differences in alpha and beta diversity regarding *H. pylori* status. Taxonomic analysis revealed that there was no *H. pylori* sequences in the group of positive patients for *H. pylori* neither in the negative ones. The most abundant phyla in the composition of intestinal communities were mainly *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*. LEfSe analysis revealed that the group of patients positive for *H. pylori* were statistically more represented by phylum *Proteobacteria* and genus *Anaerobacter*.

Conclusions

Bacterial density according to real time PCR revealed that a larger number of bacteria is found in gastric biopsies from patients positive for *H. pylori* than in the patients negative.

H. pylori positive patients were associated with a low Body Mass Index (BMI).

Referring to the gastric microbiota, it is observed that when *H. pylori* is present in the gastric microbiota of children, this microorganism dominates the microbial community. However, the remainder microorganisms of the gastric microbiota is similar regardless of the state of *H. pylori*, although greater diversity in *H. pylori*-negative patients is observed. Moreover, the study of beta diversity showed that the gastric communities were separated according to *H. pylori* status because of the similar composition of the positive patients to each other and the similar composition in the negative patients.

The most abundant phyla in gastric microbiota were Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria. And in the intestinal microbiota the main phyla were Firmicutes and Bacteroidetes.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Helicobacter pylori*

3.1.1. Antecedentes históricos

Antiguamente, el estómago era considerado un medio estéril, de hecho se pensaba que debido a la hiperacidez del jugo gástrico ningún microorganismo podía sobrevivir en estas condiciones ambientales.

En 1875, se observaron por primera vez bacilos con forma curvada en el epitelio del estómago. Fueron dos científicos alemanes, Bottcher y Letulle, quienes descubrieron la bacteria en el estómago de pacientes con úlcera gástrica, por ello sugirieron que las úlceras gástricas podían estar causadas por este microorganismo, sin embargo como no fueron capaces de cultivar la bacteria, la comunidad científica ignoró estos resultados (1).

En 1893, el investigador italiano Bizzozero visualizó bacilos curvados en el estómago de perros y gatos, aunque estos descubrimientos no fueron asociados con lo descrito anteriormente en humanos (2).

Salomon, en 1896, tras confirmar la presencia de bacilos curvados en el estómago de perros y gatos, también lo hizo en el estómago de humanos. En el mismo año, el profesor Walery Jaworski (3), de la Universidad Jaguelónica en Cracovia, visualizó, en sedimentos de lavados gástricos, microorganismos con una característica forma en espiral y los llamó *Vibrio rugula*. Además, Jaworski, sugirió que estas bacterias espirales podían tener un posible papel en la patogénesis de las enfermedades gástricas. Este trabajo fue incluido en el *Handbook of Gastric Diseases*, pero debido a que fue publicado en polaco, estos resultados no tuvieron gran impacto en la comunidad científica.

En 1906, Krienitz, encontró los mismos bacilos curvados en el estómago de pacientes con cáncer gástrico (4).

Doenges, a principios del siglo XX, realizó el primer estudio sistemático buscando bacterias helicoidales en el estómago humano, y publicó el primer trabajo relacionando este microorganismo con las úlceras gástricas (5).

Sin embargo, en 1954, Palmer publicó un estudio ampliamente distribuido por la comunidad científica, en el que afirmaba que en el estómago no habían bacterias, y concluía diciendo que los descubrimientos anteriores se debían a contaminaciones con flora microbiana de la boca (6).

Desde ese momento, se volvió a considerar que el estómago era un medio estéril y que ningún microorganismo podía sobrevivir en este ambiente y por lo tanto no se podía asociar a ninguna patología gástrica. Durante los siguientes 20 años, se atribuyeron las úlceras gástricas al estrés o a la comida picante (7,8).

Sin embargo, en 1975, Steer y Colin Jones, con la introducción del microscopio electrónico confirmaron la visualización de bacterias helicoidales en pacientes con úlceras gástricas, por lo que en este momento se volvió a asociar la producción de patología gástrica a estas bacterias con forma de espiral (9).

En 1979, un patólogo australiano, Robin Warren, visualizó estas bacterias, y poco tiempo más tarde Barry Marshall, un médico australiano, se unió a la investigación de estos microorganismos helicoidales. En 1981, Warren y Marshall empezaron un estudio prospectivo en el Royal Perth Hospital, con el objetivo de cultivar esta bacteria por primera vez. Siguieron la metodología utilizada por Martin Skirrow para el aislamiento y cultivo de especies del género *Campylobacter*, debido a la similitud morfológica (10). Después de numerosos intentos fallidos, la bacteria fue finalmente aislada de la mucosa del estómago de un paciente y consiguieron

observar colonias en 1982, cuando dejaron de forma no intencionada las placas de Petri incubando durante 5 días durante las vacaciones de Pascua.

Los autores lo identificaron como perteneciente al género *Campylobacter*, y lo denominaron *Campylobacter pyloridis*, después *Campylobacter pylori* (al corregirse la gramática latina) (11).

En ese momento, se había conseguido cultivar el microorganismo y demostrado que éste vivía en el estómago, pero faltaba por probar que tenía un papel en la patogénesis de la úlcera gástrica. Por ello, Barry Marshall que creía fervientemente en la implicación de este microorganismo en la úlcera gástrica, decidió hacer su *experimentum crucis* a los 32 años de edad. Un día de Julio de 1984, preparó y bebió una infusión de unos miles de millones de *Campylobacter pylori*, desarrollando una gastritis y recuperando la bacteria de su propio revestimiento estomacal. Poco tiempo más tarde, en 1987, Morris también ingiere la bacteria que le ocasiona gastritis requiriendo tratamiento con un antibiótico para lograr su erradicación (12). De esta forma, ambos científicos demuestran que este microorganismo cumple los postulados de Koch.

Las diferencias morfológicas de la nueva especie con las preexistentes, su patrón de ácidos grasos y diferencias genéticas, ponía en duda su inclusión en el género *Campylobacter*. En 1989, después de la secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico, se confirmó que esta bacteria no pertenecía al género *Campylobacter*, lo que llevó a la propuesta del nuevo género *Helicobacter* (13). Se eligió *Helicobacter* por la forma en que mueve sus flagelos, como hélices. El término *pylori* viene del latín *pylorus*, y hace referencia al píloro (la apertura inferior del estómago que conecta el estómago con el duodeno).

En España, el primer trabajo donde se describe el aislamiento de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal se publicó en 1985 (14).

En 1987 el gastroenterólogo Thomas Borody describió por primera vez la triple terapia para el tratamiento de las úlceras duodenales (15).

En 1994, el Instituto Nacional de Salud, relaciona *H. pylori* con la úlcera péptica y recomienda el uso de antibióticos para la erradicación de este microorganismo (16). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo clasificó como agente carcinogénico de clase 1 basándose en evidencia epidemiológica de su papel en la patogénesis del cáncer gástrico (17).

En 2005, J. Robin Warren y Barry J. Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y en la úlcera péptica.

3.1.2. Características microbiológicas

El género *Helicobacter* pertenece a la división *Proteobacteria*, clase Epsilon Proteobacteria, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Hasta ahora se han reconocido más de 20 especies en el género.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo con forma de espiral o ligeramente curvado. En ciertas circunstancias, *H. pylori* puede perder esa forma típica de espiral y adoptar la forma cocoide. Algunos estudios sugieren que estas formas son estructuras viables, o de resistencia frente a condiciones ambientales adversas (18), sin embargo otros concluyen que se trata un producto no viable de degeneración celular (19).

H. pylori tiene un tamaño que oscila entre 0,5 y 1 μm de ancho y 2,5 y 4 μm de largo. Presenta de 4 a 8 flagelos polares envainados, de aproximadamente 3 μm de longitud. Estos flagelos son los encargados de proporcionar al microorganismo su movilidad “en sacacorchos”. Ocasionalmente, la bacteria puede contener bacteriófagos.

Las colonias de *H. pylori* son pequeñas, con un diámetro de 1 a 2 mm aproximadamente, son traslúcidas y ligeramente brillantes.

En cuanto a las características bioquímicas, las especies de *Helicobacter* son quimiorganotrofas y tienen un metabolismo respiratorio. Son asacarolíticas (no hay fermentación ni oxidación de azúcares) aunque *H. pylori* sí oxida la glucosa. Tienen, al menos parcialmente, las vías metabólicas Entner-Doudoroff, de pentosas fosfato, y el ciclo de ácidos tricarboxílicos, pero la vía del glioxilato está ausente. No hidrolizan la gelatina, almidón, caseína o tirosina, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativos.

H. pylori tiene tres pruebas características, muy útiles para la identificación del microorganismo. Son la ureasa, la catalasa y la oxidasa. Todas ellas positivas.



Figura 1. Pruebas características de *H. pylori*: Ureasa, oxidasa y catalasa

3.1.3. Patogenia y factores de virulencia

H. pylori presenta proteínas a las que se les atribuye un cierto papel patogénico ya sea porque producen un daño directo al tejido del huésped, porque suponen una vía de evasión frente a los mecanismos de defensa o porque hacen posible la colonización de un medio tan hostil como la mucosa gástrica. Estas proteínas son conocidas como factores de virulencia, es decir, productos bacterianos o estrategias que contribuyen a la patogenicidad.

Así pues, se han detectado muchos de los considerados como factores de virulencia de *H. pylori* en cepas aisladas de pacientes con enfermedades gástricas más graves. Sin embargo, el valor predictivo de los factores de virulencia se cree limitado debido a que, presumiblemente, la patogenicidad depende de interacciones multifactoriales entre los propios factores de virulencia bacterianos y los factores inmunológicos, fisiológicos e influencias ambientales que modulan la respuesta inmune del hospedador (20).

3.1.3.1. Factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica

a. Ureasa: La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori*, representa alrededor de un 5% del total de sus proteínas celulares (21). Se trata de una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amoníaco, con el consecuente aumento del pH del medio. *H. pylori* es una bacteria muy sensible al ácido. Su hábitat natural se encuentra debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad. El mecanismo que utiliza para protegerse del pH ácido de la capa mucosa durante la colonización o durante las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el

espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. Por lo que gracias a la enzima ureasa, *H. pylori* puede adaptarse al ambiente ácido del estómago, formando una “nube de amonio” que le sirve para tamponizar su entorno vital y poder colonizar el epitelio. La producción de ureasa se regula de acuerdo a la condición del entorno, ya que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al NH_4^+ mataría la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador UreI permite la entrada de urea pero, una vez que el pH alcanza el valor de 6-7 se inactiva (22).

La ureasa además de ser un factor que favorece la colonización, también es un factor de patogenicidad ya que produce compuestos que pueden dañar las células epiteliales. En diversos trabajos se señala la función tóxica del amoniaco sobre las células de la mucosa gástrica, aunque algunos autores opinan que el amoniaco en si no daña la célula sino que el daño es provocado por uno de sus metabolitos, la monocloroamina, formado por la interacción del amoniaco con el ácido hipocloroso producido por los neutrófilos activados (23).

b. Flagelos: *H. pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares. Los flagelos de *H. pylori* se componen de tres elementos estructurales: un cuerpo basal, que está incrustado en la pared celular y contiene las proteínas requeridas para la rotación y la quimiotaxis; un filamento externo de forma helicoidal que funciona como una hélice cuando se gira en su base; y un gancho que sirve de unión entre el cuerpo basal y el filamento flagelar. Hasta la fecha, sólo los componentes del filamento y el gancho se han caracterizado con cierto detalle. El filamento es un copolímero de las subunidades de flagelina FlaA y FlaB. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante FlaA,

se encuentra en el exterior (24).

La gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica, según se ha deducido de la infección experimental de animales con variantes de *H. pylori* aflageladas y por tanto no móviles. Además la morfología espiral o helicoidal facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, y la bacteria produce una proteasa que digiere el moco facilitando su avance.

c. Adhesinas: Las adhesinas son proteínas de la superficie celular bacteriana que permiten la adherencia bacteriana a las células. La adherencia de los patógenos a las células epiteliales de la mucosa es el primer paso necesario tanto para la colonización como para la patogénesis. *H. pylori* se une a las células epiteliales gástricas, las células receptoras del huésped, de una forma específica mediante un elevado número de adhesinas utilizando múltiples receptores (25). El hecho de poseer tantas adhesinas en este nicho tan específico debe indicar que son muy importantes para *H. pylori* (26). La adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica es importante para la protección frente al pH ácido, moco, y exfoliación (27). De algunas de ellas se tienen datos que muestran su papel potencial como factores de virulencia (28).

Las adhesinas de *H. pylori* pertenecen a la familia más amplia de proteínas de membrana externa (OMP) de la bacteria, llamada familia de proteínas Hop (*Helicobacter* outer membrane protein). La familia Hop contiene las adhesinas más conocidas de *H. pylori* como BabA, SabA y OipA. Otra lipoproteína también implicada en la adherencia de *H. pylori* es HpaA.

- **BabA** (blood antigen binding adhesion): los antígenos de Lewis son antígenos fucosilados de grupo sanguíneo (29). Son expresados, además de

por los eritrocitos, por células epiteliales humanas. *H. pylori* se une con la adhesina BabA a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis (30). Esta proteína está codificada por los genes *babA1* y *babA2*, aunque solo el gen *babA1* es funcionalmente activo. La síntesis de esta proteína puede ser regulada por las condiciones del medio y su expresión se asocia con la puesta en marcha de una respuesta inmune inespecífica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales. Además la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de los factores de virulencia que dañan al tejido del hospedador, pudiendo llevar al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (31).

- **SabA** (sialic acid binding adhesion): se ha descrito como otra de las proteínas que se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (32).
- **OipA** (outer membrane inflammatory protein): es una adhesina codificada por el gen *oipA*, que al igual que los genes *sabA* y *babA*, pertenece al grupo de factores de virulencia de fase variable, es decir, que están presentes en todas las cepas pero pueden expresarse o no en distintas fases del crecimiento o distintas condiciones ambientales. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cual es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas *cagA* + (33).
- **HpaA** (*Helicobacter pylori* adhesin A): la proteína HpaA es una de las principales proteínas de la membrana externa de *H. pylori*. Media la unión entre conjugados glicosilados con ácido siálico presente en la superficie de

las células epiteliales gástricas y en la de neutrófilos. Está codificada por el gen *hpaA*. Es un antígeno de membrana que es reconocido por los anticuerpos humanos por lo que puede ser usado en los ensayos serológicos y para las vacunas (34).

d. Sistemas antioxidantes: *H. pylori* es una bacteria microaerófila muy vulnerable a la toxicidad del O₂. Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una gran cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno (MRO) (35). Se ha comprobado que también son producidos por las células epiteliales gástricas en respuesta a la infección (36), aumentando su concentración en la mucosa gástrica. *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de los MRO, así como para la reparación de los daños sufridos, que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Estos mecanismos son adaptables y están interconectados entre sí (37). Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los MRO encontramos:

- La enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno
- La catalasa o peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno
- Las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes (38).

- La flavoproteína MdaB, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes.

La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxiredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas (39).

A veces los sistemas de detoxificación no son suficientes y puede existir daño oxidativo. Para ello, *H. pylori* cuenta con mecanismos para reparar el ADN dañado, como las proteínas RecA, UvrABC, endonucleasa III (Nth), MutS y RuvC. Los daños oxidativos producidos en las proteínas son reparados por la metonin sulfóxido reductasa (40).

e. Proteasa: Enzima que desintegra la estructura polimérica del mucus y debilita su función como barrera por la pérdida gradual de su viscosidad, lo cual aumenta la retrodifusión del ion hidrógeno.

3.1.3.2. Factores de patogenicidad que contribuyen al daño de la mucosa gástrica

a. Citotoxina vacuolizante VacA (vacuolating cytotoxin)

La proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce principalmente vacuolización en las células epiteliales, muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas

al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y la muerte celular.

Sin embargo, se ha descrito que esta toxina tiene una variedad de efectos en las células del hospedador, además de la capacidad de inducir la vacuolización. La toxina VacA se puede localizar en las mitocondrias donde sus efectos pueden ser responsables de la activación de la cascada apoptótica (41–43). Durante la apoptosis el citocromo C es liberado del espacio intermembrana mitocondrial hacia el citoplasma mediante un mecanismo desconocido, como consecuencia, diversas caspasas son activadas lo que supone la ruptura de la membrana mitocondrial (44).

VacA puede inducir la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. El VEGF está implicado en la neoangiogénesis vía el sistema TLR2/TLR9 y se encuentra sobreexpresado en distinto grado en carcinomas humanos dependiendo del tipo de cepa bacteriana.

Por otra parte, VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción de VEGF y provocar como hemos visto anteriormente el desarrollo de procesos tumorigénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 Y VEGF, la activación de NF- κ b y el aumento de citoquinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atróficas y metaplasia gastrointestinal.

A pesar de que el 80% de los aislamientos poseen un gen funcional, el efecto citopático sólo se detecta en un 50% de la población (45). La diferente toxicidad de esta proteína se asocia a que el gen *vacA* posee una estructura en mosaico con lo que tiene varias formas posibles de presentación. Se puede distinguir 4 (s1a, s1b, s1c y s2) en base al análisis de la secuencia del extremo 5' del gen (codifica la región señal N-terminal de la proteína) y 3 (m1 y m2a y m2b) analizando la región media que codifica parte de la subunidad de unión a células epiteliales p55. De la combinación de estos podrían generarse distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos (46). Todas las combinaciones son posibles, aunque la combinación s2m1 es poco frecuente. El genotipo s1m1 se asocia con patologías más graves: úlcera (47) y cáncer gástrico (48). Mientras que las cepas con el alelo m2 suelen presentar baja asociación con estas patologías, especialmente s2m2 (49,50).

b. CagA (citotoxin-associated gen A)

Esta proteína antigénica (citotoxin-associated gen A), es uno de los factores de virulencia de *H. pylori* más extensamente estudiados. El gen que la codifica, el gen *cagA*, no está presente en su forma completa en todas las cepas de *H. pylori*, lo que permite dividir este microorganismo en dos subpoblaciones diferenciadas en función de la producción o no de la proteína. Este hecho resulta de suma relevancia desde un punto de vista patológico, ya que las cepas *CagA* positivas se relacionan, con síntomas más graves, como son la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (20).

El gen *cagA* forma parte de la isla de patogenicidad Cag (*cagPAI*). Las islas de patogenicidad son segmentos de ADN que contienen más de un gen de

virulencia con la peculiaridad de que una simple delección lleva a la pérdida de al menos dos genes de virulencia con segmentos de ADN de más de 30 kb. Esta isla de patogenicidad a su vez contiene alrededor de 32 genes que codifican para un conjunto de proteínas que conforman un sistema de secreción tipo IV (T4SS), que introduce la proteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales (51,52).

CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxilo-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas *cagA+* debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación.

Hay una correlación entre la integridad de *cagPAI* y la gravedad de la enfermedad, ya que mutaciones puntuales llevan a la pérdida del sistema de secreción tipo IV por lo que no se puede translocar la proteína CagA. La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la *cagPAI* están asociados con un aumento de la producción de otras citoquinas como la IL-1b, TNF- α y del factor nuclear de transcripción NF κ B (53,54).

3.1.3.3. Otros factores

a. Lipopolisacárido:

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* también ha sido implicado en la interacción entre la bacteria y su huésped. El LPS de *H. pylori* como el de otras especies bacterianas, presenta una estructura de tres dominios principales: la

capa polisacárida externa o cadena específica O, el núcleo oligosacárido y el lípido A. El lípido A es el componente responsable de las propiedades inmunológicas y endotóxicas del LPS. El LPS de *H. pylori* presenta una baja toxicidad comparada, por ejemplo, con el de *Salmonella* o *Escherichia coli* (55). Esta baja actividad biológica podría contribuir a la prolongación de la infección y a la inflamación crónica de la mucosa (56). La estructura química del LPS de *H. pylori*, en concreto la cadena específica O, es similar a la de los antígenos de los grupos sanguíneos Lewis^x y Lewis^y del huésped (57), lo que puede explicar la presencia de autoanticuerpos inducidos por *H. pylori*, que contribuirían al desarrollo de gastritis atrófica. Además, se ha observado que la bomba H⁺/K⁺ tiene epítomos Lewis^y y podría ser un objetivo del sistema inmune en casos de gastritis crónica (58). También se ha constatado que los antígenos de *H. pylori* similares a los de Lewis se expresan más frecuentemente en cepas *cagA*⁺ comparadas con cepas *cagA*⁻, lo que estimularía una respuesta autoinmune más intensa en las bacterias portadoras de gen *cagA*.

b. Tip α (TNF- α inducing protein): Las proteínas Tip α tienen una potente actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF- α y la activación de NF- κ B. Promueven la inflamación del cáncer (59).

3.1.4. Epidemiología

En la actualidad se sabe, a través de los estudios epidemiológicos realizados, que la infección por *H. pylori* es, probablemente, la infección humana más frecuente en el mundo; su distribución es ubicua y se calcula que aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada por este microorganismo (60). La prevalencia de la infección por *H. pylori* se correlaciona mejor con el estatus socioeconómico que

con la raza. Los países o áreas geográficas con un bajo desarrollo socioeconómico presentan las cifras de prevalencia más altas (el 70-80% de la población en edad adulta está infectado por *H. pylori*); en cambio, en las zonas con un alto desarrollo socioeconómico, la tasa de infección en población adulta se sitúa en torno al 40-50% (61). A pesar de todo, en la mayor parte de las regiones del mundo las tasas de prevalencia son muy altas y superan, en general, el 50%.

A pesar de que el porcentaje de infección es muy elevado como hemos visto anteriormente, la gran mayoría de los casos cursan de forma asintomática (62). Entre un 10% y un 15% de los individuos infectados sufrirán úlcera péptica y hasta un 1-3% podrían desarrollar cáncer gástrico. En conjunto, en torno al 7% de las personas podrán verse afectadas por patología gastroduodenal relacionada con la bacteria (63).

La mayoría de las personas se infectan durante la infancia, y se alcanza el máximo grado de seroconversión antes de los primeros 5 años de vida (64,65). La adquisición de la infección es extremadamente infrecuente en edades adultas en los países con un elevado desarrollo socioeconómico (<1% por año) (66).

No se conoce con exactitud la existencia de un reservorio medioambiental de la infección por *H. pylori*; sin embargo, parece que el agua podría actuar como reservorio y vector de este microorganismo en algunas poblaciones (67,68). El hombre se considera el huésped natural de *H. pylori*, y la cavidad gástrica (en especial el antro gástrico) es su "nicho" ecológico natural. La vía de transmisión persona a persona se considera la más probable de esta infección, y puede realizarse por vía fecal-oral, oral-oral o gástrica-oral (64,69,70). *H. pylori* se ha aislado en las heces, saliva y placa dental de personas infectadas. Se ha descrito la transmisión iatrogénica de esta infección a través de dispositivos sanitarios que no

se han desinfectado adecuadamente. Según algunos estudios, es posible que la mosca doméstica pueda transmitir y diseminar en el ambiente *H. pylori* a través de sus secreciones, por lo que este insecto puede considerarse una importante vía de infección en áreas con deficientes medidas higiénicosanitarias deficientes (71).

3.1.5. Manifestaciones clínicas

La infección por *H. pylori* origina prácticamente siempre gastritis subclínicas. Sin embargo las complicaciones principales (úlceras pépticas, adenocarcinoma y linfoma gástrico) se desarrollan sólo en una minoría de las personas infectadas. En niños el porcentaje de pacientes que presenta sintomatología asociada a la infección por *H. pylori* es todavía menor. La úlcera gástrica o duodenal relacionada con la infección por *H. pylori* es muy poco frecuente en la edad pediátrica respecto a lo que ocurre en la edad adulta. La frecuencia de úlcera por *H. pylori* en los pacientes pediátricos varía de unos medios a otros, oscilando de 2-5% en los países industrializados, a un 13.5%-20% en países en vías de desarrollo y con una alta prevalencia de infección por *H. pylori* (72,73).

3.1.5.1. Manifestaciones digestivas

Entre las manifestaciones digestivas encontramos:

- Gastritis
- Úlcera péptica
- Cáncer gástrico
- Linfoma gástrico MALT

-Gastritis:

La gastritis crónica es uno de los procesos inflamatorios más frecuentes del ser humano. Tras la colonización por *H. pylori* se produce en todos los casos una gastritis histológica que puede desarrollarse bien de forma asintomática o bien como un episodio gástrico autolimitado con la clínica propia de la gastritis aguda (náuseas, dolor epigástrico y vómitos)(74). El curso de la gastritis aguda es de 7 a 10 días y tras esta fase inicial algunos pacientes desarrollan una gastritis crónica superficial (70-80% de los pacientes que padecen gastritis crónicas diagnosticadas están infectados por *H. pylori*) (75) que puede mantenerse como tal o bien ser el primer paso de la evolución hacia la fase de atrofia que comienza generalmente en el antro y se extiende hacia el cuerpo del estómago (76).

La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria mixta de polimorfonucleares, 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.

La sintomatología asociada a la gastritis por *H. pylori* es muy variable. Puede expresarse con un cuadro compatible con lo que se llama dispepsia no ulcerosa, que se interpreta con síntomas como dolor en epigastrio o hemiabdomen superior, sensación de plenitud, náuseas y vómitos (77).

-Úlcera péptica:

Las úlceras pépticas se pueden presentar en el estómago (úlcera gástrica), en el duodeno (úlcera duodenal) o en ambos.

La asociación de *H. pylori* con la úlcera duodenal es clara ya que el 90-95% (78) 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 ya que un 70% de este tipo de úlcera está asociado con la presencia de *H. pylori*, el resto de úlceras gástricas pueden estar producidas por otras causas como por ejemplo el consumo de antiinflamatorios no esteroides (AINES).

El descubrimiento de *H. pylori* como principal agente causante de la úlcera péptica, supuso una revolución en el tratamiento y pronóstico de esta patología. La progresión desde la gastritis inicial a la úlcera péptica dependerá de la virulencia de las cepas, de la predisposición del hospedador y de la influencia de sus hábitos y entorno.

-Cáncer gástrico:

En el año 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (17,79) incluyó a *H. pylori* como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncer gástrico (80).

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. Alrededor del 74.7-89.0% de los cáncer gástricos están relacionados con la infección por *H. pylori* (81).

Según el programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) del National Cancer Institute (NCI), se calculaba que en 2013, 21.600 individuos de los Estados Unidos sería diagnosticados con cáncer gástrico y que 10.990 morirían por este cáncer. El cáncer gástrico es la segunda causa más común de muertes relacionadas por cáncer en el mundo y cobró aproximadamente 738.000 vidas en 2008 (82). Dicho cáncer es menos común en los Estados Unidos y en otros países occidentales que en países asiáticos y sudamericanos.

Algunas de los mecanismos moleculares por los que *H. pylori* estimula la progresión de las lesiones hasta desembocar en cáncer son: la liberación de radicales libres que dañan las células gástricas (83), la hipergastrinemia que acompaña al estado de atrofia y estimula la proliferación celular aumentando el riesgo de mutaciones (84) o la acción de determinados genes de virulencia (*cagA*, *vacA s1m1*, etc)(85).

Durante el proceso carcinogénico se han detectado cambios histológicos ordenados en una secuencia establecida que se originan en la inflamación, formación de gastritis no atrófica y luego atrófica, metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, la presencia del adenocarcinoma gástrico; a esta serie de cambios histológicos se le conoce como secuencia de Correa (86).

-Linfoma gástrico MALT:

Los linfomas MALT son un tipo de cáncer de células B clonales originados en el tejido linfoide asociado a las mucosas (mucosa associated lymphoid tissue).

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 (87).

Aunque en niños, la presentación de cáncer maligno como adenocarcinoma gástrico o linfoma de tipo MALT es muy poco frecuente (88), se han registrado algunos casos (89) relacionados con la infección por *H. pylori*.

3.1.5.2. Manifestaciones extradigestivas

En los últimos años, muchas publicaciones han demostrado una fuerte asociación de la infección por *H. pylori* y el desarrollo de muchas enfermedades extradigestivas, como se muestra en la Tabla 1, incluyendo enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, trastornos neurológicos, obesidad, trastornos de la piel, etc (90).

Manifestaciones extraintestinales asociadas a <i>Helicobacter pylori</i>	
Enfermedades cardiovasculares	Enfermedad arterial coronaria Enfermedad arterial periférica Enfermedad isquémica coronaria
Enfermedades hematológicas	Púrpura trombocitopénica idiopática Anemia ferropénica Anemia por deficiencia de Vit B12
Enfermedades neurológicas	Alzheimer Parkinson Migraña
Enfermedades dermatológicas	Urticaria crónica Angioedema Alopecia areata Rosácea
Enfermedades inmunológicas	Fenómeno Raynaud Síndrome Sjogren
Enfermedades endocrinas	Diabetes Tiroiditis autoinmune
Otras	Hiperémesis gravídica

Tabla 1. Manifestaciones extraintestinales asociadas a *H. pylori*

Enfermedades cardiovasculares y *Helicobacter pylori*

De entre todas las posibles manifestaciones extradigestivas de la infección por *H. pylori* éste ha sido probablemente el grupo de enfermedades más estudiado.

-Enfermedad isquémica coronaria (EIC)

En 1994, Mendall et al. fueron los primeros en describir la existencia de una alta seroprevalencia de la infección por *H. pylori* en pacientes con cardiopatía isquémica en comparación con la población general (91). Este estudio inicial causó un gran impacto en la comunidad científica, lo que promovió un gran número de nuevas investigaciones en esta misma línea de trabajo. Desde entonces, se han publicado en la literatura numerosos estudios epidemiológicos retrospectivos, y la mayoría de los resultados atribuyen riesgos relativos por encima de 1 para los pacientes infectados por *H. pylori*. Sin embargo, hay que valorar los resultados con precaución, dado que en general no se tienen en consideración factores epidemiológicos importantes.

Más recientemente han sido publicados en la literatura estudios epidemiológicos de tipo prospectivo, metodológicamente mejor planteados que los anteriores, y en la mayoría de ellos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia de *H. pylori* en el grupo con EIC y el grupo control (92-94). Sin embargo, en algún estudio reciente sí que demuestran una asociación de *H. pylori* con la enfermedad isquémica coronaria (95,96). Por lo que se deben realizar un mayor número de estudios para comprobar esta asociación.

-Fenómeno de Raynaud

El fenómeno de Raynaud primario es un trastorno vascular funcional caracterizado por vasoespasmos de las arteriolas periféricas de las extremidades (generalmente

en las manos), que se presenta preferentemente en las mujeres jóvenes tras la exposición al frío o a estímulos emocionales.

La infección por *H. pylori* también se ha relacionado con este fenómeno, encontrándose en diversos estudios con resultados dispares (97,98).

Se ha sugerido que la liberación de citoquinas, prostaglandinas, leucotrienos y de otras sustancias vasoactivas que pueden actuar a nivel de la circulación vascular periférica podría ser el mecanismo patogénico que explicase esta asociación. Sin embargo, esto no ha sido demostrado. Son aún muy pocos los estudios que investigan el efecto de la erradicación de *H. pylori* en personas con fenómeno de Raynaud.

Enfermedades hematológicas y *Helicobacter pylori*

En este bloque de enfermedades encontramos algunas que tienen una fuerte evidencia científica de la asociación de la enfermedad con la infección por *H. pylori*.

-Púrpura trombocitopénica idiopática

La púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) es una enfermedad hematológica en la que el sistema inmune produce anticuerpos antiplaquetarios.

Los principales mecanismos involucrados en la asociación de la PTI y *H. pylori* son (99):

- 1.- *H. pylori* favorece la producción de monocitos con mayor actividad fagocítica.
- 2.- Existe una similitud de los anticuerpos antiplaquetarios del suero con la citotoxina asociada al gen *cagA* de *H. pylori*. Por lo que anticuerpos contra la proteína CagA de *H. pylori* reaccionan de manera cruzada contra proteínas en la superficie de las plaquetas

3.- La ureasa favorece la activación de células B1 que están asociadas a la producción de autoanticuerpos.

Existen numerosos artículos que estudian esta relación (100–103). Sin embargo, no todos los pacientes han respondido a la erradicación de *H. pylori* por lo que aún no se dispone de un criterio firme que incluya la PTI como una posible manifestación extradigestiva de la infección por *H. pylori*.

-Anemia ferropénica refractaria

Diversos estudios han demostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y la anemia ferropénica refractaria al tratamiento tanto en niños pequeños como en adolescentes (90,104,105).

La Sociedad Británica de Gastroenterología y las Guías del Consenso de Maastrich IV incluyen en el manejo de la anemia ferropénica el estudio de la infección por *H. pylori* en pacientes con anemia ferropénica de etiología desconocida (106,107).

Los principales mecanismos involucrados en la asociación de la anemia ferropénica y la infección por *H. pylori* son (99):

1.- La hipoclorhidia, la disminución de los niveles de ácido ascórbico y el predominio de la forma oxidada de ácido ascórbico (biológicamente inactiva): disminuye la reducción de hierro férrico a ferroso que es la forma en la que es absorbido el hierro a nivel intestinal

2.- *H. pylori* usa hierro para su proliferación y puede competir con el hospedador en la captación de hierro.

3.- Tras la infección por *H. pylori*, se produce un aumento de hepcidina, una hormona producida por el hígado que se encarga de la regulación del metabolismo

del hierro. Al aumentar la producción de hepcidina, disminuye la liberación de hierro desde los macrófagos y desde los enterocitos.

Enfermedades neurológicas y *Helicobacter pylori*

-Alzheimer

Se han realizado varios estudios para verificar la posible relación entre la infección por *H. pylori* y diversos trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer y el parkinsonismo idiopático. Malaguarnera et al descubrió una asociación entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad de Alzheimer (108). Kountouras et al consiguió demostrar que la erradicación de la infección por *H. pylori* puede implicar una mejora en la evolución de la enfermedad de Alzheimer (109).

-Parkinson

Nielsen et al, sugiere en su estudio utilizando los registros daneses a nivel nacional que la infección crónica por *H. pylori* contribuyen a la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, también propusieron la teoría de que la infección por *H. pylori* fuera una enfermedad relacionada con la enfermedad de Parkinson debido a la degeneración del sistema nervioso autónomo y entérico que precede a los síntomas motores (110).

Una de las hipótesis de relación causal entre *H. pylori* y la enfermedad de Parkinson implica que si la infección por esta bacteria no se erradica, puede afectar la absorción de medicamentos contra la enfermedad de Parkinson, y por consiguiente afectar a la respuesta global del tratamiento (111). En un artículo de Lee et al, concluyeron que la erradicación de *H. pylori* podría mejorar las

fluctuaciones motoras de pacientes infectados por *H. pylori* enfermedad de Parkinson (112).

Aunque varios estudios muestran una asociación positiva entre *H. pylori* y la enfermedad de Parkinson (113), esta área requeriría nuevos estudios con mayor número de pacientes.

Lesiones dermatológicas y *Helicobacter pylori*

-Urticaria crónica

Las causas de la urticaria crónica son numerosas; sin embargo, en al menos 80-90% de los pacientes, la etiología es desconocida. Existen diversos artículos que estudian esta relación, pero por el momento los resultados son dispares.

Varios autores informaron efectos beneficiosos de la erradicación de *H. pylori* en la urticaria crónica (114–117).

Sin embargo, Hellmig et al (118) estudiaron 74 pacientes *H. pylori* positivos con urticaria y no estableció ninguna correlación positiva en el curso clínico de la urticaria crónica. Lo mismo ocurrió en el estudio de Curth et al. (119) en el que no observaron que la erradicación de *H. pylori* tuviera un efecto sobre la urticaria crónica de dichos pacientes.

-Rosácea

Desde hace años, la rosácea se ha relacionado con la gastritis, la hipoclorhidria y anomalías de la mucosa duodenal. Por lo que se ha intentado relacionar con la infección por *H. pylori*. Hay diversos estudios que demuestran una asociación entre *H. pylori* y la rosácea y proponen que la erradicación de *H. pylori* podía revertir la lesión dermatológica(61,120,121). Sin embargo, otros estudios no encuentran

diferencias significativas entre los controles sanos y los pacientes afectados de rosácea (122,123). Son muy escasos los estudios de intervención erradicando *H. pylori* en enfermos con rosácea y los resultados son contradictorios. Por lo que se necesitan un mayor número de estudios para poder clarificar la relación entre *H. pylori* y la rosácea.

Otras manifestaciones extradigestivas

-Retraso en el crecimiento

Una posible explicación sobre la asociación de la infección por *H. pylori* y el retraso en el crecimiento sería la afectación de los niveles de grelina y leptina. Recientemente se ha demostrado que el estómago es fuente de estas hormonas. La colonización por *H. pylori* y la gastritis produciría un aumento de los niveles de leptina y una disminución de los de grelina, lo que repercutiría en el apetito, disminuyendo el aporte calórico y afectando secundariamente a su índice de masa corporal (103). Existen numerosos estudios que han demostrado la asociación del retraso en el crecimiento con la infección por *H. pylori* (124,125). Sin embargo, existe algún artículo que asocia la infección por *H. pylori* con la obesidad (126), por lo que se necesita un mayor número de estudios para poder aclarar esta disparidad de resultados.

3.1.6. Métodos diagnósticos

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos (que requieren realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica) o no invasivos (métodos para los que no se requiere realización de endoscopia)(87).

Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes y ninguno de los que existen hasta este momento puede considerarse *gold standard* utilizado únicamente.

Un método de diagnóstico ideal es no invasivo o mínimamente invasivo, no caro, seguro, disponible en todos los centros y que sea capaz de diferenciar infección activa de infección pasada. El método debe ser capaz de diferenciar entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad asociada a la bacteria. Ninguno de los métodos que existe actualmente cumple todos estos requisitos (127).

3.1.6.1. Métodos invasivos

Histología

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 gastritis y su clasificación.

La presencia del microorganismo puede reconocerse con la tinción habitual de hematoxilina-eosina, aunque se demuestra más fácilmente con otras tinciones como la de Giemsa.

En niños, al igual que en adultos, la mejor muestra para estudio histológico es la biopsia del antro gástrico. Se recomienda también una del cuerpo gástrico o de la zona de transición si el paciente ha tomado recientemente antiácidos (128). Si el niño presenta una úlcera péptica se recomienda estudiar múltiples biopsias (129,130).

Prueba rápida de la ureasa

La prueba rápida de la ureasa consiste en poner en contacto una muestra de la mucosa gástrica con un medio líquido que contiene urea y un indicador de pH; si existe actividad ureasa, la urea se descompone en anhídrido carbónico y amoníaco, que se demuestra como un cambio de color ya que el pH del medio se modifica.



Figura 2. Prueba rápida de la ureasa

Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80%-90% (131). Sin embargo, en niños, esta prueba tiene un bajo valor predictivo positivo (hasta el 50%) pero tiene un elevado valor predictivo negativo (97-98%) (132). Su sensibilidad es menor cuando se utiliza para confirmar la desaparición de *H. pylori* tras haber administrado un tratamiento erradicador, por lo que en esta situación no debe emplearse como único método.

Se trata de un método sencillo, barato y rápido (con frecuencia permite conocer la presencia de infección en tan sólo una hora).

Cultivo

El aislamiento de *H. pylori* mediante cultivo es el método más específico en el diagnóstico de este microorganismo y presenta ventajas como permitir el estudio de la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad de tipado de cepas con fines epidemiológicos (133).

H. pylori es un microorganismo muy exigente que requiere unas condiciones específicas para ser cultivado:

-Para el cultivo de *H. pylori* se requieren medios de cultivo suplementados con sangre o suero, los cuales actúan como fuentes adicionales de nutrientes y lo protegen de efectos tóxicos de los ácidos grasos de cadena larga. Existen medios que además contienen antibióticos y antifúngicos, de forma que evitan la colonización del cultivo por agentes contaminantes que dificultan la viabilidad de la bacteria.

-*H. pylori* necesita de una atmósfera microaerófila para crecer. Crece de forma óptima a concentraciones de O₂ del 2 al 5%, una concentración de CO₂ del 5 al 10%, una concentración de N₂ de 80-90% y una humedad relativa alta. *H. pylori* no tolera altas concentraciones de O₂, pero requiere al menos el 2% de este gas ya que lo utiliza como aceptor final de electrones.

-En cuanto a la temperatura de incubación, la temperatura óptima es de 37°C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35 a 39°C.

-El tiempo de incubación es de 5 a 10 días.

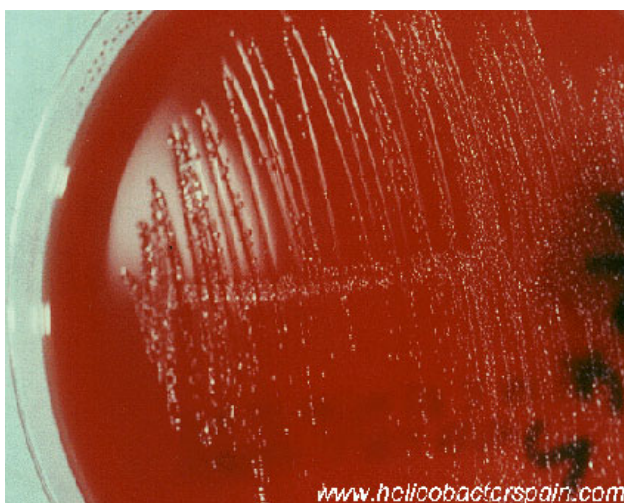


Figura 3. Aspecto de las colonias en medio de cultivo Agar sangre

Como desventaja cabe destacar que es un método de diagnóstico lento ya que la bacteria puede tardar varios días en crecer. Por otra parte, la sensibilidad de la técnica depende de la experiencia en su cultivo y de que la toma y el transporte se realicen en las condiciones adecuadas. La identificación se realiza mediante visión en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver la morfología o bien mediante tinción de Gram. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación (11) (Figura 1). La muestra más habitual para el cultivo es una biopsia a partir de mucosa gástrica.

Pruebas moleculares

Tras la extracción del ADN desde la muestra biológica (normalmente biopsia gástrica, aunque también heces, saliva, agua, etc.) (134), es posible la aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o a tiempo real para la detección del microorganismo, el estudio de determinadas regiones de su genoma implicadas en la sensibilidad a los distintos antimicrobianos y patogenicidad. Los principales objetivos de diagnóstico mediante PCR son:

- Detección de genes específicos de la bacteria.
- Detección de factores de virulencia.
- Detección de mecanismos de resistencia.
- Como métodos de tipado para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares.

Este tipo de técnicas moleculares presentan una alta sensibilidad y especificidad.

3.1.6.2. Métodos no invasivos

Test del aliento

Es el método indirecto para detectar la ureasa de *H. pylori*. Consiste en la ingestión de urea marcada con C^{13} o C^{14} . Una vez en el estómago y en presencia de *H. pylori* esta urea será hidrolizada por la ureasa del microorganismo liberándose $^{13}CO_2$ o $^{14}CO_2$ marcado que desde el estómago difunde a sangre, es transportado por ella a los pulmones y de este modo es liberado con el aliento.

Existe un protocolo europeo que utiliza ácido cítrico (para retrasar el vaciamiento gástrico y optimizar la absorción de urea) y ^{13}C cuya utilización aporta grandes ventajas ya que se trata de un isótopo natural estable y no radiactivo, que puede utilizarse tantas veces como sea necesario, incluso en niños y mujeres embarazadas.

Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *H. pylori*. 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 (135).

El empleo de antibióticos o inhibidores de la bomba de protones (IBP) en los días previos puede ser el origen de resultados falsos negativos. Por ello, se recomienda retrasar la prueba al menos un mes desde la finalización del tratamiento antibiótico, y al menos catorce días desde que concluya la administración de IBP. A diferencia de las pruebas serológicas, la prueba del aliento confirma de modo precoz la desaparición de *H. pylori* tras el tratamiento. De ahí que deba ser considerada como la técnica de elección para confirmar la erradicación.

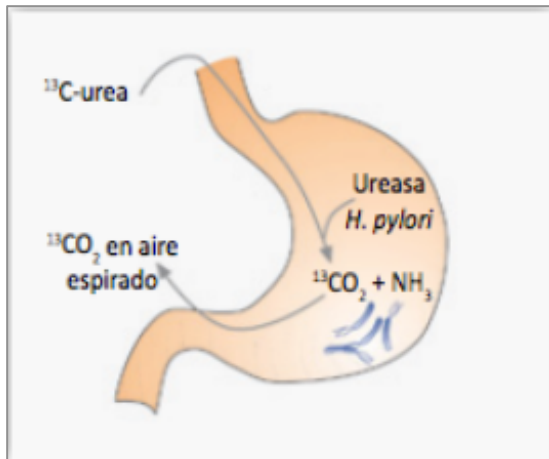


Figura 4. Fundamento de la prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C .

Detección del antígeno de *H. pylori* en heces

La detección del antígeno en heces de *H. pylori* es un método directo no invasivo que permite la detección de antígeno de esta bacteria en muestras de heces. Los tests de detección de antígenos se dividen en aquellos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden existir pequeñas diferencias entre ellos, habiéndose obtenido mejores resultados con los anticuerpos monoclonales.

Por otra parte, estos tests también se clasifican según el método por el que se llevan a cabo ELISA o inmunocromatografía.

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.

La técnica aporta una información muy valiosa por la fácil obtención y la conservación de la muestras, se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología y no necesita la colaboración del paciente. Es muy útil para niños pequeños (136–139).

Serología

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero. Estas técnicas únicamente indican una exposición previa al microorganismo, pero no discriminan entre personas con infección activa e individuos sanos con exposición previa a la infección. Se utiliza por tanto especialmente en estudios epidemiológicos. Los resultados de la serología tienen la ventaja de que no se ven afectados por un tratamiento reciente con antibióticos o antiácidos.

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. Los niños pequeños presentan menor respuesta de anticuerpos, por lo que la sensibilidad de las técnicas serológicas es baja en población pediátrica (140).

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 detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA puede tener especial interés en estudios sobre virulencia.

3.1.6.3. Estrategias de diagnóstico

Las Sociedad Americana y Europea de Gastroenterología sugieren dos estrategias básicas para el manejo de la infección por *H. pylori*.

Estrategia *test and treat* (diagnosticar y tratar): se trataría de llevar a cabo un método de diagnóstico no invasivo (como por ejemplo, el test del aliento o la detección del antígeno de *H. pylori* en heces) con la intención de reducir el número

de endoscopias. Esta estrategia se llevaría a cabo ante pacientes jóvenes (menores de 50 años) con síntomas dispépticos y en ausencia de signos de “alarma”. Así, los pacientes infectados recibirían tratamiento erradicador para *H. pylori*, mientras que en los enfermos no infectados se administraría tratamiento sintomático. Obviamente, en caso de no observarse una mejoría sintomática sería necesario realizar una gastroscopia, con la intención de descartar otras patologías.

Estrategia *test and endoscopy* (diagnosticar y endoscopia): en este caso se realizaría en primer lugar un método de diagnóstico no invasivo y posteriormente se llevaría a cabo una endoscopia. Este abordaje se realizaría en pacientes mayores de 50 años o en pacientes con signos de “alarma” de cáncer gástrico.

3.1.7. Tratamiento

3.1.7.1. Indicaciones de tratamiento

Teniendo en cuenta que una gran proporción de la población está colonizada por *H. pylori* pero que sólo un pequeño porcentaje desarrolla manifestaciones clínicas, resulta obvio que no será necesario tratar a todos aquellos pacientes *H. pylori* positivos. Por otra parte, también ha quedado demostrado que un porcentaje importante de las úlceras pépticas, carcinomas y linfomas gástricos MALT está asociados con *H. pylori*. Por lo que las indicaciones para llevar a cabo el tratamiento para erradicar esta bacteria, indicadas en el III Consenso de Maastrich (141) son las siguientes:

Indicación clara de tratamiento:

- Úlcera duodenal o úlcera gástrica (activa o no)
- Linfoma MALT
- Gastritis atrófica

- Tras resección de cáncer gástrico
- Para prevención de cáncer gástrico

Indicación fuerte para diagnosticar y tratar:

- Pacientes con familiares de primer grado que han padecido cáncer gástrico
- Deseo del paciente

3.1.7.2. Pautas de tratamiento

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 ó 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso, que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 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 (142). Sobre todo, se debe considerar la tasa de resistencia a claritromicina. En el consenso de Maastrich IV (106) recomiendan pautas de tratamiento distintas en función de la tasa de resistencia de este antimicrobiano, clasificando las áreas geográficas como área con alta tasa de resistencia (>20%) o área de baja tasa de resistencia a claritromicina (<20%).

La triple terapia que incluye un inhibidor de la bomba de protones (IBP) claritromicina y amoxicilina o metronidazol y fue propuesta en la primera Conferencia de Maastrich (143) para tratar la infección por *H. pylori* se ha convertido en universal, ya que fue recomendado por todas las conferencias de consenso celebradas en todo el mundo. Sin embargo, datos recientes muestran que esta combinación ha perdido eficacia y la tasa de curación alcanza a menudo un máximo de 70% de los pacientes, que es inferior a la tasa de 80% que debería esperarse en una enfermedad infecciosa (144).

Debido a que no se ha desarrollado ningún nuevo antimicrobiano para esta infección, se han llevado a cabo en los últimos años un gran número de estudios utilizando diferentes combinaciones de antibióticos conocidos.

Los mejores resultados se obtuvieron el llamado 'tratamiento secuencial' que incluye un período de 5 días con IBP y amoxicilina, seguido por un período de 5 días con metronidazol, IBP y claritromicina (145,146).

Otra de las pautas que se propuso fue la toma de los tres antibióticos de forma simultánea junto con un IBP (terapia cuádruple sin bismuto) (147,148).

A los pacientes adultos que son diagnosticados a través de pruebas no invasivas, no se les realiza cultivo antes de la administración de un primer tratamiento por lo que los gastroenterólogos han elaborado distintas líneas de tratamiento ordenadas prioritariamente, por si la anterior falla (149–151). Si el tratamiento de elección falla, se debe evitar repetir dos veces el mismo tratamiento y se recomienda realizar estudios microbiológicos (152,153).

Opción	Terapia	Tratamiento	Duración del tratamiento
Primera	Triple	BAM/OAM/OCM	14 días
	Concomitante	OCAM	3 a 7 días
Segunda	Cuádruple	BOMT	14 días
	Secuencial	OA + (OCTn/OCM)	5 + 5 días
Tercera	Rescate	OTM/BTM	10 a 12 días
Cuarta	Casos refractarios	OAR	14 días

Tabla 2. Pautas para el tratamiento de la infección por *H. pylori* en adultos. A: amoxicilina, B: compuesto derivado del bismuto, C: claritromicina, M: metronidazol, O: omeprazol, T: tetraciclinas, Tn: tinidazol, L: levofloxacino, R: rifampicina/rifabutina.

Por el contrario, en pediatría gastroenterológica, aunque existen unas pautas de tratamiento de la infección en niños (154), se realiza en la mayoría de los casos una endoscopia digestiva alta y, a partir de esta, se toma una biopsia (155), por lo que se suele conocer la susceptibilidad antibiótica a través de los antibiogramas del aislado obtenido. Esto permite aplicar la triple terapia, utilizando los dos antibióticos para los cuales el aislado en concreto se muestre susceptible *in vitro* (87).

Opción	Terapia	Tratamiento	Duración del tratamiento
Primera	Triple	BAM/OAM	14 días
Segunda	Cuádruple	BOMT (<8años)	7 días
	Secuencial	OA + (OCTn/OCM)	5 + 5 días
Tercera	Terapia de rescate	OAR/OAL*	14 días

Tabla 3. Pautas para el tratamiento de la infección por *H. pylori* en niños. A: amoxicilina, B: compuesto derivado del bismuto, C: claritromicina, M: Metronidazol, O: omeprazol, T: tetraciclinas, Tn: Tinidazol, L: levofloxacino, R: rifampicina, rifabutina. * Usado solo en pacientes pediátricos mayores.

3.1.7.3. Antiácidos utilizados para erradicar *H. pylori*

Habitualmente se utilizan tres tipos distintos de fármacos con actividad antiácida (156):

- Compuestos de Bismuto: Citrato de bismuto coloidal y salicilato de bismuto. Aumentan la producción de moco y prostaglandinas por la mucosa gástrica, evitan la unión de *H. pylori* a la superficie de la mucosa gástrica y destruyen la integridad de la pared bacteriana. Pero se desconoce con certeza el mecanismo de acción de estos compuestos.

- Fármacos antagonistas de los receptores de histamina: Cimetidina, famotidina, nizatidina, roxatidina, ebrotidina, ranitidina y ranitidina citrato de bismuto. Actúan en la membrana basolateral de la célula parietal gástrica como antagonistas competitivos de la histidina sobre los receptores de histamina. Reducen, por tanto, la secreción ácida tanto basal como la estimulada por gastrina, histidina y agonistas muscarínicos. No presentan actividad directa frente a *H. pylori*.

- Inhibidores de la bomba de protones: Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol y rabeprazol. Actúan en la célula parietal (membrana subapical). Inhiben de forma reversible la enzima H-K ATPasa, bloqueando toda secreción de ácido (157,158).

En las terapias erradicadoras iniciales, la mayoría de los autores que empleaban IBP, prolongaban estos fármacos de dos a cuatro semanas más tras la conclusión del tratamiento antibiótico. Sin embargo, diversos autores han demostrado que es suficiente con el empleo de un IBP durante una semana, es decir, durante el periodo de administración de los antibióticos para obtener una elevada tasa de cicatrización ulcerosa duodenal (159). Ello implica importantes beneficios, tanto económicos, como de sencillez terapéutica. En la úlcera gástrica, sin embargo, se carece de información para establecer recomendaciones definitivas al respecto. Por otra parte, parece prudente que en una úlcera gastroduodenal que haya sufrido complicaciones se administren antiseoretos hasta confirmar la erradicación de *H. pylori*.

3.1.7.4. Antimicrobianos utilizados para erradicar *H. pylori*

H. pylori es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* pero no todos presentan eficacia *in vivo*. Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que

se utilizan o se pueden utilizar en los tratamientos para erradicar la infección son los siguientes:

-Amoxicilina: entre todos los betalactámicos ensayados in vitro sólo amoxicilina ha demostrado ser útil en el tratamiento de la infección por *H. pylori* ya que es el betalactámico más estable en el medio ácido y el que alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral. Se utiliza en diferentes pautas de tratamiento asociado a metronidazol, tetraciclina o claritromicina.

Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana de los microorganismos. Se han descrito alteraciones de las PBPs, concretamente en el gen *pbp-1 A* que se asocian con resistencia a este antimicrobiano. Además de las alteraciones en las PBPs, se ha sugerido que la reducción de la permeabilidad o la expulsión activa pueden contribuir a producir niveles más altos de resistencia (160).

-Tetraciclina: Compuesto por una estructura tetracíclica, inhibe la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S de forma que impide la unión del aminoacil-ARNt al ARN mensajero. No pueden utilizarse en población pediátrica ya que se deposita en huesos y dientes (principalmente en fases de desarrollo) formando un quelato con el calcio. El mecanismo de resistencia descrito para *H. pylori* consiste en mutaciones puntuales en el gen 16S ARN en la posición 926-928 (cambio de AGA por TTC) (161). Cuando se lleva a cabo una única sustitución se produciría resistencia de bajo nivel; sin embargo, si se presentan 3 mutaciones la resistencia sería de alto nivel. También se ha propuesto como mecanismo de resistencia la reducción de la permeabilidad, ya que algunas cepas resistentes no presentan las

mutaciones descritas y muestran una disminución de la acumulación de la tetraciclina. La resistencia a tetraciclinas de *H. pylori* es muy baja.

-Metronidazol: Es un antibiótico nitroimidazólico, que necesita una reducción previa en el interior del microorganismo para que sea activo y se liberen los intermediarios tóxicos que realmente dañan el ADN bacteriano. Esta reducción la llevan a cabo proteínas del metabolismo anaerobio exclusivas de algunos parásitos y bacterias anaerobias o microaerófilas que actúan sobre el grupo nitro unido al anillo imidazólico. El metronidazol reducido produce pérdida de la estructura helicoidal del ADN, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. En *H. pylori* se ha descrito una piruvato flavodoxina oxidoreductasa, que puede ser la proteína capaz de reducir el metronidazol y otros posibles aceptores de electrones, como ferredoxina, flavodoxina, proteína ferredoxina-like o NAD(P)H flavin nitrorreductasa.

El mecanismo de resistencia a metronidazol es menos conocido pero parece ser que el principal mecanismo es la inactivación del gen *rdx*, que codifica para una nitrorreductasa insensible al oxígeno (162). La inactivación se puede producir por una mutación puntual que crea un codón de terminación adicional, dando lugar a una proteína truncada o por la inserción de una secuencia IS605. Otros genes, como *frxA*, *fdxB*, *ribF* o *mdaB*, pueden tener también implicación en la resistencia (163–166).

-Clarithromicina: Es el macrólido más utilizado por su mayor estabilidad en medio ácido (167). Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas mediante su acción a nivel de los ribosomas bacterianos (168). Bloquean la función de la región

peptidiltransferasa del ARNr 23S, impidiendo la extensión de las cadenas proteicas y causando la liberación de péptidos incompletos.

El mecanismo de resistencia a macrólidos observado en *H. pylori* es debido a una mutación en la secuencia de la región peptidiltransferasa del ARN ribosómico 23S en la subunidad 50S (169–171).

-Furazolidona: los nitrofuranos tienen también buena actividad frente a *H. pylori*, siendo furazolidona el más eficaz en la curación de la úlcera duodenal y en erradicar *H. pylori* de la mucosa gástrica. El mecanismo de acción es similar al del metronidazol: reducción de la prodroga llevando a la formación de radicales nitro aniónicos y se produce daño del ADN. El mecanismo de resistencia no se conoce pero es diferente del de metronidazol porque la resistencia no es cruzada.

-Levofloxacino: Inhibe la replicación del ADN bacteriano porque interacciona con la topoisomerasa II (responsable del superenrollamiento negativo del ADN) la cual es un tetrámero con dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. La función de estas enzimas es mantener una estructura que facilite la replicación y transcripción. Están contraindicadas en niños y embarazadas por su toxicidad a nivel articular.

En cuanto a los mecanismos de resistencia descritos principalmente son alteraciones en alguna de las subunidades de la ADN-girasa, mutaciones en el *gyrA* y *gyrB*. Otro mecanismo de resistencia de las bacterias a las quinolonas puede ser por alteraciones de porinas, debido a la disminución en la acumulación de antibiótico, bien por descenso en la permeabilidad de la membrana externa o mediante un incremento de la expresión de un sistema de expulsión activa.

-Rifabutina: Es un antibiótico macrocíclico derivado semisintético de la rifampicina con la que comparte mecanismo de acción: inhibe la transcripción bacteriana por unión a la subunidad β de la ARN polimerasa. Ha demostrado elevada eficacia en *H. pylori* (153).

3.1.7.5. Causas de fracaso del tratamiento

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento (dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento y el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones), factores del paciente (falta de adherencia al tratamiento) o factores de las cepas (172). Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa (173).

3.1.8. Detección de resistencias

La detección de resistencias frente a los antimicrobianos disponibles para el tratamiento puede realizarse mediante métodos fenotípicos (basados en la apariencia macroscópica tras el cultivo de la bacteria) o genotípicos (basados en la detección de los genes y las mutaciones implicadas en la resistencia). Los métodos fenotípicos tienen como inconvenientes el lento crecimiento de *H. pylori* y la fácil contaminación de los cultivos. Los métodos genotípicos son más rápidos, tienen buena correlación con los fenotípicos y son capaces de detectar infecciones mixtas por cepas sensibles y resistentes.

3.1.8.1. Métodos fenotípicos

-Dilución en agar: Es considerado como el método fenotípico de referencia por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (174). Permite conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI), sin embargo, es un método poco útil para realizarlo de forma rutinaria, ya que es laborioso y poco rentable si se estudian pocas cepas. Se utiliza sobretodo para realizar estudios para conocer la tasa global de resistencia en un área determinada.

-Difusión con disco: Se trata del método fenotípico más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*. Sin embargo los resultados que se obtienen no siempre se correlacionan con los obtenidos por el método de dilución en agar. Se ha observado buena correlación para levofloxacino (175), metronidazol y claritromicina y una débil correlación para amoxicilina y tetraciclina (176).

-Método del epsilómetro (ETest): es un método fenotípico cuantitativo basado en la difusión, que permite conocer la CMI. Este método está especialmente recomendado para determinar la sensibilidad de microorganismos fastidiosos y cuando se prueban pocos antibióticos. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (177) y el European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (178) recomiendan este método para detectar la resistencia en *H. pylori*.



Figura 5. Determinación de la sensibilidad de *H. pylori* por el método del epsilómetro.

3.1.8.2. Métodos genotípicos

Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la detección de mutantes que confieren resistencia a determinados antibióticos. En el caso de *H. pylori* estas técnicas resultan principalmente útiles en el estudio de sensibilidad frente a claritromicina y fluorquinolonas debido a que:

- Para claritromicina un alto porcentaje de las resistencias se deben a mutaciones localizadas en dos únicos puntos: las posiciones 2142 y 2143.
- Para fluorquinolonas un porcentaje importante de las resistencias se debe a mutaciones en los nucleótidos que codifican los aminoácidos de las posiciones 87, 88, 91 y 97 de la ADN girasa.

Por tanto, las ventajas de los métodos moleculares para la detección de resistencias frente al cultivo son principalmente su rapidez, buena correlación y la eliminación del peligro de contaminación, pero como inconveniente que, de momento, no se puede utilizar rutinariamente para estudiar todos los antibióticos con actividad frente a *H. pylori*.

Actualmente existen kits comerciales, basados en la PCR en tiempo real, diseñados para detectar la presencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a la claritromicina (179).

3.2. Microbioma

3.2.1. Generalidades

Una enorme cantidad de microorganismos colonizan y forman comunidades complejas en el cuerpo humano. Estas comunidades incluyen eucariotas, arqueas, bacterias y virus. Esta microbiota se encuentra en diversos sitios del cuerpo humano (piel, boca, vías respiratorias, vagina, tracto gastrointestinal) con diferentes condiciones fisiológicas y como resultado diferentes microbiotas (Figura 6). Por otra parte, la microbiota de las distintas partes del cuerpo humano juega un papel importante en la salud humana, tanto en el metabolismo, en la homeostasis del sistema inmune, y en la resistencia a la colonización (180).

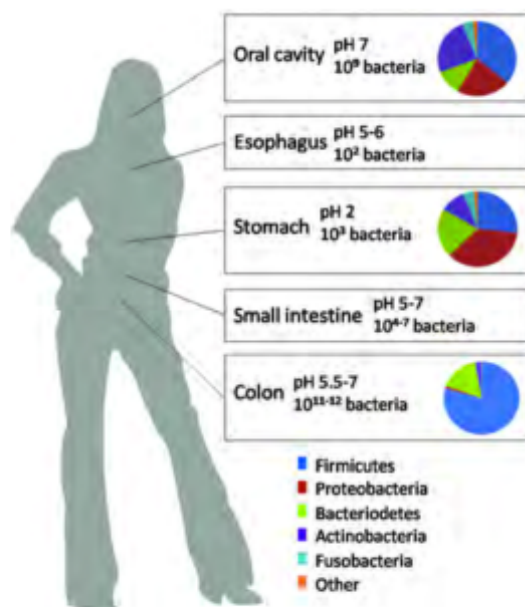


Figura 6. Distribución de los filos bacterianos más abundantes en los distintos sitios anatómicos del cuerpo humano.

El hecho de que los distintos microorganismos prosperen en un área determinada depende de factores fisiológicos tales como la temperatura, la humedad y la presencia de determinados nutrientes y sustancias inhibitorias.

Se estima que el número medio de células bacterianas en el cuerpo humano es diez veces el número de células humanas. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, la microbiota humana supone solamente un 1-3% de la masa corporal.

Estos microorganismos generalmente no son perjudiciales para nosotros, de hecho, son esenciales para mantener la salud. Por ejemplo, producen algunas vitaminas que nosotros no podemos sintetizar, rompen nuestra comida para extraer los nutrientes que necesitamos para sobrevivir, enseñan a nuestro sistema inmunológico cómo reconocer invasores peligrosos e incluso producen compuestos antiinflamatorios. Un número cada vez mayor de estudios han demostrado que los cambios en la composición de nuestra microbiota se correlacionan con numerosos estados de enfermedad, aumentando la posibilidad de que la manipulación de estas pueda ser utilizado para tratar la enfermedad.

En 2008 los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH) lanzaron un proyecto de colaboración internacional llamado "The human microbiome project" cuyas siglas en inglés son (HMP), este proyecto tiene como objetivo generar recursos que permitan la caracterización integral del microbioma humano y el análisis de su papel en la salud humana y la enfermedad.

La microbiología tradicional se ha centrado en el estudio de las especies individuales como unidades aisladas. Sin embargo, la gran mayoría de especies microbianas nunca se han aislado con éxito como especímenes viables para el análisis, presumiblemente debido a que su crecimiento es dependiente de un microambiente específica que no ha sido, o no se puede, reproducir experimentalmente. Los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN han creado un nuevo campo de investigación, la metagenómica, lo que permite un examen exhaustivo de las comunidades microbianas, sin necesidad de cultivo. En

vez de examinar el genoma de una cepa bacteriana que se ha cultivado en un laboratorio, el enfoque de la metagenómica examina la colección de genomas derivados de las comunidades microbianas muestreados de entornos naturales.

Llegado a este punto, hay que saber diferenciar dos términos: Microbiota y microbioma. La microbiota normal o flora microbiana normal es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano. Sin embargo el microbioma es un término utilizado para hacer referencia al conjunto de los genes de todos los microorganismos componentes de la microbiota.

La determinación más común del microbioma consiste en la extracción del ADN de una muestra biológica, seguido de la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (181). Las características para ser considerada como cronómetro molecular son (182):

1. Se trata de una molécula antigua que está presente en todas las bacterias actuales. Por lo que constituye una diana universal para la identificación bacteriana.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas. Sin embargo, presenta variabilidad suficiente para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.

4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos muy extensas, en continuo crecimiento.

3.2.2. Microbioma oral

En cuanto al microbioma oral, según el “Human Oral Microbiome Database” (HOMD) (183) hay aproximadamente 700 especies procariotas presentes en la cavidad oral humana. Aproximadamente el 49% son especies conocidas oficialmente, el 17% no tienen nombre (pero han sido cultivadas) y el 34% son conocidos sólo como filotipos no cultivados.

La cavidad oral representa el 26% del microbioma humano y contiene un número de diferentes hábitats, incluyendo dientes, surco gingival, lengua, mejillas, paladar duro y blando, amígdalas, etc., todos ellos colonizados por bacterias con características diferentes, que se suelen presentar como películas bacterianas más que como entes aislados.

La microbiota bucal puede verse alterada con la incorporación de diversas bacterias oportunistas que modifican sus características iniciales y pueden ayudar a la formación de diferentes placas bacterianas que se suelen adherir a los dientes en forma de biofilm. Así, un biofilm cariogénico, puede metabolizar los azúcares de la dieta, producir ácidos orgánicos que desmineralizan la superficie dental y favorecer la caries. Otro tipo de biofilm, caracterizado por microorganismos periodontopatógenos, puede provocar una gingivitis o algún tipo de periodontitis.

En una boca sana suele haber unos 600 microorganismos diferentes. Sin embargo, en presencia de una patología suele disminuir drásticamente ese número. Por ejemplo, en el caso de la caries, la disminución es de 600 a 160 aproximadamente, desapareciendo sobre todo las más resistentes a la acidez, lo que induce a pensar, que por una parte las especies que desaparecen pueden tener un papel protector y por otra parte la adición de probióticos podría ser útil para la prevención o el tratamiento de las correspondientes patologías.

Estudios recientes del equipo del Dr Alex Mira, han descubierto una nueva especie bacteriana de la cavidad oral, bautizada como *Streptococcus dentisani* que produce unos péptidos (bacteriocinas) que aniquilan a las bacterias causantes de la caries (184). Por ello, el grupo del Dr. Alex Mira no es partidario del uso de antibióticos que destruyen la flora bacteriana oral, sino de favorecer la colonización bucal mediante bacterias beneficiosas para conseguir una microbiota saludable que impida la formación de las caries.

3.2.3. Microbioma esofágico

En cuanto al microbioma esofágico algunos autores plantean que no existe una colonización permanente ya que el esófago es un conducto virtual (está colapsado por la musculatura que lo rodea para evitar regurgitaciones), por lo que la comida se abre paso a su través y arrastra a los posibles microorganismos que pudieran intentar establecerse en él (185).

Sin embargo, otros autores defienden que el microbioma esofágico es un microbioma permanente en el que domina principalmente el filotipo Firmicutes (186) aunque también se encuentran presentes microorganismos de los siguientes phyla: Bacteroides, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, and TM7. Los

géneros más prevalentes son *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Granulicatella* and *Prevotella* (187).

Estudios recientes describen que el microbioma esofágico puede estar alterado en diversas patologías como en la esofagitis eosinofílica (186,188) o en el reflujo esofágico (189).

3.2.4. Microbioma gástrico

Durante muchos años el estómago fue considerado como un órgano estéril sin una flora normal y solo con una microbiota transitoria asociada con la ingestión de comida. De hecho se pensaba que debido a las secreciones gástricas del estómago, ningún microorganismo podría sobrevivir debido a las condiciones ácidas del medio (190). Esta corriente cambió, cuando en 1875 se visualizaron por primera vez unos bacilos Gram negativos con forma de espiral, lo que actualmente conocemos como *H. pylori*. El hecho de que esta bacteria pueda sobrevivir en el estómago, nos lleva a pensar a que tal vez otras bacterias también se puedan adaptar a las condiciones adversas del estómago. Además con la llegada de la metagenómica, hemos podido estudiar este nicho ecológico, comprobando que no solo *H. pylori* puede estar presente en el estómago. Los filotipos más abundantes en el estómago que suponen un 97% de las secuencias son Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria.

3.2.5. Microbioma intestinal

Nuestra microbiota intestinal contiene 100 billones de microorganismos, incluyendo como mínimo 1.000 especies diferentes de bacterias que comprenden

más de 3 millones de genes, 150 veces más que en el genoma humano. De hecho, la microbiota intestinal puede pesar hasta 2 kg (191).

La mayoría de las especies de nuestra microbiota intestinal pertenecen a los filotipos Firmicutes y Bacteroidetes y alcanza las concentraciones más elevadas en el íleon terminal y sobretodo en el colon (192,193). Además, la mayoría de las personas comparten una microbiota que constituye el núcleo de la misma y que comprenden de 50 a 100 especies de bacterias, es decir, solo un tercio de nuestra microbiota intestinal es común a la mayoría de la gente, mientras que los otros dos tercios son específicos en cada persona. El colon es el mayor lugar de colonización, con un contenido de 1,5 kg de masa microbiana, que equivalen a 10^{14} microorganismos (194,195). La composición de la microbiota varía a lo largo del tracto gastrointestinal en sus diferentes porciones (196).

La mayoría de los estudios sobre la microbiota intestinal están basados en el análisis de las heces, ya que se trata de una muestra cuya recolección es sencilla y no invasiva. Las bacterias detectadas en las heces son una mezcla de las bacterias de la luz intestinal y de aquellas libres o mal adheridas a la mucosa. Por lo que, esta microbiota podría no representar a todas las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal. Por otra parte un almacenamiento de la muestra inadecuado o un retraso en el procesamiento, puede ser clave a la hora de poder detectar microorganismos especialmente lábiles como los anaerobios (197).

Aunque cada uno de nosotros tiene una microbiota única, nuestra microbiota intestinal cumple distintas funciones fisiológicas, con un impacto directo en nuestra salud, como por ejemplo:

- Ayuda al cuerpo a digerir ciertos alimentos que el estómago y el intestino delgado no son capaces de digerir.

- Contribuye a la producción de algunas vitaminas (B y K).
- Ayuda a combatir las agresiones de otros microorganismos, manteniendo la integridad de la mucosa intestinal.
- Desempeña un papel importante en el sistema inmune, actuando como efecto barrera.
- Una microbiota intestinal saludable y equilibrada es fundamental para asegurar una función digestiva adecuada.

En Diciembre de 2013, se desarrolló un proyecto “MyNewGut” financiado por la Unión Europea que investiga la influencia del microbioma intestinal en la salud y el bienestar. Este proyecto, pretende estudiar y desarrollar estrategias dietéticas que ayuden a la prevención de la obesidad y de trastornos del comportamiento relacionados con el estilo de vida.

3.2.6. Evolución de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo

Antes del parto, el feto crece y se desarrolla en el útero materno en un ambiente estéril (198). Sin embargo, tras el inicio del parto, el recién nacido es rápidamente colonizado por microorganismos: los de la madre (vaginal, heces, piel, pecho...), los del entorno en el que tiene lugar el nacimiento, el aire, etc. Desde el tercer día, la composición de la microbiota intestinal depende directamente de cómo el bebé es alimentado: la microbiota intestinal de los bebés con lactancia materna, por ejemplo, estará dominada principalmente por bifidobacterias, y difiere de la de los bebés alimentados con lactancia artificial. Se considera que la microbiota se estabiliza alrededor de los 3 años y que a partir de ese momento ya es similar a la

de los adultos, continuando su evolución a un ritmo más estable durante el resto de la vida.

3.2.7. Técnicas de estudio de microbioma: Metagenómica

Durante décadas, el estudio de la microbiota bacteriana se ha realizado a través de técnicas dependientes de cultivo que involucran el aislamiento y el cultivo de microorganismos previo a su identificación de acuerdo a características morfológicas, bioquímicas y genéticas. Se estima que hasta 99% de los microorganismos observables en la naturaleza de forma típica no pueden cultivarse por técnicas estándar (199).

La aparición de las técnicas moleculares ha ocasionado un cambio profundo, permitiendo la identificación de microorganismos no cultivados y establecer entre ellos relaciones filogenéticas (200,201).

La metagenómica es una nueva aplicación de la Biología Molecular, que permite el estudio desde un punto de vista genómico de comunidades microbianas, a partir de ADN genómico extraído de muestras sin que hayan sido cultivadas en el laboratorio. El desarrollo en los últimos años de las técnicas de secuenciación masiva o NGS (Next Generation Sequencing) permiten actualmente obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido.

Las NGS se caracterizan por la secuenciación al azar de miles de fragmentos. Éstas se clasifican en NGS de segunda y tercera generación según requieran un paso de amplificación clonal previo a la secuenciación o no, respectivamente. En las NGS de segunda generación, la amplificación clonal se puede realizar mediante PCR en emulsión (454, Solid, Ion torrent) o en puente (Illumina). Las cuatro plataformas

principales de secuenciación de segunda generación se diferencian en las químicas de detección, rendimientos y costes y son las siguientes:

-Roche/454FLX: esta plataforma utiliza una técnica de pirosecuenciación del ADN. Se trata de una técnica basada en la polimerización no fluorescente que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido; producen una imagen que se analiza para proporcionar flujogramas que, una vez interpretados por el ordenador, devuelven las secuencias de nucleótidos. Su gran ventaja es la longitud de las lecturas generadas, permite secuenciar fragmentos de alrededor de 400 pares de bases, lo que la convierte en una técnica idónea para la secuenciación *de novo*. Pero su gran inconveniente son los costes y la dificultad de secuenciación de regiones homopoliméricas.

-Illumina (MiSeq, HiSeq y NextSeq): utiliza también un método basado en la polimerización del ADN, pero con la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia y protegidos de forma reversible para impedir la extensión de la cadena naciente. La eliminación controlada del grupo protector tras la detección, permite realizar varios ciclos de extensión y aumentar la longitud de los fragmentos generados. Esta técnica es una de las más potentes en cuanto a información generada y costes. Permite secuenciar fragmentos de 150 +150 pares de bases.

-SOLiD: El sistema SOLiD (Life Technologies) es una tecnología de secuenciación por ligación de una batería de octámeros marcados con fluorescencia y de secuencia conocida. Permite secuenciar fragmentos de 75+35 pares de bases.

-Ion Torrent: se basa en la detección de iones H⁺ liberados por la polimerasa tras la incorporación de un nucleótido. De esta forma, se puede ahorrar costes y tiempo respecto a otras tecnologías. Permite secuenciar fragmentos de 100 pares de bases.

Recientemente se están desarrollando nuevas plataformas, llamadas de tercera generación:

-HeliScope de Helicos BioSciences: se basa en la secuenciación de billones de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida. El procedimiento es similar al de Illumina pero se utiliza un mismo fluoróforo y los nucleótidos son suministrados individualmente en un orden predeterminado.

-PacBio (Pacific Biosciences) se caracteriza por la longitud las lecturas, que pueden alcanzar más de 1.000 nucleótidos. Esta técnica ancla la ADN polimerasa a una superficie sólida (nanoporo) y realiza una secuenciación basada en fluorescencia de 4 colores en tiempo real.

3.2.8. Análisis bioinformático de los datos

El continuo desarrollo de las plataformas de secuenciación de alto rendimiento ha dado lugar a un incremento vertiginoso en la cantidad de datos genómicos generados, que un ordenador común no puede manejar (202). A diferencia de los

sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación en un tiempo récord y por coste cada vez más reducido. Por ello, una parte muy importante en el esquema de trabajo de un experimento de NGS es el análisis computacional .

Las ciencias informáticas han tomado una relevancia crítica en la NGS en el sentido de que sus capacidades son esenciales para manejar y analizar datos biológicos. Algunas de las plataformas informáticas que existen son:

- R: es un entorno y un lenguaje para el cálculo estadístico y la generación de gráficos. Este programa estadístico ofrece un lenguaje de programación completo con el que añadir nuevas técnicas mediante la definición de funciones. Es decir, provee un acceso relativamente sencillo a una amplia variedad de técnicas estadísticas y gráficas.
- QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology): es una plataforma bioinformática, gratuita, que contiene distintas herramientas para analizar y comparar distintas comunidades microbianas. Esta plataforma está diseñada para permitir a los usuarios obtener gráficos y estadísticas de calidad de publicación a partir de los datos de secuenciación generados en Illumina o en otras plataformas.
- Galaxy: es una plataforma online que ofrece una serie de recursos para el análisis metagenómico y el análisis funcional, destinados tanto a la investigación como a el uso académico.
- Ribosomal DataBase Project (RDP): es una base de datos del gen 16S ARNr, que además contiene herramientas para analizar secuencias del gen 16S ARNr.

3.2.9. Medidas de la diversidad

La medida de la diversidad es importante para entender la estructura de las comunidades microbianas. La caracterización de las comunidades microbianas utilizando secuencias de la subunidad pequeña del gen 16S ARN ribosomal ha revelado una amplia diversidad, anteriormente insospechable, especialmente ahora que las plataformas de secuenciación permiten producir cientos de miles de secuencias de cientos de muestras.

Además del significado que tiene en si misma la diversidad, es también un parámetro útil en el estudio y descripción de las comunidades microbianas. En este sentido Whittaker introdujo en 1972 los términos de alfa y beta diversidad que hoy nos van a servir para poder comparar la diversidad de las distintas comunidades microbianas (203).

Podemos definir la diversidad alfa, como la riqueza de especies de una comunidad a la que consideramos como homogénea (204). Esta diversidad puede ser medida según el número de especies presentes o bien según la distancia filogenética que hay entre estas especies.

En cuanto a la diversidad beta, mide la diversidad entre varias muestras. Es decir, mide las diferencias en la composición bacteriana de dos o más muestras. Estas diferencias podrán ocurrir en el espacio, cuando las mediciones se hacen en sitios distintos en un mismo tiempo, o el en tiempo, cuando las mediciones se realizan en el mismo sitio pero en distintos tiempos.

La beta diversidad se puede medir de forma cuantitativa (weighted) o cualitativa (unweighted), en la primera se considera la abundancia de los microorganismos observados, mientras que en la segunda solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia.

3.2.10. Composición taxonómica de las comunidades microbianas

Como hemos visto anteriormente, el gen 16S es común en todas las bacterias y contiene regiones constantes y variables, por tanto, las similitudes y diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen 16S permiten la caracterización taxonómica de las bacterias que componen una comunidad, pudiendo discernir entre estratos de dominio y phylum hasta nivel de género y en algunos casos, especie. La descripción del perfil taxonómico, se basa en la comparación de las secuencias del gen 16S de la muestra a estudiar con las secuencias de referencia de bases de datos.

3.2.11. Heatmap

Un heatmap o mapa de calor es un gráfico en el que se resaltan mediante un código de colores la abundancia relativa de los diferentes taxa en cada muestra. Los heatmaps son increíblemente útiles para la presentación visual de los datos obtenidos por secuenciación de alto rendimiento. Estos gráficos pueden variar desde bloques muy simples de color con listas a lo largo de 2 lados, o pueden incluir información acerca de la agrupación jerárquica, y / o valores de otras covariables de interés.

3.2.12. LEfSe (LDA Effect Size)

LEfSe es una técnica estadística multivariante cuya finalidad es describir si existen diferencias significativas entre grupos, sobre los que se estudian n variables (variables discriminativas). Es un algoritmo para el descubrimiento de biomarcadores y la identificación de características genómicas (genes, pathways o taxa) estudiando la diferencia entre dos o más condiciones biológicas.

Esta herramienta identifica primero de forma robusta las características que son estadísticamente diferentes entre las clases biológicas. A continuación, realiza pruebas adicionales para determinar si estas diferencias son consistentes con respecto al comportamiento biológico esperado (205).

3.2.13. PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States)

PICRUST es un software de bioinformática diseñado para predecir el contenido del metagenoma del gen marcador (16S ARNr). Esta plataforma realiza la predicción metagenómica basándose en la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (206). Los pathways de la KEGG se desarrollan a partir del conocimiento experimental de la literatura publicada.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Determinar el estado de infección de *H. pylori*, mediante una PCR cuantitativa en tiempo real específica para esta bacteria comparando los resultados con los obtenidos con las técnicas convencionales realizadas sobre biopsia gástrica en una población pediátrica.
2. Analizar las diferencias en las características demográficas y clínicas (sexo, edad, índice de masa corporal, inflamación gástrica) en los pacientes pediátricos positivos y negativos para *H. pylori*, y en la carga bacteriana de *H. pylori* y de bacterias totales en las biopsias gástricas.
3. Aportar información sobre el microbioma que coloniza la cavidad gástrica de pacientes pediátricos infectados/colonizados por *H. pylori* comparándolo con el de los no colonizados, mediante la medida de la alfa diversidad (diversidad en una muestra) y de la beta diversidad (diversidad entre muestras). Analizar los resultados obtenidos en función de las características clínico-demográficas de los pacientes.
4. Realizar el estudio taxonómico del microbioma gástrico para determinar la diferente abundancia relativa de comunidades microbianas entre los pacientes positivos y negativos para *H. pylori* y las características demográficas y clínicas, y analizarlo mediante el análisis LEfSe (LDA Effect Size) y mediante la realización de un mapa de calor (heatmap).

5. Estudiar el microbioma intestinal de los pacientes pediátricos incluidos en este estudio, agrupándolos en función de su estado frente a *H. pylori* y de diferentes características clínico-demográficas y analizar la alfa y la beta diversidad, así como la composición taxonómica.

6. Comparar la composición bacteriana del microbioma gástrico con la del microbioma intestinal mediante un estudio conjunto de la alfa y beta diversidad y de análisis taxonómico, así como cuantificar la densidad de bacterias totales mediante PCR cuantitativa basada en el 16S ARNr en estos dos tipos de muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Selección de pacientes y muestras

Se estudiaron 51 pacientes desde octubre de 2013 hasta enero de 2014, que fueron atendidos en la Sección de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Niño Jesús y del Hospital Doce de Octubre por presentar sintomatología digestiva. Se recogieron datos demográficos y clínicos de cada uno de los pacientes, incluyendo: peso y talla, sexo, nacionalidad, tipo de parto (natural o cesárea), tratamiento previo y sintomatología.

Los criterios de inclusión en la selección de pacientes fueron:

- Pacientes con sospecha de infección por *H. pylori* y prueba del aliento positivo. Menores de 18 años.
- Pacientes de grupo control: pacientes con prueba del aliento negativo. Menores de 18 años.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con tratamiento antibiótico anti-*Helicobacter pylori* en el último mes.
- Pacientes con tratamiento antibiótico por cualquier motivo en las últimas 2 semanas.
- Pacientes con tratamiento con probióticos en las últimas 2 semanas.

Se realizó una endoscopia digestiva de estos pacientes, con la consiguiente toma de biopsia gástrica para estudio de *H. pylori* y estudio de microbioma gástrico. En el momento de la endoscopia se recogió un exudado rectal para estudio del microbioma intestinal.

5.2. Transporte de las muestras

Las biopsias obtenidas de pacientes sintomáticos mediante endoscopia se recogieron en un tubo estéril y fueron enviadas a una temperatura de 4°C al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Princesa donde fueron procesadas en menos de 3 horas. En caso de que el envío y recepción de la muestra fueran a superar las 24 horas las muestras se congelaron a -80°C para mantener su viabilidad.

El exudado rectal y una segunda biopsia se enviaron al laboratorio de investigación del VA Medical Center, Nueva York, donde se llevó a cabo el estudio del microbioma. Este envío se realizó con hielo seco, de forma que se mantuvo la cadena de frío.

5.3. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico de *H. pylori*

5.3.1. Test rápido de la ureasa (TRU)

El Test Rápido de la Ureasa (TRU) (CLOtest, Kimberly-Clark) se realizó en el momento de la endoscopia. La biopsia de antro gástrico fue introducida en el kit, se dejó a temperatura ambiente y se observó a las 3 horas siguientes y hasta un máximo de 24 horas para evidenciar un cambio de color de amarillo a rosa, que se considera positivo (207).

5.3.2. Cultivo

El cultivo se realizó en aquellos pacientes que fueron positivos por el TRU (n=17), y en 5 pacientes en los que el pediatra tenía alta sospecha clínica, a pesar de que el TRU había sido negativo.

Para la realización del cultivo, cada biopsia se sembró por rotación repetida con ayuda de una torunda sobre la superficie de dos medios de cultivo comerciales:

- Una placa de Agar Sangre (Columbia Agar con 5% de sangre de oveja; BioMèrieux).
- Una placa de medio selectivo, Agar *Pylori* (*Pylori* Agar; BioMèrieux).

Ambos tipos de placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) durante 15 días a lo largo de los cuales fueron revisadas periódicamente para detectar la presencia de colonias pequeñas y translúcidas compatibles con el aspecto y morfología de *H. pylori*.

Una vez extendida la biopsia sobre la superficie del agar, la biopsia restante se congeló a -80°C para estudios posteriores.

Las colonias sugestivas por tamaño, forma y aspecto fueron confirmadas como colonias de *H. pylori* por ser positivas para las pruebas bioquímicas de la ureasa, catalasa y oxidasa y al observarse microscópicamente bacilos con forma espiral Gram negativos.

5.3.3. Histología

La evaluación histopatológica de las biopsias de antro gástrico fue realizada siguiendo los procedimientos habituales, preparando secciones histológicas y tiñéndolas con hematoxilina-eosina. Todas las preparaciones histológicas fueron revisadas por un patólogo que desconocía el resto de resultados diagnósticos. El test fue considerado como positivo para *H. pylori* cuando se observaron bacilos con forma espiral. Se recogió el grado de inflamación y la patología asociada. Los resultados se informaron siguiendo la versión actualizada del sistema de Sydney (208).

5.3.4. PCR cuantitativa específica para *H. pylori*

Se realizó una PCR cuantitativa específica para *H. pylori*. Se utilizaron los primers que indicaban en el protocolo del laboratorio del Dr. Guillermo Pérez y Dra. Gao (NYU Langone Medical Center, Nueva York).

La curva de calibración se preparó con la cepa de *H. pylori* 26695. Los ensayos se realizaron utilizando el sistema de Roche LightCycler 480 II. El ensayo se llevó a cabo en duplicado y los resultados se analizaron utilizando el programa LightCycler480 II (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN).

La sensibilidad y especificidad de la qPCR como método diagnóstico se calculó considerando todos los Cp (Crossing point) posibles. Se realizó una curva ROC y se eligió el Cp con mayor sensibilidad y especificidad.

Utilizamos el valor Cp (crossing point) de 35 como punto de corte, de tal forma que los resultados con valor Cp por debajo de 35 son positivos y por encima de 35 son negativos (Gao and Llorca *et al.*, unpublished data). Información más detallada se encuentra en el apartado PCR Cuantitativa.

Para la determinación del punto de corte que permitía indicar el estado de positividad frente a *H. pylori* mediante la PCR cuantitativa específica para este microorganismo, se seleccionaron las muestras que cumplieron uno de los siguientes criterios:

-Verdadero positivo: cuando todos los métodos realizados (Test Rápido de la ureasa, cultivo e histología) fueron positivos (n=8).

-Verdadero negativo: cuando todos los métodos realizados (Test Rápido de la ureasa, cultivo e histología) fueron negativos (n=27).

5.4. Estudio fenotípico de la sensibilidad

En todas las biopsias en las que se aisló *H. pylori* se estudió la sensibilidad in vitro por difusión en placa mediante ETest frente a los antibióticos más comúnmente utilizados en clínica: claritromicina, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina, rifampicina y levofloxacino. Los ETest fueron depositados sobre placas de agar sangre previamente inoculadas con torunda.

Las placas se incubaron en atmósfera microaerofílica leyéndose inicialmente a los tres días y definitivamente a los cinco. En dicha lectura se utilizaron los puntos de corte establecidos por el EUCAST:

Antibiótico	CMI (mg/L)	
	Sensible <=	Resistente >
Amoxicilina	0.12	0.12
Claritromicina	0.25	0.5
Levofloxacino	1	1
Metronidazol	8	8
Rifampicina	1	1
Tetraciclina	1	1

Tabla 4. Puntos de corte según EUCAST

5.5. Extracción de ADN

5.5.1. Extracción de ADN a partir de biopsias gástricas

En las muestras de biopsias gástricas la extracción del ADN se efectuó con UltraClean®Tissue&Cells DNA Isolation Kit (MoBioLaboratories, Inc. California, USA), siguiendo las instrucciones el protocolo indicado por la casa comercial:

1. Homogenización: Se añade la biopsia a los “DryBeadTubes”. Son tubos proporcionados en el kit que van precargados con perlas para la lisis y homogenización de la muestra. Posteriormente se añade 700 µl de la SoluciónTD1, 15 µl de la proteinasa K, se homogeniza con PowerLyzer™24 y por último se centrifuga.
2. Unión del ADN: se transfiere todo el volumen de muestra a un eppendorf con filtro que incluye el kit. Se trata de unos eppendorfs con una membrana de sílice en su interior. A dicha membrana se une el ADN cuando la concentración de sales es elevada gracias a la Solución TD1, posteriormente se centrifuga y se descarta todo el líquido.
3. Lavado: se añade 400 µl de la Solución TD2, se centrifuga y se descarta el líquido y se repite este proceso para eliminar el líquido restante.
4. Elución: cuidadosamente se coloca el filtro en un eppendorf nuevo de 2ml. Se añade 50 µl de la Solución TD3 en el centro de la membrana del filtro. El ADN se separa de esta membrana cuando la concentración salina en el medio es baja (Solución TD3). Este proceso de unión-lavado-elución, permite separar el ADN del resto de componentes presentes inicialmente. Se centrifuga y se descarta el filtro. Por último, se mantiene el ADN congelado (-20°C a -80°C).

5.5.2. Extracción de ADN a partir de los exudados rectales

Para las muestras de exudados rectales se utilizó PowerLyzer®PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBioLaboratories, Inc. California, USA), siguiendo las instrucciones el protocolo indicado por la casa comercial:

1. Homogenización: se inserta la torunda en el tubo precargado con perlas para la lisis y homogenización de la muestra. Se añaden 750 μ l de la “BeadSolution” y 60 μ l de la Solución C1, se homogeniza con PowerLyzer™24 y por último se centrifuga y se transfiere el sobrenadante a un nuevo eppendorf de 2ml. El volumen esperado de sobrenadante es entre 400-500 μ l.
2. Precipitación de proteínas: se añaden 250 μ l de la Solución C2 y se mezcla. Se incuba a 4°C durante 5 minutos y se centrifuga. Evitando el pellet, se transfiere hasta 600 μ l del sobrenadante a un nuevo eppendorf de 2ml.
3. Tecnología de eliminación de inhibidores: se añade 200 μ l de la Solución C3 y se mezcla. Se incuba a 4°C durante 5 minutos y se centrifugar. Evitando el pellet, se transfiere hasta 600 μ l del sobrenadante a un nuevo eppendorf de 2ml.
4. Unión del ADN: se añade 1200 μ l de la Solución C4 al sobrenadante y se mezcla. Se carga 650 μ l en un eppendorf con filtro. Se centrifuga y se descarta todo el líquido. Se repite esta operación 2 veces más.
5. Lavado: se añaden 500 μ l de la Solución C5, se centrifuga y se descarta el líquido.
6. Elución: se coloca el filtro en un eppendorf nuevo de 2ml. Se añade 100 μ l de la Solución C6 en el centro de la membrana del filtro. Se centrifuga y se descarta el filtro. Se mantiene el ADN congelado (-20°C a -80°C).

5.5.3. Determinación de la concentración del ADN

Para medir la concentración de ácidos nucleicos (ng/ μ l) en nuestras muestras utilizamos el NanoDrop ND 1000, que es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-750 nm) que mide 1 μ l de muestra con una alta precisión y reproducibilidad. Utiliza una tecnología de retención de la muestra que se basa en la tensión superficial únicamente para mantener la muestra en el lugar.

Además de medir la concentración de ácidos nucleicos también mide la pureza, al medir los ratios de absorbancia a 260/280 nm y a 260/230 nm.

Procedimiento: se añade 1 μ l de muestra en el extremo de un cable de fibra óptica (la fibra receptora). Un segundo cable de fibra óptica (la fibra de origen) se pone en contacto con la muestra reduciendo la brecha entre los extremos de la fibra óptica. Una lámpara de flash de xenón pulsada proporciona la fuente de luz y un espectrómetro que utiliza una matriz CCD se utiliza para analizar la luz después de pasar a través de la muestra. El instrumento se controla mediante un software especial y los datos se registran en un archivo en el PC.



Figura 7. NanoDrop, espectrofotómetro para medir la concentración del ADN.

5.6. Detección del gen *cagA*

Los primers utilizados para la detección del gen *cagA* fueron:

Forward (*cagA*-F-Xba-I): GCTCTAGAATGACTAACGAAACTATTGATCAA

Reverse (*cagA*-600-R-Nhe-I): GGGGCTAGCTTCTTGCCTCTCTTTCAAAGATTCATC

Los componentes de la PCR fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
H ₂ O	34.75
10x Buffer	5
dNTPs	4
Primer Forward	2.5
Primer Reverse	2.5
Taq	0.25
Total	49

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	35
Hibridación	50	30 seg	
Extensión	72	1.5 min	
Extensión final	40	30 seg	1

El revelado de la PCR, se realizó por electroforesis en gel de agarosa utilizando geles al 2% (Roche Diagnostics) en TAE-buffer 1x (Merck KGaA) y como marcador de peso molecular se empleó el 50 pb ladder (Novagen).

5.7. Estudio de la densidad bacteriana mediante PCR cuantitativa a tiempo real

5.7.1. Densidad de *H. pylori*

La determinación de la densidad de *H. pylori* se realizó con una PCR cuantitativa a tiempo real del gen 16S rARN específico para *H. pylori*, en las muestras de biopsia gástrica y en los exudados rectales. Como se ha descrito en el apartado 3.3.4 la PCR cuantitativa de las muestras de biopsia gástrica se utilizó como criterio diagnóstico de *H. pylori*.

La PCR en ambas muestras se realizó siguiendo los pasos que se explican a continuación siguiendo las instrucciones de la casa comercial:

-Preparación de una curva de calibrado: Para ello, se midió en primer lugar la concentración de ADN con NanoDrop y dependiendo del número de copias, se creó una curva de calibración con estándares certificados a diferentes concentraciones. Los estándares de *H. pylori* se prepararon desde el 16S rRNA, amplificado de la cepa de *H. pylori* 26695. Las diluciones seriadas (diez veces la dilución) se realizaron utilizando el Buffer EB.

Los componentes de la PCR fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
TaqMan 2x	10
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Probe	0.4
H ₂ O	6.6
Total	18

Posteriormente se dispensaron 18 μ l de la master mix en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, 2 μ l de cada dilución de la curva de calibrado por duplicado y 2 μ l de cada muestra.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	10 seg	45
Hibridación	54	30 seg	
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	40	30 seg	1

5.7.2. Densidad de bacterias totales

Se realizó una PCR cuantitativa para la determinación del número de copias de bacterias totales, en las muestras de biopsia gástrica y en los exudados rectales, siguiendo el protocolo que se explica a continuación:

-Preparación de una curva de calibrado: De la misma forma que en el caso anterior en primer lugar se midió la concentración de ADN con NanoDrop. Dependiendo del número de copias, se creó una curva de calibración con estándares certificados a diferentes concentraciones, para lo que se utilizó ADN de *Escherichia coli*. Usando el Buffer EB se prepararon diluciones seriadas (diez veces la dilución).

Los primers utilizados fueron:

Forward primer 785F: GGATTAGATACCCTGGTA

Reverse primer 907R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT.

Los componentes de la PCR fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
SYBR Green Light Cycler 480 (Roche)	10
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
H2O	6
Total	18

Posteriormente se dispensaron 18 µl de la master mix en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, 2 µl de cada dilución de la curva de calibrado por duplicado y 2 µl de cada muestra.

Las condiciones de amplificación:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	10 seg	40
Hibridación	60	20 seg	
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	72	10	1

5.8. Secuenciación de alto rendimiento

5.8.1. Preparación de la librería de amplicones

Se llevó a cabo por triplicado, una PCR de la región V4 del gen 16S rARN para la preparación de la librería de amplicones. Los primers utilizados fueron los siguientes:

Forward Primer (515F): GTGCCAGCMGCCGCGGTAA

Reverse Primer (806R): GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Los componentes de la PCR fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
H ₂ O	12
5 Prime Hot Master Mix	10
Primer Forward (5µM)	1
Primer Reverse (5µM)	1
ADN	1
Total	25

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	45 sec	35
Hibridación	50	1 min	
Extensión	72	1.5 min	
Extensión final	72	10	1

La reacción se llevó a cabo en el termociclador C1000 Touch™ ThermalCycler (BIO-RAD).

5.8.2. Cuantificación de la concentración de ADN de los amplicones

La cuantificación de la concentración del ADN se determinó mediante el uso de un colorante fluorescente que se une al ADN de doble cadena (PicoGreen®, Molecular Probes) y posteriormente se cuantificó en un fluorímetro.

Esta técnica es mucho más sensible que la medida de la absorbancia a 260 nm, y permite detectar hasta 25 pg/ml de ADN.

El procedimiento es el siguiente:

1. Preparación de una curva de calibrado a partir del estándar proporcionado en el kit: ADN lambda 100 µg/ml.

Concentración del estándar	Volumen (µl)	H ₂ O (µl)	Pocillo
50 µg/mL	10 [Stock 100 µg/mL]	10	A1, A2
25 µg/mL	5 [50 µg/mL]	5	A3, A4
10 µg/mL	2 [Stock 100 µg/mL]	18	A5, A6
5 µg/mL	2 [50 µg/mL]	18	A7, A8
1 µg/mL	2 [10 µg/mL]	18	A9, A10
Blanco			A11, A12

2. Añadir Picogreen diluido 1:200 con Buffer TE 1X
3. Añadir 198 µl en cada pocillo de la placa
4. Añadir 2 µl de la curva de calibrado en los pocillos listados en la tabla.
5. Añadir 2 µl de cada muestra a cada uno de los pocillos de la placa. Sellar con cinta de aluminio.
6. Incubar 2-5 min y leer absorbancia a 490 de excitación y a 535 de emisión durante 0,1 seg.

5.8.3. Preparación del pool de amplicones

Los productos de la PCR (amplicones) son añadidos al pool en la misma cantidad, ya sea a 100, 150, 200 o 300 ng añadiendo distintos volúmenes desde cada pocillo, es decir añadiendo distintos volúmenes de cada muestra.

El pool de amplicones lo hemos realizado a 300 ng, por lo que para averiguar el volumen que debemos añadir de cada muestra se utiliza la siguiente fórmula:

Volumen a añadir (μl) = $300 \text{ ng} / \text{Concentración ADN (ng}/\mu\text{l})$.

En las muestras con baja concentración de ADN, medida por PICOGREEN, se ha añadido todo el volumen del pocillo ($75 \mu\text{l}$) al pool de amplicones.

5.8.4. Purificación del pool de amplicones

Este proceso se lleva a cabo con el kit QIAquickcolumn (QIAGEN).

Para pooles añadidos a 300 ng , $100 \mu\text{l}$ es suficiente para este paso.

5.8.5. Cuantificación del ADN tras la purificación del pool de amplicones

Para llevar a cabo la cuantificación del ADN tras la purificación del pool de amplicones utilizamos Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit.

El procedimiento que se llevó a cabo es el siguiente:

- 1) Establecer el número de tubos de $0,5 \text{ ml}$ que se necesitan para los estándares y las muestras. El ensayo Qubit dsDNA HS requiere 2 standards (incluidos).
- 2) Preparar la solución de trabajo Qubit diluyendo el reactivo Qubit dsDNA HS (tinte; Componente A) 1: 200 en tampón Qubit dsDNA HS (Componente B). Para ello, agregue $1 \mu\text{l}$ del Componente A a $199 \mu\text{l}$ componente B en un tubo de $1,5 \text{ ml}$.
- 3) Para preparar los estándares, añadir $10 \mu\text{l}$ del estándar nº 1 y $10 \mu\text{l}$ del estándar nº 2 para dos tubos de $0,5 \text{ ml}$ separadas. Añadir $190 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo Qubit a cada tubo y agitar para mezclar.
- 4) Para cada una de sus muestras, añadir $2 \mu\text{l}$ de ADN purificado a $198 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo Qubit en un tubo de $0,5 \text{ ml}$. Vortex para mezclar.
- 5) Proceder a la lectura en el Qubit Fluorómetro, en primer lugar de los estándares y en segundo lugar de la muestra.

5.8.6. Combinación de múltiples pools para secuenciación

Añadir cada pool purificado con la misma cantidad de ADN:

1. Calcular la molaridad de cada pool
2. Diluir cada pool a la misma concentración (50 nM, 10 nM, 5 nM)
3. Combinar los pools ajustando por el número de muestras.

5.8.7. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo por medio de la plataforma MiSeq (Illumina). Para ello, se envió el pool de amplicones al centro genómico de Nueva York, donde se llevó a cabo la secuenciación.

5.9. Análisis bioinformático

Las secuencias de los barcodes y de los primers forward y reverse fueron eliminados de las lecturas obtenidas con MiSeq. Las secuencias crudas se analizaron utilizando la plataforma QIIME v 1.8.0 software (209).

Se realizó un recorte de secuencias terminales revisando ventanas de 50 bases y eliminando aquellas con valores de calidad menores de 25.

Se utilizó la herramienta “*Chimera Check*” de la Ribosomal Database Project, para la detección y eliminación de secuencias quimeras que pudieron haberse formado durante la reacción de PCR. Se eliminaron las secuencias de mala calidad y las que contenían un número menor de 250 nucleótidos. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un porcentaje de similitud del 97%, con UCLUST (210).

5.10. Estimación de la diversidad microbiana

Para estimar la diversidad microbiana se realizó una rarefacción a 1000 secuencias por muestra y posteriormente se llevó a cabo el análisis de la alfa diversidad (diversidad microbiana en una muestra) (211).

La alfa rarefacción se realizó usando diferentes medidas:

- la distancia filogenética (la distancia filogenética es la suma de las longitudes de las ramas que separan a dos microorganismos en un árbol filogenético),
- la medida de las OTUs observadas (secuencias agrupadas con un 97% de similitud)
- la medida del índice de Shannon: cuenta tanto la abundancia como la uniformidad de las especies presentes

El análisis de la beta diversidad (diversidad microbiana entre muestras) fue realizada calculando la distancia Weighted Unifrac entre cada par de muestras (212) y realizando el Análisis del Componentes Principales (ACP),

Para calcular la alfa y la beta diversidad se utilizó la plataforma QIIME 1.8.0. (209).

La significación estadística entre grupos de la alfa diversidad se calculó por un test t de student para dos muestras. La significancia de los agrupamientos obtenidos en la beta diversidad se analizó por medio del test ANOSIM (Analysis of Similarity) utilizando QIIME.

5.11. Análisis taxonómico

El análisis taxonómico de las comunidades microbianas se realizó utilizando la plataforma de la Ribosomal Database Project (RDP classifier) (213) con un umbral de confianza del 80%.

Se determinó la abundancia relativa a nivel de phylum, clase, orden, familia y género. Solo se consideraron las OTUs que representaban más del 0.2% del total de las secuencias de cada muestra para presentar los resultados de forma grafica.

5.12. Heatmap

A partir de las tablas de contingencia obtenidas con la Ribosomal Database Project, se llevó a cabo la realización del heatmap con el programa R (versión 3.2.1, 2015-06-18) utilizando el paquete Heatmap2. Se utilizaron las bibliotecas vegan y gplots y se filtraron los géneros con una abundancia relativa de <0.1%.

5.13. LEfSe

El algoritmo de “Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe)” se realiza con la plataforma online Galaxy para determinar las diferentes abundancias relativas de las comunidades bacterianas entre los pacientes *H. pylori* positivos y negativos. Los umbrales de significancia que se utilizaron fueron los que recomiendan en el programa (205). LEfSe, en primer lugar detecta características estadísticamente significativas entre las distintas clases biológicas con un test de Kruskal-Wallis, y posteriormente analiza la significancia biológica con un test de Wilcoxon. LEfSe utiliza un Análisis Discriminante Lineal para estimar el tamaño del efecto de cada característica.

5.14. Predicción metagenómica de las comunidades microbianas con PICRUST

PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) es un enfoque para inferir el metagenoma usando las secuencias del gen 16S, por lo tanto, proporciona una predicción de cambios probables en las funciones microbianas asociados con cambios en la abundancia de las OTUs (214).

El análisis PICRUST se realizó a partir de los datos de secuenciación del gen 16S ARNr a través de la plataforma de Galaxy. Las funciones fueron categorizadas en los niveles 1 y 2 de la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Para simplificar el análisis se seleccionaron las siguientes categorías: metabolismo, procesamiento de la información genética, procesamiento de la información ambiental y procesos celulares.

Posteriormente se utilizó la herramienta Lefse, comentada anteriormente, para identificar significativamente diferentes funciones microbianas entre pacientes *H. pylori* positivos y negativos.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Datos generales de los pacientes estudiados

Se analizaron un total de 51 pacientes pediátricos con sintomatología digestiva.

Las principales características clínico-demográficas de estos pacientes se pueden observar en la Tabla 5.

Características (n=51)	
Edad Media, (Rango)	11.1 (1-17)
Género (%)	
Femenino	19/51 (37.3)
Masculino	32/51 (62.7)
Nacionalidad (%)	
Española	42/51 (82.3)
No española	9/51 (17.7)
IMC (%)	
Infrapeso (IMC <18.5)	26/51 (51)
No infrapeso (IMC >18.5)	25/51 (49)
Resultados histología(%)	
Inflamación	34/47 (72.3)
No inflamación	13/47 (27.7)

Tabla 5. Resumen de las características clínico-demográficas de los pacientes del estudio.

Como observamos en la Tabla 5, la mayoría de los pacientes eran de origen español (n= 42), y 9 eran extranjeros (5 pacientes de Ecuador, 2 de Rumanía, 1 de Ucrania y 1 de Portugal).

El peso y altura media de los pacientes incluidos, fue de 44.51 kg (rango: 9.6-90) y 145.34 cm (rango: 76-176) respectivamente.

Según los resultados de la endoscopia, 18 pacientes tenían la mucosa gástrica normal, 22 tenían nodularidad antral, 2 pacientes presentaron gastritis, 2

pacientes úlcera gástrica y 7 pacientes presentaban otras manifestaciones. Los resultados endoscópicos según el estado de *H. pylori* se pueden observar en la Tabla 14.

El análisis histológico de las biopsias de antro gástrico fue realizado en 47 pacientes; en 4 pacientes no fue posible realizar esta determinación. De los 47 pacientes, 13 pacientes presentaron la mucosa gástrica normal, 13 tenían gastritis superficial activa, 18 gastritis superficial inactiva y 3 gastritis crónica. Los resultados histológicos clasificados según el estado de *H. pylori* se indican en la Tabla 14.

De estos pacientes 29 no habían recibido ningún tipo de tratamiento antibiótico o antiácido previo a la toma de la biopsia de antro gástrico. 10 pacientes habían recibido tratamiento antibiótico para erradicar *H. pylori* antes de la toma de la biopsia gástrica y 12 pacientes habían recibido tratamiento con antiácidos. En ambos casos, todos los pacientes habían esperado como mínimo un mes tras finalizar el tratamiento para realizar la endoscopia; salvo en tres pacientes que en el momento de la endoscopia estaban tomando IBP.

Paciente	Edad	Sexo	IMC	Endoscopia	Histología
1	9	Masculino	17.87	Inflamado	Normal
2	14	Femenino	18.27	Normal	Normal
3	7	Masculino	15.03	Normal	Normal
4	15	Masculino	23.27	Normal	Normal
5	10	Femenino	18.2	Inflamado	Normal
6	10	Masculino	16.6	Inflamado	Superficial activa
7	14	Femenino	18.4	Inflamado	Normal
8	10	Femenino	22.28	Normal	Superficial activa
9	16	Masculino	19.37	Inflamado	Superficial no activa
10	13	Masculino	22.03	Normal	Superficial activa
11	12	Femenino	15.4	Inflamado	Superficial activa
12	14	Masculino	26.15	Normal	Superficial no activa
13	17	Femenino	25.11	Inflamado	Superficial no activa
14	14	Femenino	18.37	Inflamado	Superficial activa
15	14	Masculino	20.21	Normal	Superficial no activa
16	13	Masculino	24.95	Normal	Normal
17	12	Femenino	19.71	Inflamado	Superficial activa
18	13	Masculino	13.27	Inflamado	Superficial activa
19	13	Masculino	21.23	Inflamado	Superficial activa
20	13	Masculino	16.53	Inflamado	Normal
21	6	Masculino	15.47	Inflamado	Superficial no activa
22	7	Masculino	18.93	Inflamado	Superficial no activa
23	7	Femenino	12.21	Inflamado	Superficial activa
24	6	Masculino	15.42	Inflamado	Normal
25	11	Masculino	15.56	Inflamado	ND
26	10	Femenino	16.87	Inflamado	Superficial activa

Paciente	Edad	Sexo	IMC	Endoscopia	Histología
27	9	Masculino	19.72	Inflamado	Superficial no activa
28	1	Masculino	16.62	Normal	ND
29	10	Femenino	16.03	Inflamado	Superficial no activa
30	2	Femenino	16.96	Normal	ND
31	14	Femenino	21.58	Inflamado	Superficial no activa
32	14	Masculino	24.52	Inflamado	Superficial no activa
33	9	Masculino	24.51	Inflamado	Superficial no activa
34	11	Masculino	15.37	Inflamado	Superficial no activa
35	15	Masculino	18.78	Normal	Normal
36	10	Masculino	15.18	Inflamado	Superficial activa
37	12	Masculino	23.56	Inflamado	Superficial no activa
38	3	Masculino	16.05	Normal	Normal
39	15	Masculino	18.29	Inflamado	Superficial no activa
40	14	Femenino	20.12	Normal	Normal
41	7	Masculino	15.28	Inflamado	Gastritis crónica
42	11	Masculino	17.85	Inflamado	Gastritis crónica
43	13	Masculino	27.1	Inflamado	Superficial activa
44	12	Femenino	21.16	Normal	Superficial no activa
45	15	Femenino	20.44	Normal	Superficial no activa
46	12	Femenino	19.55	Inflamado	Superficial no activa
47	12	Femenino	16.72	Inflamado	ND
48	7	Masculino	17.28	Inflamado	Gastritis crónica
49	14	Femenino	23.13	Inflamado	Normal
50	10	Masculino	30.68	Inflamado	Superficial no activa
51	15	Masculino	20.39	Inflamado	Superficial activa

Tabla 6. Características clínico-demográficas de los 51 pacientes. (ND: No disponible)

6.2. Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

El diagnóstico de *H. pylori*, como hemos comentado anteriormente, se realizó por 3 métodos convencionales (Test rápido de la ureasa, cultivo e histología) y por un método molecular, qPCR específica para *H. pylori*.

Los criterios utilizados para considerar un paciente positivo para *H. pylori* fue cuando al menos dos de los 4 tests realizados fueron positivos, y se consideró un paciente como negativo para *H. pylori* cuando solamente un test fue positivo o todos los tests fueron negativos. Según estos criterios, 18 pacientes fueron positivos para *H. pylori* y 33 fueron negativos.

Paciente	TRU	Cultivo	Histología	qPCR	Concentración <i>H. pylori</i>
1	Pos	Neg	Neg	Pos	440500.00
2	Neg	ND	Neg	Neg	10.50
3	Neg	ND	Neg	Neg	2.94
4	Neg	ND	Neg	Neg	7.45
5	Pos	Pos	Neg	Pos	5040.00
6	Neg	Pos	Pos	Pos	943.33
7	Neg	ND	Neg	Neg	9.10
8	Neg	ND	Neg	Neg	7.30
9	Neg	ND	Neg	Neg	12.80
10	Neg	ND	Pos	Pos	213.33
11	Pos	Pos	Pos	Pos	11250.00
12	Pos	Pos	Neg	Pos	40.20
13	Neg	ND	Neg	Neg	1.00
14	Pos	Pos	Pos	Pos	714.00
15	Neg	ND	Neg	Neg	1.00
16	Neg	ND	Neg	Neg	3.81
17	Pos	Pos	Pos	Pos	7085.00
18	Pos	Pos	Pos	Pos	247000.00
19	Pos	Pos	Pos	Pos	11115.00
20	Neg	ND	Neg	Neg	1.00
21	Pos	Neg	Neg	Neg	1.00
22	Neg	ND	Neg	Neg	1.58
23	Pos	Neg	Pos	Neg	1.00
24	Neg	ND	Neg	Neg	3.81
25	Pos	Neg	ND	Pos	86.17
26	Pos	Pos	Pos	Pos	27033.33

Paciente	TRU	Cultivo	Histología	qPCR	Concentración <i>H. pylori</i>
27	Neg	Neg	Neg	Neg	10.73
28	Neg	ND	ND	Neg	1.00
29	Neg	Neg	Pos	Neg	1.00
30	Neg	ND	ND	Neg	1.82
31	Neg	Neg	Neg	Neg	0.53
32	Neg	ND	Neg	Neg	12.53
33	Neg	ND	Neg	Neg	3.50
34	Neg	ND	Neg	Neg	50.10
35	Neg	ND	Neg	Neg	3.50
36	Pos	Pos	Pos	Pos	1003.50
37	Neg	ND	Neg	Neg	8.05
38	Neg	ND	Neg	Neg	3.50
39	Neg	ND	Neg	Neg	2.45
40	Neg	ND	Neg	Neg	8.62
41	Pos	Neg	Pos	Pos	97.97
42	Pos	Pos	Pos	Pos	1245.00
43	Pos	Neg	Pos	Pos	20500.00
44	Neg	ND	Neg	Neg	3.50
45	Neg	ND	Neg	Neg	13.35
46	Neg	ND	Neg	Neg	3.50
47	Neg	ND	ND	Neg	3.75
48	Neg	Neg	Pos	Neg	18.57
49	Neg	ND	Neg	Neg	4.28
50	Neg	ND	Neg	Neg	6.00
51	Pos	Neg	Pos	Pos	30000.00

Tabla 7. Resultado de los distintos métodos diagnósticos (Pos:Positivo, Neg:Negativo, ND: No disponible).

6.2.1. Diagnóstico de *H. pylori* por el test rápido de la ureasa

Los resultados obtenidos con el test rápido de la ureasa (TRU) en el diagnóstico de *H. pylori* fueron los siguientes:

TRU	Nº Pacientes
Negativo	34
Positivo	17
Total	51

Tabla 8. Resultados obtenidos con el Test Rápido de la Ureasa

6.2.2. Diagnóstico de *H. pylori* por cultivo

Como hemos comentado anteriormente, el cultivo sólo se realizó en aquellos pacientes que fueron positivos por el TRU (n=17), y en 5 pacientes en los que el pediatra tenía una alta sospecha clínica, a pesar de que el TRU fue negativo.

Los resultados obtenidos con el cultivo en el diagnóstico de *H. pylori* fueron los siguientes:

Cultivo	Nº Pacientes
Negativo	11
Positivo	11
Total	22

Tabla 9. Resultados obtenidos con el cultivo

6.2.3. Diagnóstico de *H. pylori* por histología

El examen histológico de la biopsia de antro gástrico se realizó en 47 pacientes, ya que en 4 pacientes no se pudo llevar a cabo esta determinación.

Los resultados obtenidos tras el examen histológico en el diagnóstico de *H. pylori* fueron los siguientes:

Histología	Nº Pacientes
Negativo	31
Positivo	16
Total	47

Tabla 10. Resultados obtenidos con el examen histológico.

6.2.4. Diagnóstico de *H. pylori* por PCR cuantitativa

Los resultados obtenidos con la qPCR específica para *H. pylori* en el diagnóstico de este microorganismo fueron los siguientes:

qPCR	Nº Pacientes
Negativo	34
Positivo	17
Total	51

Tabla 11. Resultados obtenidos con la PCR cuantitativa.

La sensibilidad y especificidad de la qPCR como método diagnóstico fue calculada con todos los posibles Cp (Crossing point) desde 25 a 40 (Tabla 12). Se realizó una curva ROC (Figura 8) y se eligió el Cp con la mayor sensibilidad y especificidad. Las muestras con Cp < 35 fueron consideradas como positivas para *H. pylori*.

Cp	Especificidad	Sensibilidad
<25	100,00%	6,67%
<26	100,00%	6,67%
<27	100,00%	26,67%
<28	100,00%	40,00%
<29	100,00%	53,33%
<30	100,00%	53,33%
<31	100,00%	60,00%
<32	100,00%	80,00%
<33	100,00%	80,00%
<34	100,00%	80,00%
<35	100,00%	93,33%
<36	93,33%	93,33%
<37	63,33%	93,33%
<38	0,00%	100,00%

Tabla 12. Especificidad y sensibilidad obtenida al utilizar cada Cp como criterio de positividad para *H. pylori*, considerando verdadero positivo y verdadero negativo de acuerdo a los criterios descritos previamente.

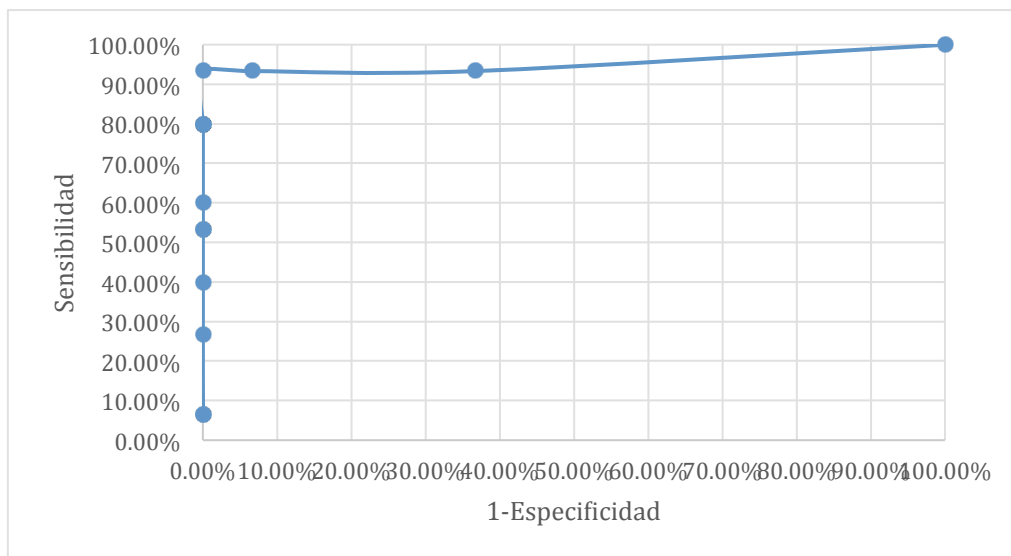


Figura 8. Curva ROC obtenida con cada Cp.

6.2.5. Resumen de métodos diagnósticos de *H. pylori*

En la siguiente gráfica se muestra la prevalencia de *H. pylori* según el método diagnóstico utilizado.

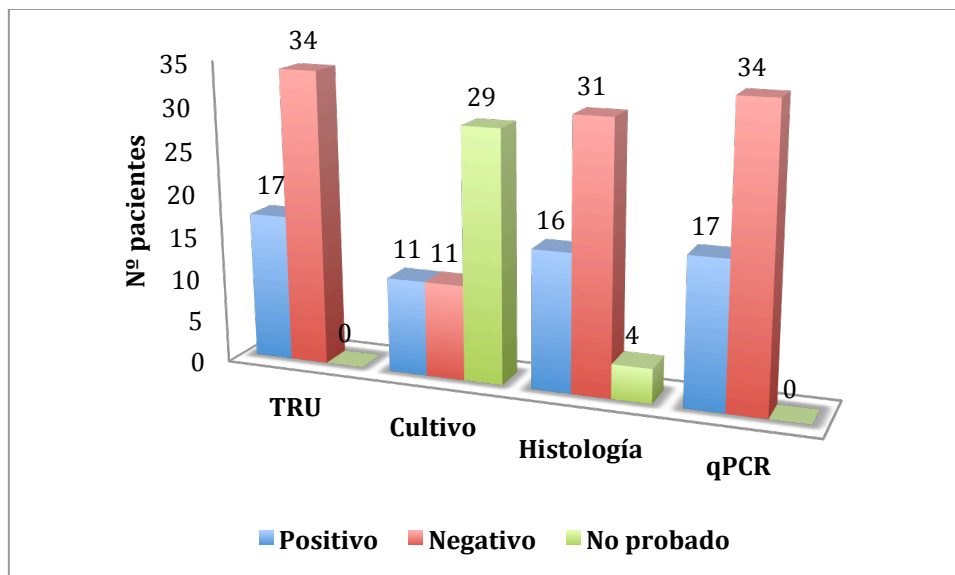


Figura 9. Resultados obtenidos con los distintos métodos diagnósticos

Del total de los 51 pacientes 38 no discreparon en ningún método. 9 pacientes discreparon en un método y 4 pacientes discreparon en dos métodos.

En la siguiente tabla se pueden observar los resultados de los pacientes que tienen al menos un método discrepante:

Paciente	TRU	Cultivo	Histología	qPCR	Nº Métodos positivos
B05	+	+	-	+	3
B06	-	+	+	+	3
B12	+	+	-	+	3
B42	+	-	+	+	3
B45	+	-	+	+	3
B53	+	-	+	+	3
B01	+	-	-	+	2
B10	-	ND	+	+	2
B24	+	-	+	-	2
B26	+	-	ND	+	2
B22	+	-	-	-	1
B30	-	-	+	-	1
B50	-	-	+	-	1

Tabla 13. Muestras con métodos diagnósticos discrepantes. (ND: No Disponible)

En la siguiente gráfica podemos observar los resultados cuantitativos de la qPCR específica de *H. pylori* en función de si los pacientes fueron positivos o negativos para el test rápido de la ureasa.

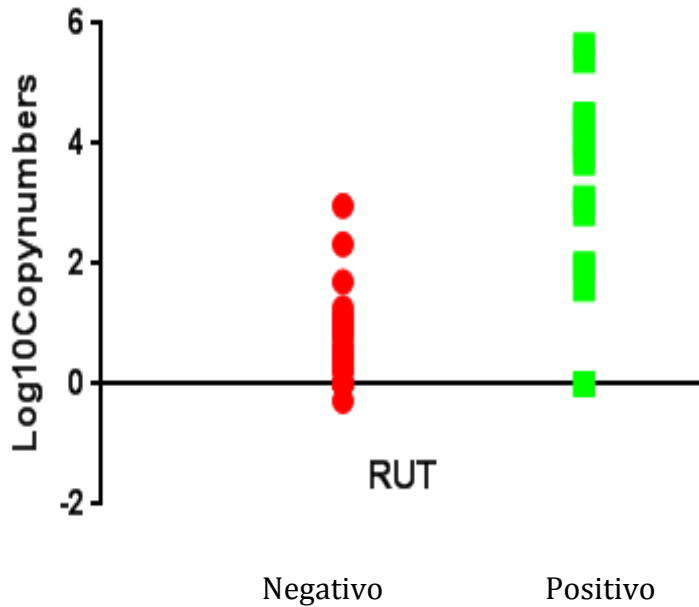


Figura 10. Comparación del método TRU con la PCR cuantitativa.

Se puede observar que los pacientes positivos para *H. pylori* presentan un mayor número de copias de ADN cuantificado mediante qPCR. Sin embargo, un paciente cuyo TRU fue positivo, presenta 0 copias de *H. pylori* y al contrario, tres muestras que tiene más de 2 log de copias de ADN que es mayor que el resto de muestras negativas que permanecen agrupadas entre 0 y 1 log₁₀ de copias de ADN.

6.3. Características clínico-demográficas de los pacientes en función del estado de *H. pylori*

En la siguiente tabla se puede observar las características de los pacientes en función del estado de *H. pylori* y el valor p de cada una de estas características.

Características (n=51)	<i>Helicobacter pylori</i>		p valor
	Positivo (n=18)	Negativo (n=33)	
Edad: Media \pm DS (años)	11.3 \pm 2.3	11 \pm 4.2	0.38
No. Niñas (%)	6/18 (33.3%)	13/33 (39.4%)	0.35
Índice de masa corporal			
IMC<18.5	12/18 (66.7%)	14/33 (42.4%)	0.049
IMC>18.5	6/18 (33.3%)	19/33 (57.6%)	
Origen geográfico			
Español	13/18 (72.2%)	29/33 (87.9%)	0.08
No-español	5/18 (27.8%)	4/33 (12.1%)	
Resultados endoscopia			
Mucosa gástrica normal	2/18 (11.1%)	16/33 (48.4%)	0.004
Nodularidad antral	15/18 (83.3%)	7/33 (21.2%)	<0.001
Gastritis	0/18	2/33 (6.1%)	0.144
Úlcera gástrica	0/18	2/33 (6.1%)	0.144
Otros	1/18 (5.6%)	6/33 (18.2%)	0.105
Resultados histología			
Mucosa gástrica normal	2/17 (11.8%)	11/30 (36.7%)	0.083
Gastritis superficial activa	12/17 (70.9%)	1/30 (3.3%)	<0.001
Gastritis superficial inactiva	1/17 (5.6%)	17/30 (56.7%)	0.001
Gastritis crónica	2/17 (11.8%)	1/30 (3.3%)	0.236

Tabla 14. Características clínico-demográficas en función del estado de *H. pylori*.

La distribución de los pacientes por edad y sexo en ambos grupos fue muy homogénea.

Se realizó el estudio de retraso en el crecimiento, que se determinó mediante el Índice de Masa Corporal (IMC) y se clasificó a los pacientes en dos grupos: infrapeso (n=26) y no infrapeso (n=25). En el grupo de pacientes con infrapeso (IMC<18.5) había 12 pacientes positivos para *H. pylori* (46,1%). En el grupo de no infrapeso (IMC > 18.5) había únicamente 6 pacientes positivos para *H. pylori* (24%). Por ello, *H. pylori* fue asociado con un IMC más bajo con diferencias estadísticamente significativas (p=0.049).

En los hallazgos endoscópicos se observa que la prevalencia de nodularidad antral fue significativamente más alta en el grupo de pacientes *H. pylori* positivos comparándolo con el grupo de pacientes *H. pylori* negativos (83.3% vs. 21.2% respectivamente).

En los hallazgos histológicos se observa que la prevalencia de gastritis superficial activa fue significativamente más alta en el grupo de pacientes *H. pylori* positivos comparándolo con el grupo de pacientes *H. pylori* negativos (70.9% vs. 3.3% respectivamente).

6.4. Resistencia antibiótica

Los datos de sensibilidad global a amoxicilina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, tetraciclina y metronidazol, se muestra en la tabla 15. De los 18 pacientes que fueron considerados como positivos según los criterios comentados anteriormente, 5 de ellos tuvieron el cultivo negativo. Y en tres de los pacientes, se aisló *H. pylori* pero fue imposible realizar el antibiograma.

Antibiótico	Nº Total de aislamientos	Resistentes N (%)	Sensibles N (%)
Amoxicilina	10	0	10 (100)
Claritromicina	10	4 (40)	6 (60)
Rifampicina	9	2 (22.2)	7 (77.8)
Levofloxacino	9	0	9 (100)
Tetraciclina	10	0	10 (100)
Metronidazol	10	5 (50)	5 (50)

Tabla 15. Número y porcentaje de cepas sensibles y resistentes a los 6 antibióticos probados

6.5. Detección del gen *CagA*

En este estudio se realizó la PCR para determinar la presencia del gen *CagA* en los pacientes considerados como positivos para *H. pylori*, y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 11). De los 18 pacientes positivos para *H. pylori* sólo uno fue positivo para el gen *CagA* (5.5%).

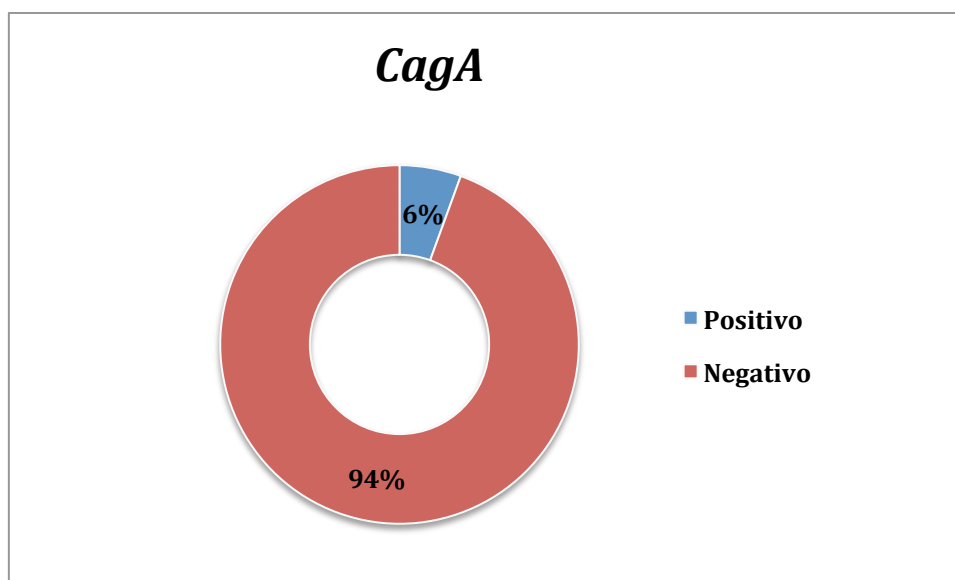


Figura 11. Porcentaje de aislamientos de *H. pylori cagA* +.

6.6. Densidad bacteriana

Se realizaron dos tipos de qPCR, una específica para *H. pylori* como método diagnóstico de este microorganismo (que se ha comentado en el apartado 5.7.1) y otra qPCR en la que se medía el número de copias de bacterias totales (apartado 5.7.2.). Estos ensayos se realizaron tanto en las muestras de biopsia de antro gástrico como en los exudados rectales.

En la siguiente tabla se puede observar el número de copias de ADN, por una parte de *H. pylori* y por otra de bacterias totales, en ambos tipos de muestras.

Tipo de muestra	N	Copias ADN (Media)	
		<i>H. pylori</i>	Bacterias totales
Biopsia gástrica	51	15766.5	109523.9
Exudado rectal	51	47.8	8.54 E ⁷

Tabla 16. Copias de ADN de *H. pylori* y de bacterias totales en las biopsias gástricas y en exudados rectales.

Como podemos observar, el número de copias de *H. pylori* es mucho mayor en las biopsias gástricas que en los exudados rectales, ya que *H. pylori* infecta el epitelio gástrico humano. Sin embargo, la PCR de bacterias totales indica, tal y como se esperaba, que el número de bacterias es mucho más elevado en los exudados rectales que en las biopsias gástricas.

6.6.1. Densidad bacteriana en función del estado de *H. pylori*

El siguiente paso fue comparar en las biopsias gástricas, el número de copias de *H. pylori* y de bacterias totales que había en los dos grupos de pacientes en función del estado de *H. pylori*. Los resultados los podemos observar en la siguiente tabla:

Estado <i>H. pylori</i>	N	Copias ADN	
		<i>H. pylori</i>	Bacterias totales
Negativo	33	6.8	4786.7
Positivo	18	44659.32	301542.2
p Valor		0.028	0.172

Tabla 17. Copias de ADN de *H. pylori* y de bacterias totales en función del estado de *H. pylori*.

6.7. Estudio del microbioma gástrico mediante secuenciación masiva

El número de secuencias obtenidas por medio de la secuenciación de alto rendimiento de las biopsias de antro gástrico se pueden observar en la siguiente tabla:

Muestra	N	Máximo (secuencias)	Media (secuencias)	Mínimo (secuencias)
Biopsias	51	21681.0	5919.6	1147.0

Tabla 18. Número máximo, mínimo y media de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva del ADN en biopsias gástricas.

6.7.1. Estudio de la alfa diversidad en muestras gástricas

La alfa diversidad como se ha comentado anteriormente es la riqueza de especies de una comunidad a la que consideramos como homogénea.

En primer lugar, se muestra una gráfica de alfa diversidad de todas las muestras gástricas con el principal objetivo de comprobar que todas las muestras alcanzan la meseta con lo que podemos considerar que estos datos representan la composición verdadera de nuestras muestras, es decir, todas las especies de este nicho ecológico han sido secuenciadas. Dado que la alfa diversidad en función de la distancia filogenética muestra resultados muy similares no se muestra la figura.

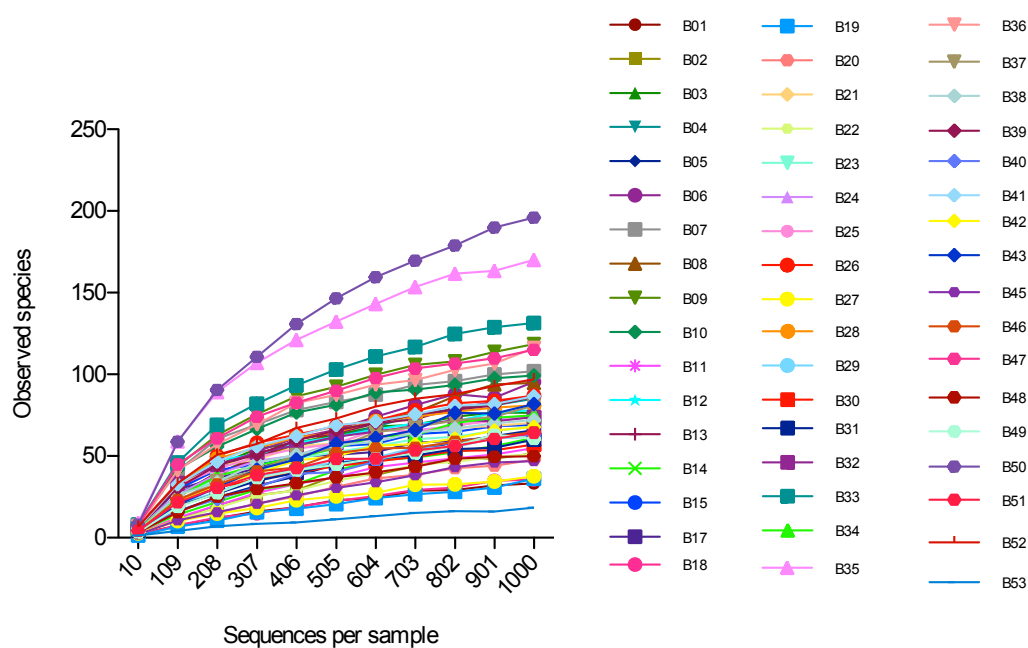


Figura 12. Alfa diversidad de las 51 muestras gástricas incluidas en el estudio en función del número de especies observadas.

6.7.1.1. Estudio de la alfa diversidad en función del estado de *H. pylori*

En la siguiente gráfica, observamos la alfa diversidad gástrica en dos grupos de pacientes: *H. pylori* positivos (n=18) y *H. pylori* negativos (n=33).

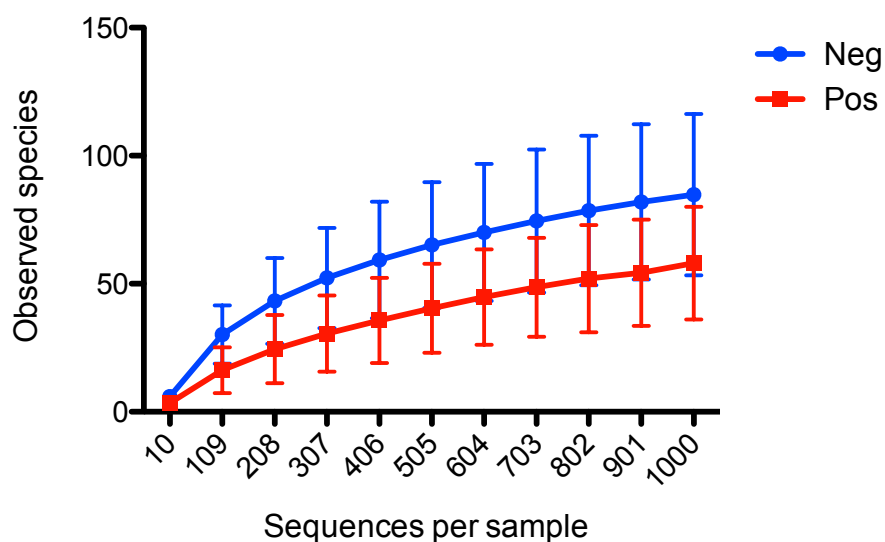


Figura 13. Alfa diversidad gástrica en función del estado de *H. pylori* representando el número de especies observadas.

Como se puede observar, los pacientes que son positivos para *H. pylori* tienen una menor alfa diversidad que aquellos pacientes que no están colonizados/infectados por *H. pylori*. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas cuando medimos la alfa diversidad en función del número de especies ($p=0.002$) (Figura 13), sin embargo, cuando usamos la distancia filogenética (Figura 14) para realizar la comparación, no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.23$).

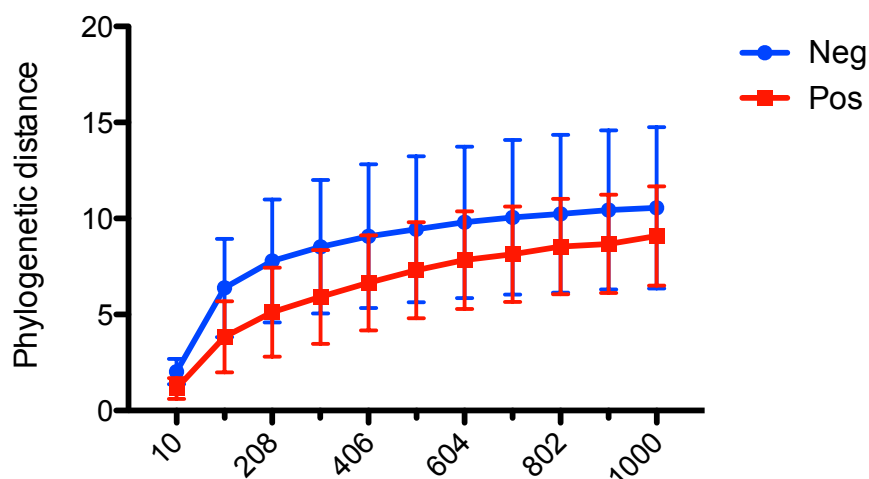


Figura 14. Alfa diversidad gástrica en función del estado de *H. pylori* representando la distancia filogenética.

La media del Índice Shannon en el grupo de pacientes *H. pylori* positivos fue 1.39 (mínimo: 0.38, máximo: 3.05). En los pacientes *H. pylori* negativos fue de 2.26 (mínimo: 0.74, máximo: 4). El índice de Shannon fue significativamente más bajo en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* comparado con el grupo de pacientes negativos ($p=0.002$), probablemente reflejando el dominio de esta especie en la comunidad, tal y como se muestra en la Tabla 19.

	<i>H. pylori</i> positivos			<i>H. pylori</i> negativos			pValor
	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	
Shannon	0.38	1.39	3.05	0.74	2.26	4	0.002

Tabla 19. Índice Shannon en función del estado de *H. pylori*

6.7.1.2. Estudio de la alfa diversidad en función de la histología

Según los resultados histológicos, se pueden clasificar a los pacientes en 4 grupos: Pacientes con gastritis crónica (n=3), gastritis superficial activa (n=13), gastritis superficial no activa (n=18) y mucosa gástrica normal (n=13). La siguiente gráfica muestra la alfa diversidad en función del número de especies observadas, la alfa diversidad en función de la distancia filogenética presentaba resultados similares.

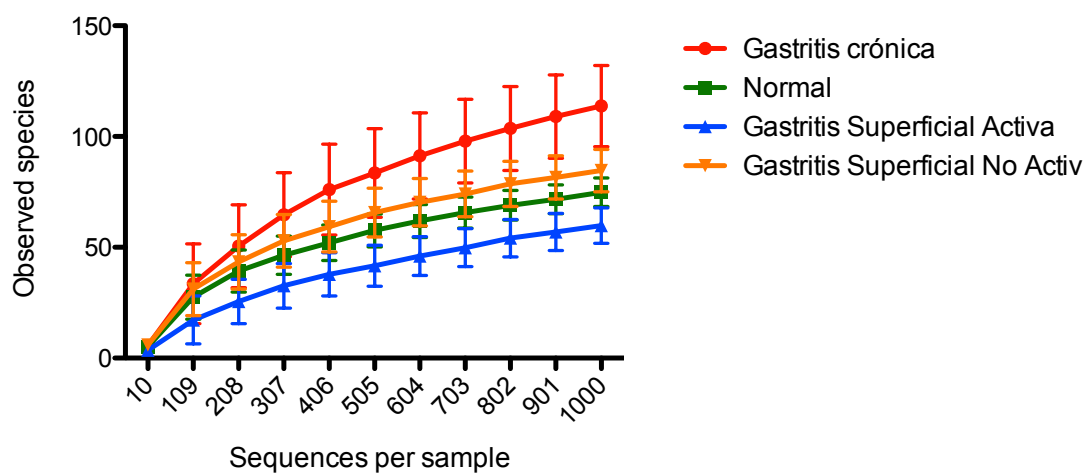


Figura 15. Alfa diversidad en función de los resultados histológicos representando el número de especies observadas

Cabe destacar que el grupo de pacientes con gastritis superficial activa es el que menor alfa diversidad presenta.

Si únicamente seleccionamos los pacientes que tienen gastritis activa (n=13) y los que tienen gastritis no activa (n=18), observamos que en la alfa diversidad en función del número de especies observadas, los pacientes con gastritis activa presentan una menor diversidad. Este análisis en función de la distancia filogenética, aunque presenta la misma tendencia, las diferencias son menores entre ambos grupos.

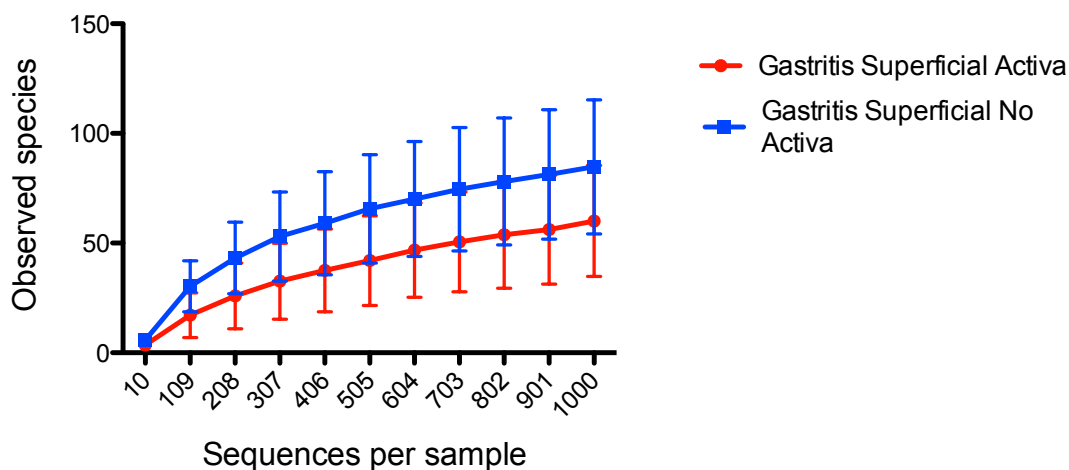


Figura 16. Alfa diversidad en los grupos de pacientes con gastritis superficial activa y con gastritis superficial no activa, representando el número de especies observadas

En la gráfica observamos que aquellos pacientes que presentan una gastritis activa tienen una menor alfa diversidad que los pacientes que presentan gastritis no activa. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.035$).

6.7.1.3. Estudio de la alfa diversidad en función del estado de tratamiento previo

Algunos de los pacientes incluidos en el estudio, habían recibido tratamiento, para erradicar *H. pylori*, previo a la toma de la muestra de la biopsia de antro gástrico (como mínimo el tratamiento debía haber finalizado un mes antes de la toma de la biopsia para poder incluirlo en el estudio). Resulta de interés comparar la alfa diversidad de los pacientes que habían recibido tratamiento de aquellos que no habían recibido, para poder observar si existen diferencias en la diversidad de estos dos grupos de pacientes.

En la siguiente gráfica podemos observar la alfa diversidad en función de si los pacientes habían recibido tratamiento Anti-*Helicobacter* (2 antibióticos y un IBP)

(n=10), IBP (n=12) o no habían recibido tratamiento (n=29). El análisis de la alfa diversidad está representado según la distancia filogenética. La alfa diversidad en función del número de especies muestra resultados similares.

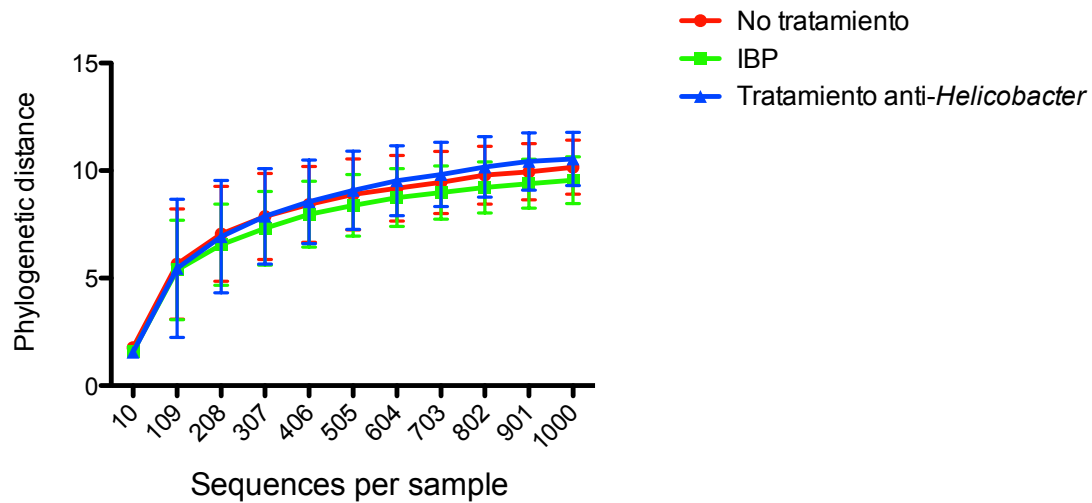


Figura 17. Alfa diversidad en función del tratamiento previo recibido representando la distancia filogenética

En esta gráfica podemos observar que no hay diferencias entre los grupos de pacientes que recibieron un tratamiento previo a la toma de la biopsia gástrica de aquellos que no recibieron tratamiento.

6.7.1.4. Estudio de la alfa diversidad en función del tipo de parto

En la siguiente gráfica, observamos la alfa diversidad en función de si el niño nació por parto natural (n=32) o por cesárea (n=7).

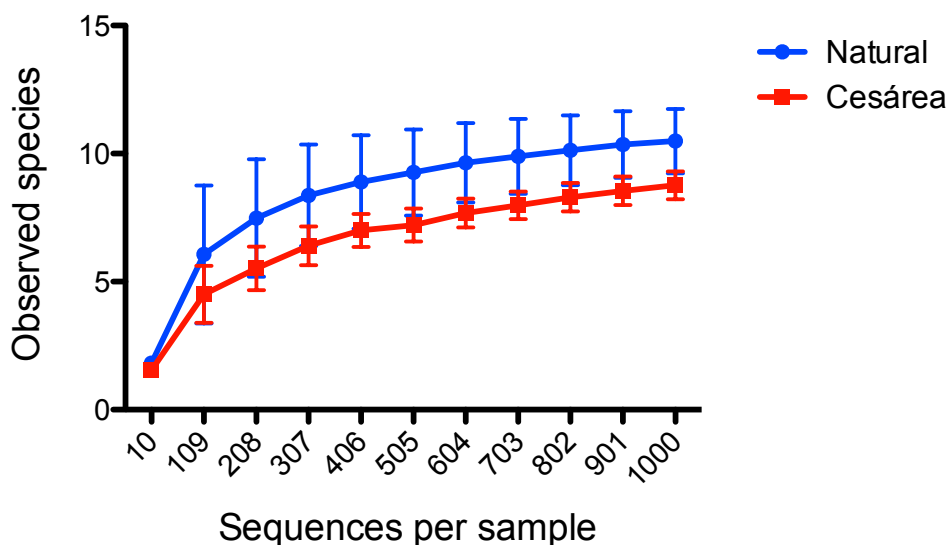


Figura 18. Alfa diversidad gástrica en función del tipo de parto representando el número de especies observadas

Vemos que el grupo de pacientes que nacieron por parto natural tienen una mayor alfa diversidad comparándolo con el grupo de pacientes que nacieron mediante cesárea, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas estudiando el número de especies observadas ($p=0.321$) ni estudiando la alfa diversidad en función de la distancia filogenética.

6.7.1.5. Estudio de la alfa diversidad en función de la nacionalidad

Si comparamos el microbioma gástrico de pacientes españoles con el microbioma gástrico de pacientes extranjeros, observamos que los pacientes extranjeros (n=9) presentan una menor alfa diversidad que los pacientes españoles (n=42), sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.45$).

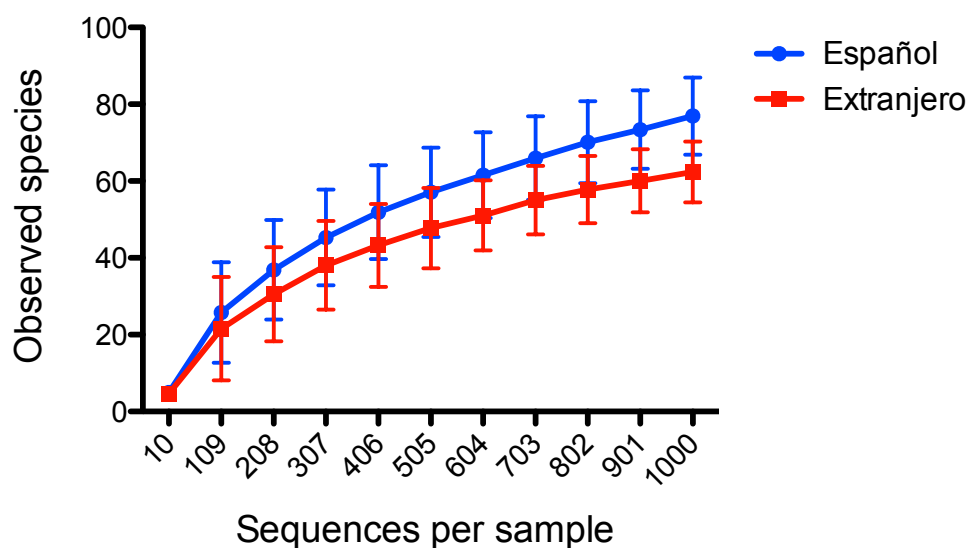


Figura 19. Alfa diversidad gástrica en función de la nacionalidad representando el número de especies observadas

6.7.1.6. Estudio de la alfa diversidad en función de otras variables

Al estudiar la alfa diversidad en función de otras variables como la edad, el IMC, y el sexo, no observamos diferencias significativas entre estos grupos de pacientes.

6.7.2. Estudio de la beta diversidad en las biopsias gástricas

La diversidad beta es el grado de cambio en la composición de especies entre diferentes comunidades. Refleja por lo tanto la diferente estructura de varias comunidades microbianas.

6.7.2.1. Estudio de la beta diversidad en función del estado de *H. pylori*

En las siguientes gráficas, se muestra el análisis de componentes principales en función del estado de positividad para *H. pylori*. Se observa, en el análisis cuantitativo de la beta diversidad, como la mayoría de los pacientes positivos para

H. pylori representados en color rojo se agrupan por un lado y por otro lado se agrupan los pacientes negativos para *H. pylori* (color azul), dando lugar a diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.001$). Sin embargo, se observa un solapamiento de seis muestras positivas, con el grupo de los pacientes *H. pylori* negativos.

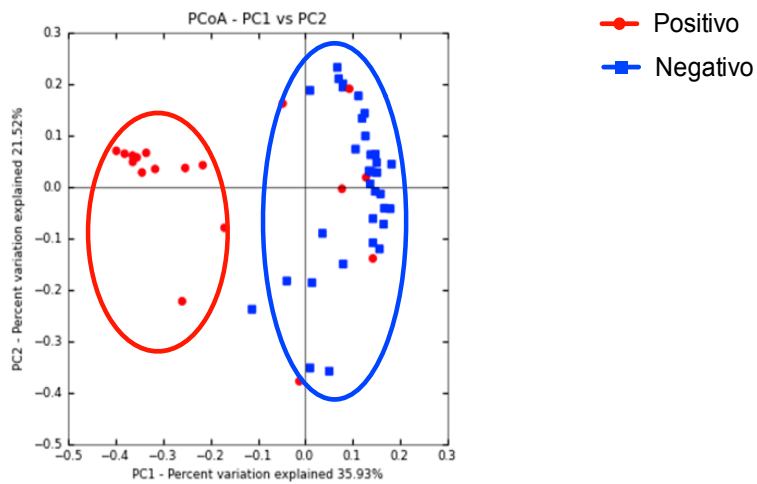


Figura 20. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori*. PC1 vs PC2

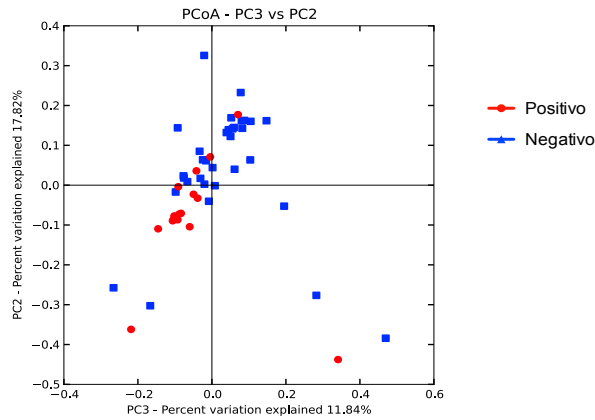


Figura 21. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori* PC3 vs PC2

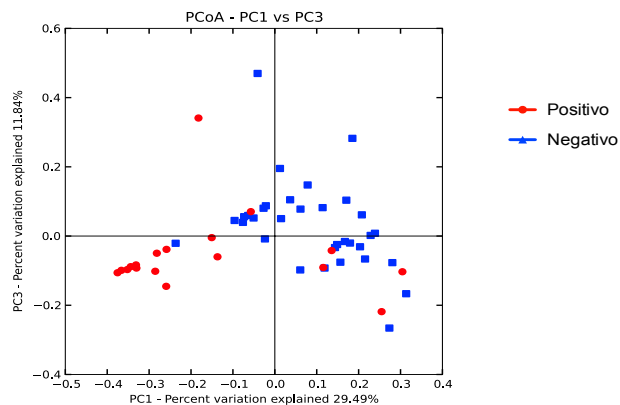


Figura 22. Análisis cuantitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori* PC1 vs PC3

Sin embargo, al realizar el análisis cualitativo no se observan diferencias entre ambos grupos de pacientes ($p=0.062$) aunque sí una cierta tendencia.

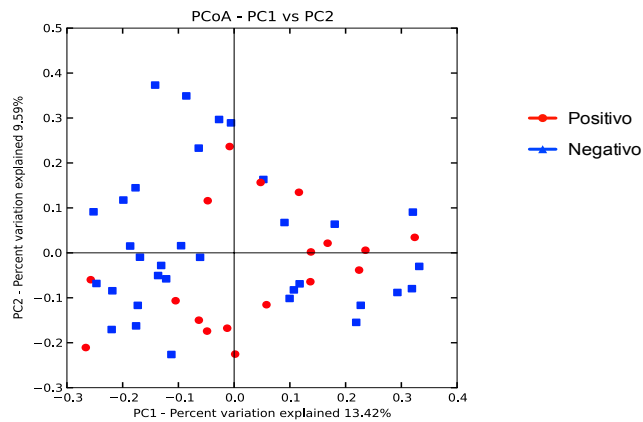


Figura 23. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori*. PC1 vs PC2

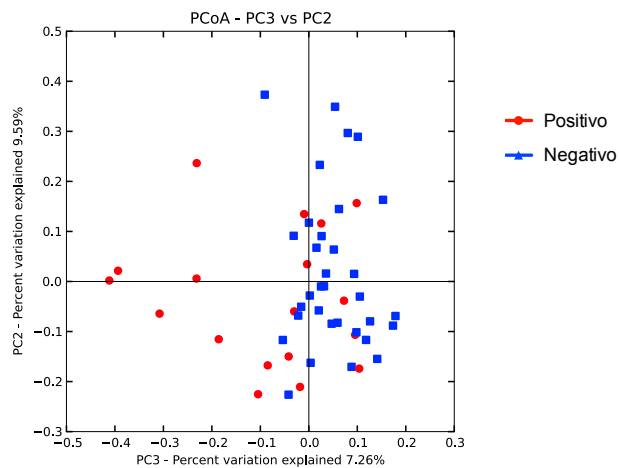


Figura 24. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori* PC3 vs PC2

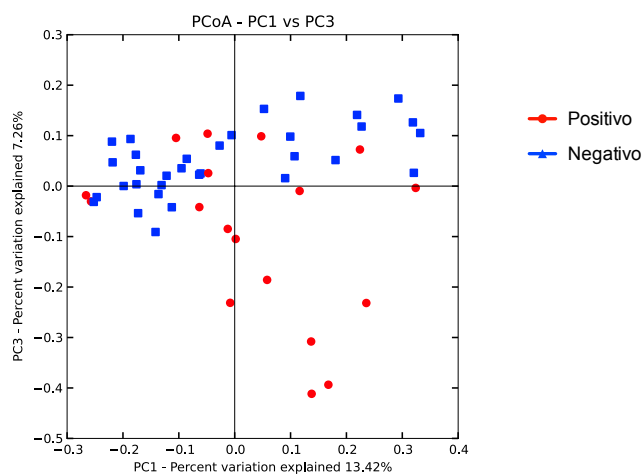


Figura 25. Análisis cualitativo de beta diversidad en función del estado de *H. pylori* PC1 vs PC3

6.7.2.2. Estudio de la beta diversidad en función de los resultados histológicos

La beta diversidad en función de los cuatro grupos de pacientes según los resultados histológicos no mostraba la formación de ninguna agrupación entre las muestras ni en el análisis cuantitativo ni en el cualitativo.

Si realizamos la agrupación en función de si tienen gastritis activa (n=13) o gastritis no activa (n=18), si que se observa una clara agrupación de la mayoría de estos pacientes entre sí, con diferencias estadísticamente significativas, en el análisis cuantitativo (p=0.001) y en el análisis cualitativo (p=0.044).

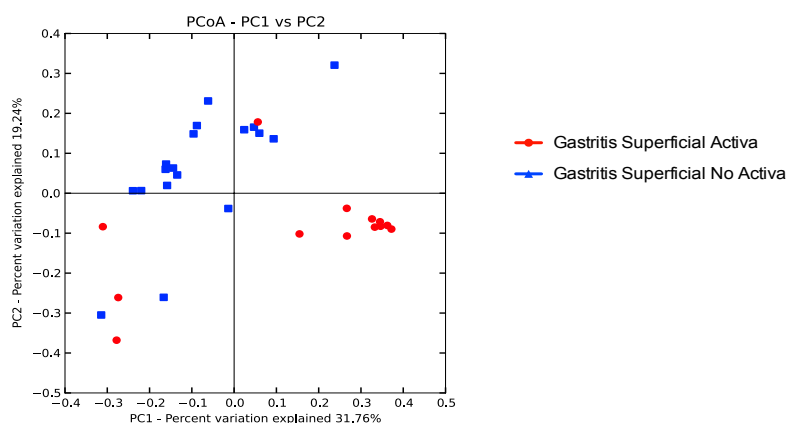


Figura 26. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función de la presencia de gastritis superficial activa o no activa

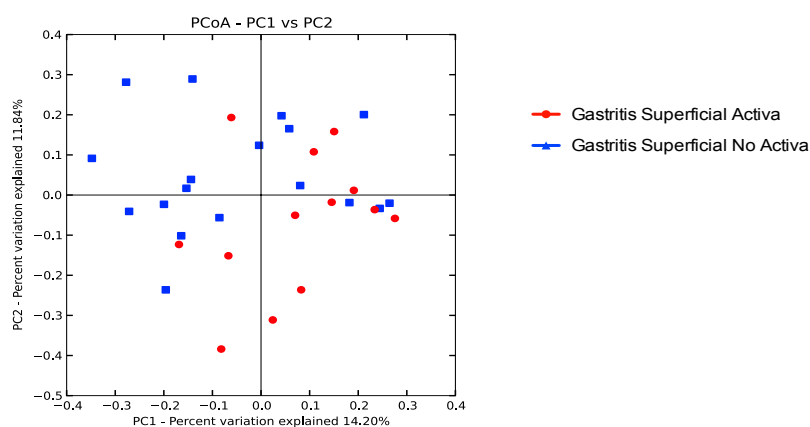


Figura 27. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función de la presencia de gastritis activa o no activa

6.7.2.3. Estudio de la beta diversidad en función del tratamiento

Al estudiar la beta diversidad clasificando los pacientes según si habían recibido tratamiento previo frente a *H. pylori* (n=10), si únicamente habían tomado IBP (n=12) o si no habían recibido tratamiento (n=29) obtenemos la siguiente gráfica y observamos que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

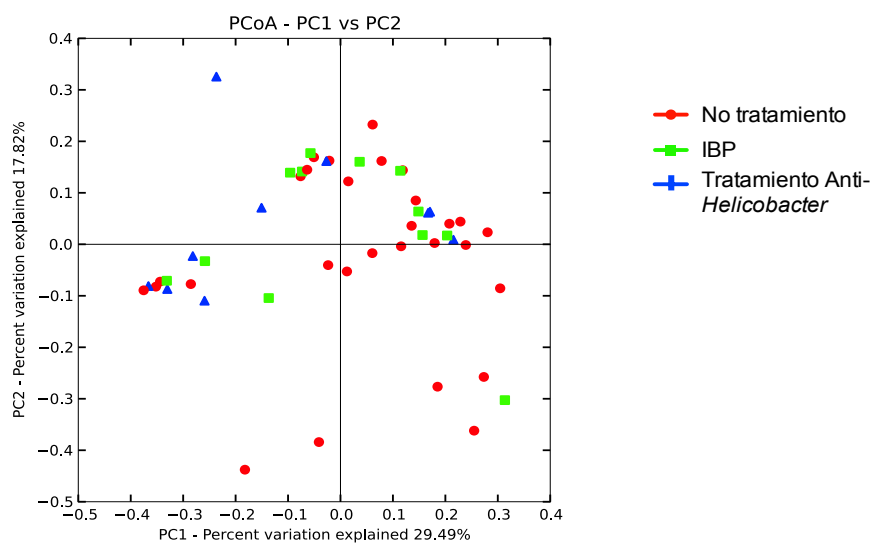


Figura 28. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función del tratamiento previo recibido

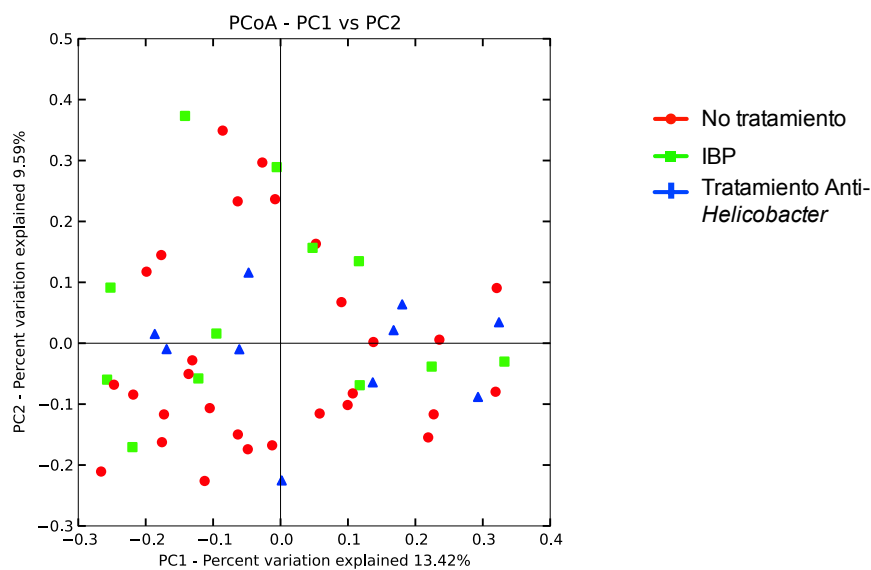


Figura 29. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función del tratamiento previo recibido

6.7.2.4. Estudio de la beta diversidad en función de otras variables

Al estudiar la beta diversidad en función de otras variables como, el sexo, la edad, el IMC, la nacionalidad y el tipo de parto, no se observan diferencias entre los grupos .

6.7.3. Análisis taxonómico de las comunidades microbianas gástricas

El análisis taxonómico de las comunidades microbianas del estómago nos permite conocer que 4 filos son los más abundantes en este nicho ecológico y que suponen más del 97% de las secuencias. Estos phyla son: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria.

En la Figura 30 se muestra la abundancia relativa de cada phyla en las muestras de los 51 pacientes incluidos en este estudio.

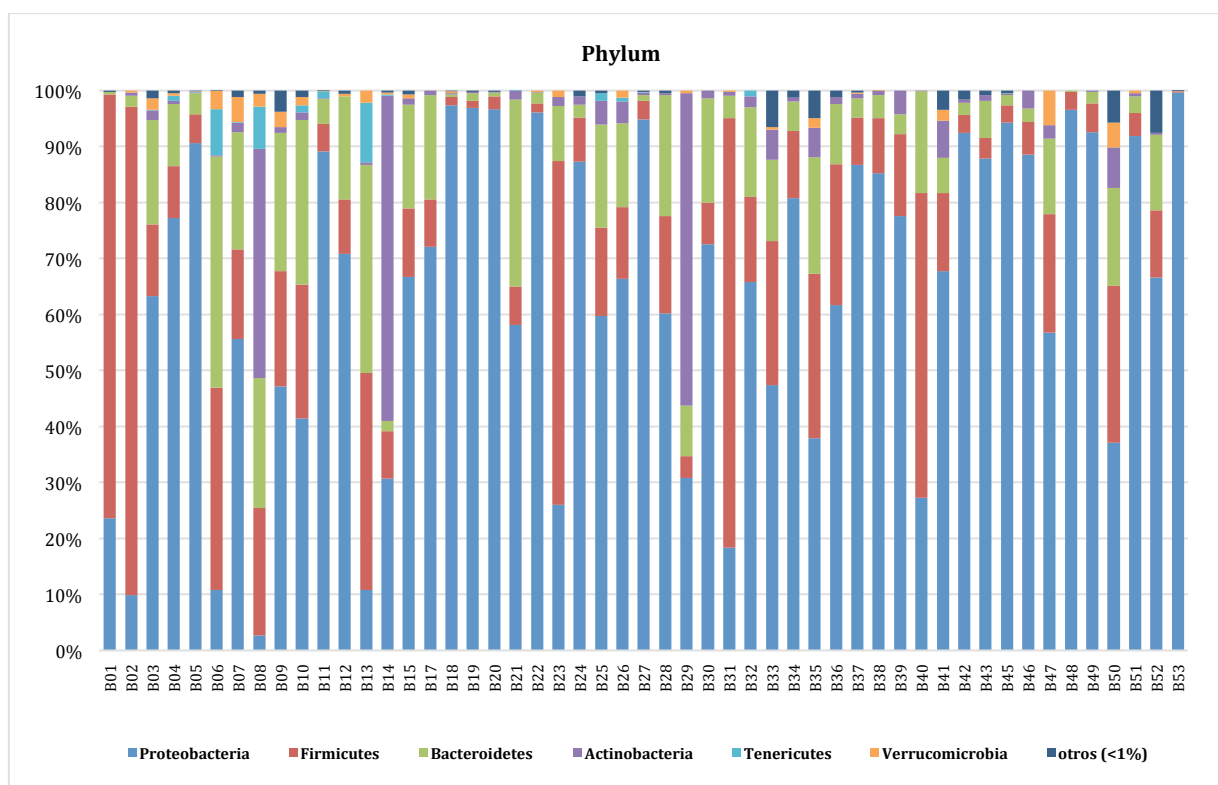


Figura 30. Asignación taxonómica a nivel de phylum de las 51 biopsias gástricas.

6.7.3.1. Análisis taxonómico en función del estado de *H. pylori*

El análisis taxonómico a nivel de phylum de la microbiota gástrica, mostró que los phyla más abundantes en los pacientes *H. pylori* positivos fueron: Proteobacteria (69.3%), Firmicutes (14.3), Bacteroidetes (8.2%) and Actinobacteria (6%) (Figura 31). La mayor frecuencia de Proteobacteria en los pacientes *H. pylori* positivos se debió a la mayor frecuencia del género *Helicobacter* en las muestras (Figura 35). Las comunidades bacterianas en el grupo de pacientes *H. pylori* negativos estuvieron principalmente dominadas por los mismo phyla pero con porcentajes de abundancia relativa diferentes: Proteobacteria (52.6%), Firmicutes (26.4%), Bacteroidetes (12%) and Actinobacteria (6.4%). Es decir, los phyla Firmicutes y Bacteroidetes mostraron una mayor abundancia relativa en el grupo de pacientes negativos para *H. pylori* que en los positivos.

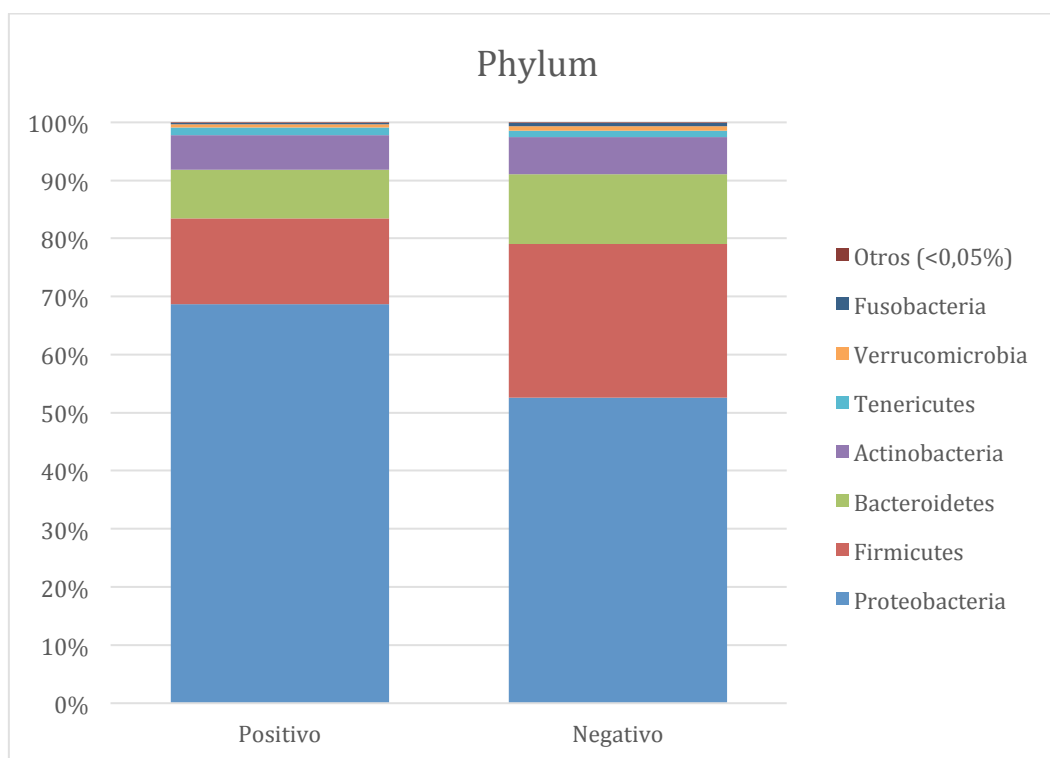


Figura 31. Análisis taxonómico a nivel de phylum en función del estado de *H. pylori*

Si estudiamos de forma más profunda este análisis taxonómico de las comunidades microbianas gástricas podemos observar cómo se desglosa los distintos phylum en sus siguientes niveles taxonómicos: clase, orden, familia y género.

Al estudiar la taxonomía a nivel de clase observamos que la principal diferencia es que en el grupo de los pacientes positivos para *H. pylori* hay una mayor abundancia relativa de la clase Epsilonproteobacteria mientras que en los pacientes negativos predomina la clase Gammaproteobacteria.

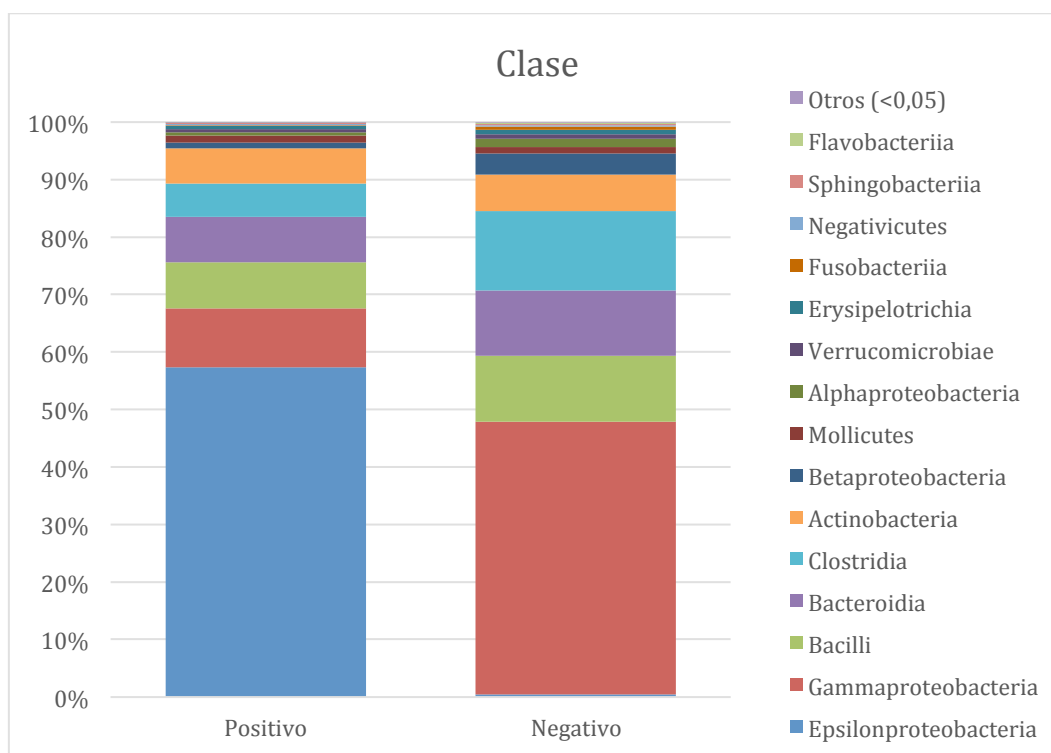


Figura 32. Análisis taxonómico a nivel de clase en función del estado de *H. pylori*

La clase más abundante en el grupo de pacientes positivos, se desglosa principalmente en el orden Campylobacterales y en el caso de los pacientes negativos en el orden Pseudomonadales.

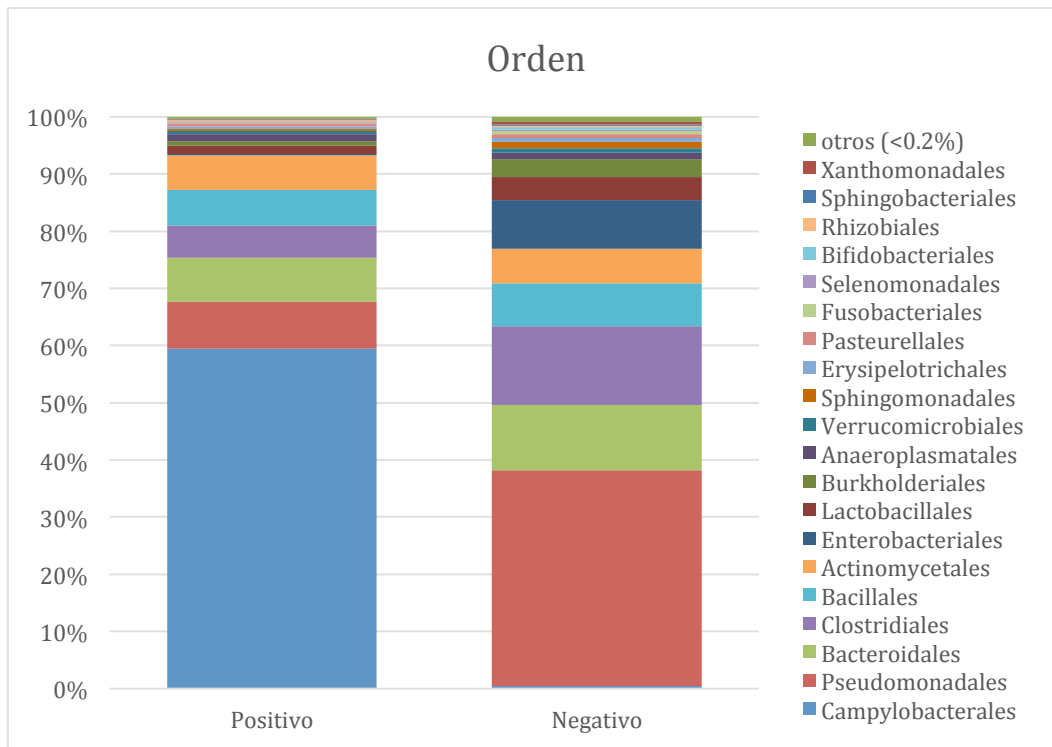


Figura 33. Análisis taxonómico a nivel de orden en función del estado de *H. pylori*

A nivel de familia observamos que en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* hay un claro predominio de la familia Helicobacteraceae, y en el grupo de pacientes negativos la familia más representada es Pseudomonadaceae.

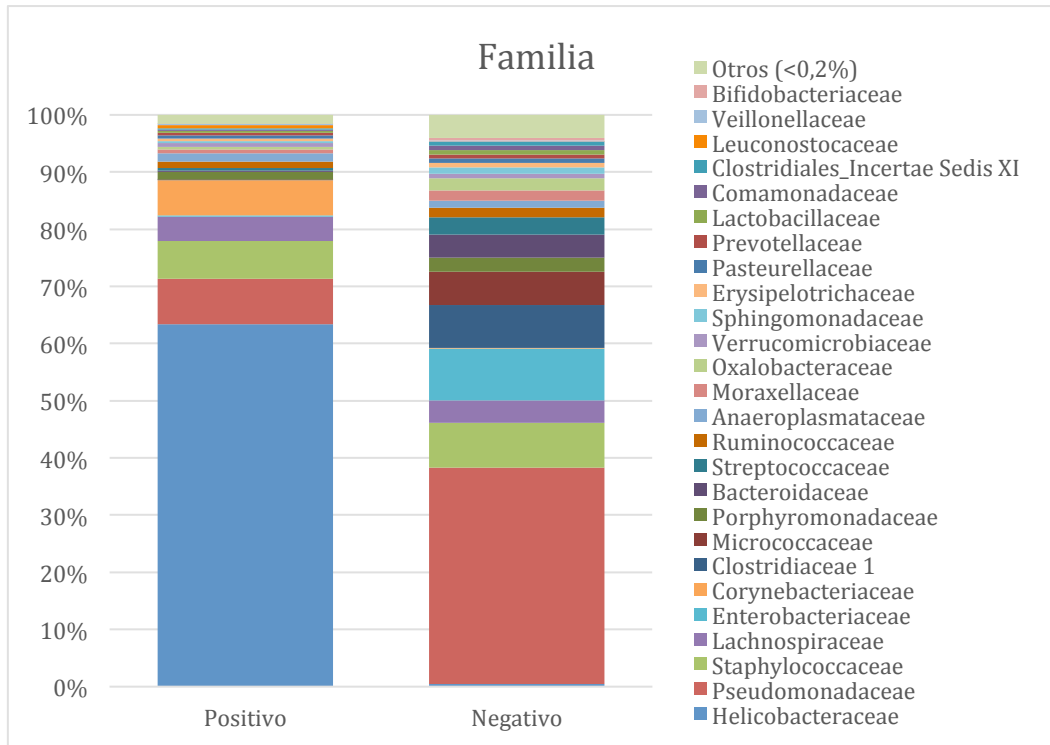


Figura 34. Análisis taxonómico a nivel de familia en función del estado de *H. pylori*

Analizando el siguiente nivel taxonómico, el género, se puede observar que el grupo de pacientes positivos para *H. pylori*, la mayoría de secuencias que pertenecen al phylum Proteobacteria corresponde al género *Helicobacter* (66.3%). Mientras que en el grupo de pacientes negativos para este microorganismo, las secuencias del phylum Proteobacteria están representadas principalmente por el género *Pseudomonas* (40.9%) y *Escherichia* (7.7%).

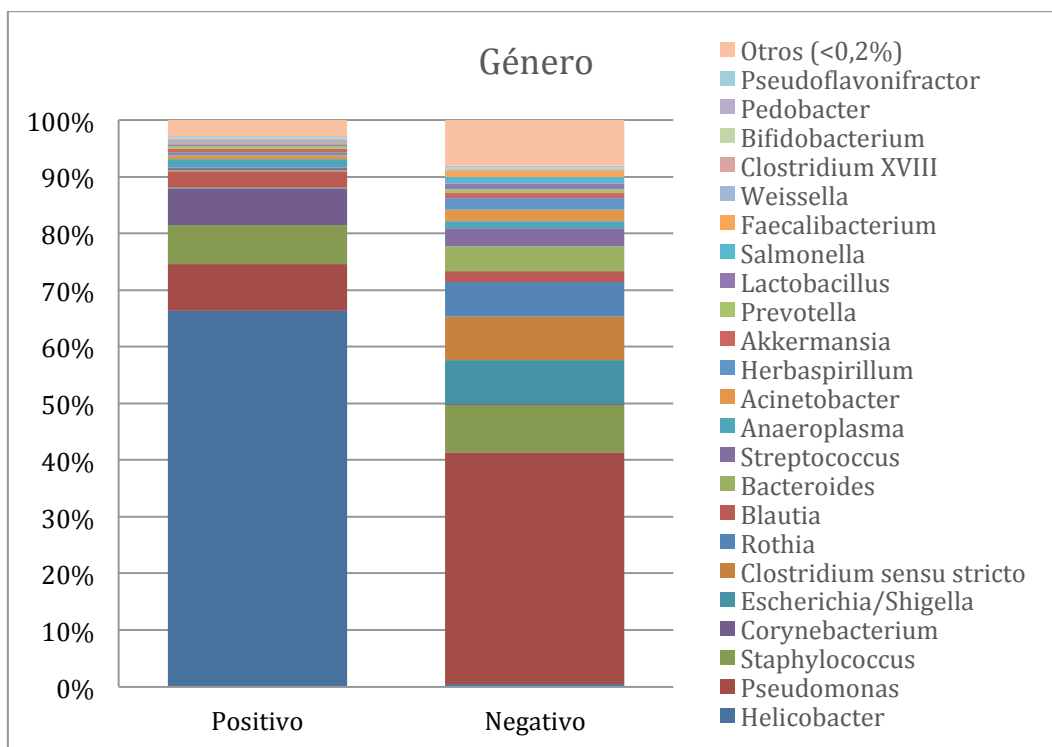


Figura 35. Análisis taxonómico a nivel de género en función del estado de *H. pylori*

Si quitamos las secuencias del género *Helicobacter* del análisis, podemos comparar mejor el resto de géneros presentes en los dos grupos de pacientes (Figura 36). En este caso, se observan mayores similitudes en la microbiota gástrica de ambos grupos. Sin embargo, el género *Corynebacterium* estaba más representado en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori*, mientras que el género *Clostridium*, *Escherichia/Shigella* y *Rothia* presentaron una mayor abundancia relativa en el grupo de pacientes negativos para *H. pylori*. Si esto es consecuencia de interacciones sinérgicas o antagónicas con la presencia de *H. pylori* debe ser estudiado con más detalle.

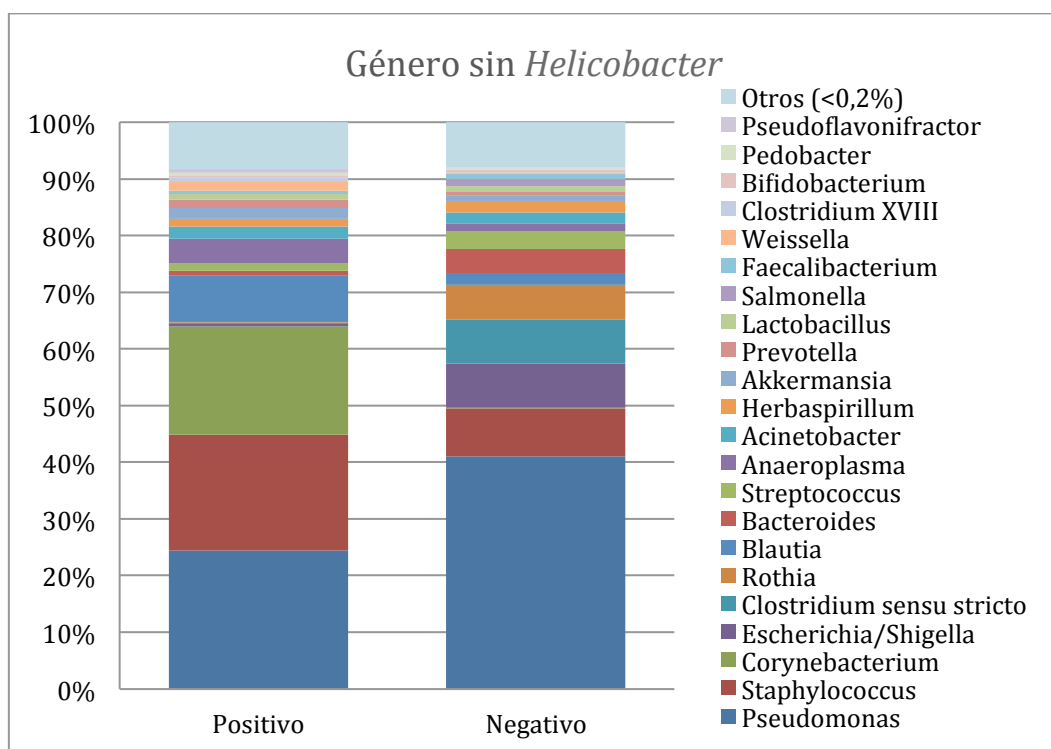


Figura 36. Análisis taxonómico a nivel de género en función del estado de *H. pylori*, sustrayendo las secuencias del género *Helicobacter*

En la siguiente tabla detallamos el porcentaje de la abundancia relativa del género *Helicobacter* en las muestras de biopsias gástricas.

Paciente	% abundancia relativa de <i>Helicobacter</i> en pacientes positivos	Paciente	% abundancia relativa de <i>Helicobacter</i> en pacientes negativos
B 53	98.7	B 32	3.4
B 19	96.1	B 47	2.7
B 18	92.7	B 15	2.5
B 45	91.5	B 17	2.2
B 20	86.8	B 41	2.2
B 11	84.5	B 28	2.1
B 27	83.0	B 03	1.8
B 05	80.7	B 07	1.2
B 37	72.2	B 35	0.7
B 43	71.8	B 23	0.6
B 42	31.2	B 22	0.4
B 01	23.3	B 02	0.3
B 14	19.5	B 31	0.2
B 26	15.9	B 50	0.2
B 06	7.9	B 13	0.2
B 12	6.4	B 33	0.05
B 10	1.4	B 08	0.04
B 24	0.5	B 29	0.04
Media	53.6	B 04	0
		B 09	0
		B 21	0
		B 25	0
		B 30	0
		B 34	0
		B 36	0
		B 38	0
		B 39	0
		B 40	0
		B 46	0
		B 48	0
		B 49	0
		B 51	0
		B 52	0
		Media	0.63

Tabla 20. Porcentaje de abundancia relativa del género *Helicobacter* en pacientes positivos y negativos.

6.7.4. Heatmap de las biopsias gástricas

Se ha realizado el heatmap a nivel de género y en relación del estado de *H. pylori* y se muestra en la siguiente figura.

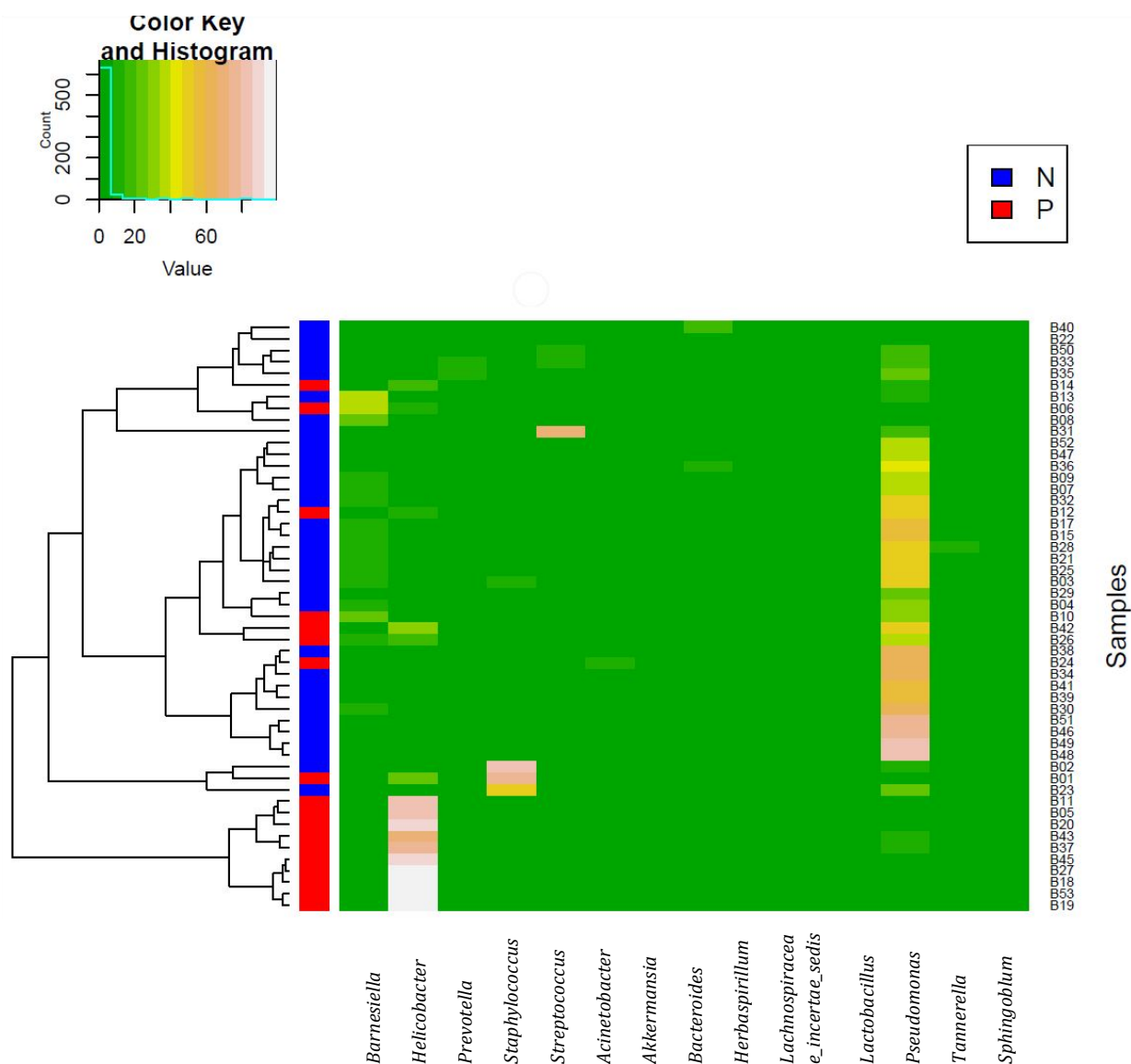


Figura 37. Heatmap biopsias gástricas (N=Negativo, P=Positivo)

En el heatmap (mapa de calor) observamos que la abundancia relativa del género *Helicobacter* es mayor en la mayoría de pacientes que son positivos para *H. pylori*. También vale la pena destacar que el género *Pseudomonas* se encuentra muy representado en varias muestras.

6.7.5. LEfSe (LDA effect size analysis)

El análisis LEfSe se realizó a nivel de phylum, clase y género. La distribución taxonómica según el estado de *H. pylori* en los distintos niveles taxonómicos se visualizó mediante un cladograma y un histograma (Figuras 38, 39, 40 y 41).

Tras la realización del LEfSe se observan diferencias significativas en grupos de bacterias entre pacientes *H. pylori* positivos y negativos.

El análisis LEfSe a nivel de phylum muestra que los pacientes *H. pylori* positivos están más representados por el phylum Proteobacteria y los pacientes *H. pylori* negativos por los phylum Firmicutes y Bacteroidetes.

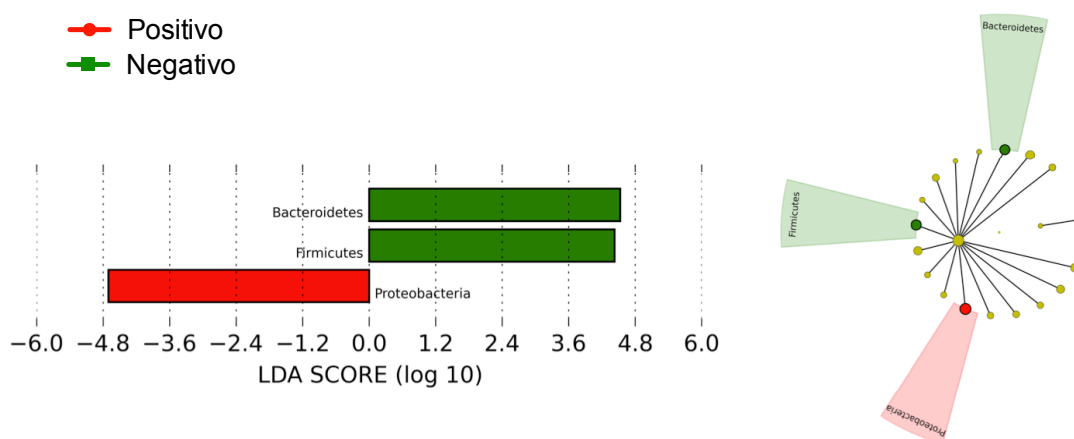


Figura 38. Análisis LEfSe a nivel de phylum (histograma y cladograma) en función del estado de *H. pylori*

El análisis LEfSe a nivel de clase, de forma similar a lo visto anteriormente en el análisis taxonómico, desglosa el phylum Proteobacteria más abundante en los pacientes positivos para *H. pylori* en la clase Epsilonproteobacteria y en los pacientes negativos se incrementaron significativamente las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Clostridia.

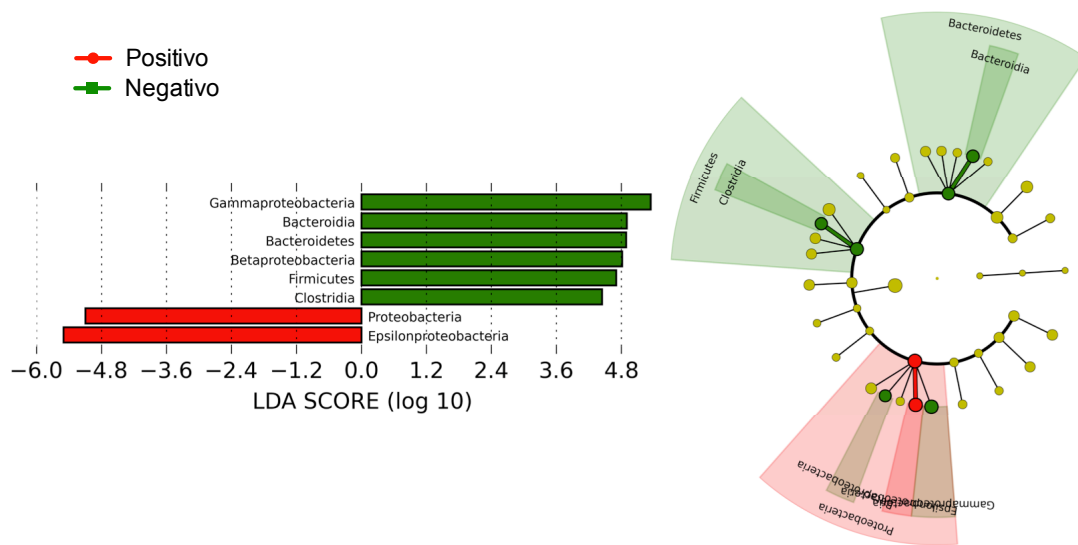


Figura 39. Análisis LEfSe (histograma y cladograma) a nivel de clase en función del estado de *H. pylori*

El análisis LEfSe a nivel de género nos indica que géneros están más representados en cada grupo de pacientes siendo las diferencias estadísticamente significativas. Podemos ver que en el grupo de pacientes positivos, el género más representado es el género *Helicobacter*, como era de esperar, y en los pacientes negativos para *H. pylori* los géneros más representados son, como podemos observar en las Figuras 40 y 41, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Herbaspirillum*, *Acinetobacter*, *Comamonas*.

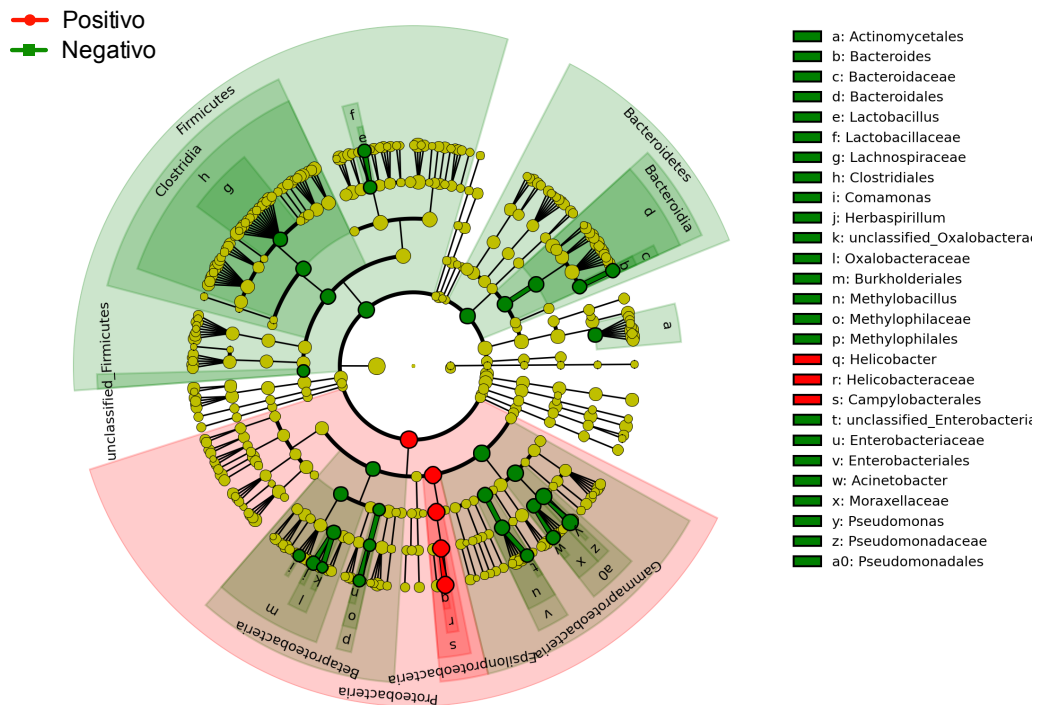


Figura 40. Cladograma en función del estado de *H. pylori* a nivel de género

Tal y como hemos visto representado en el cladograma, podemos observar las mismas diferencias del análisis LefSe en el histograma.

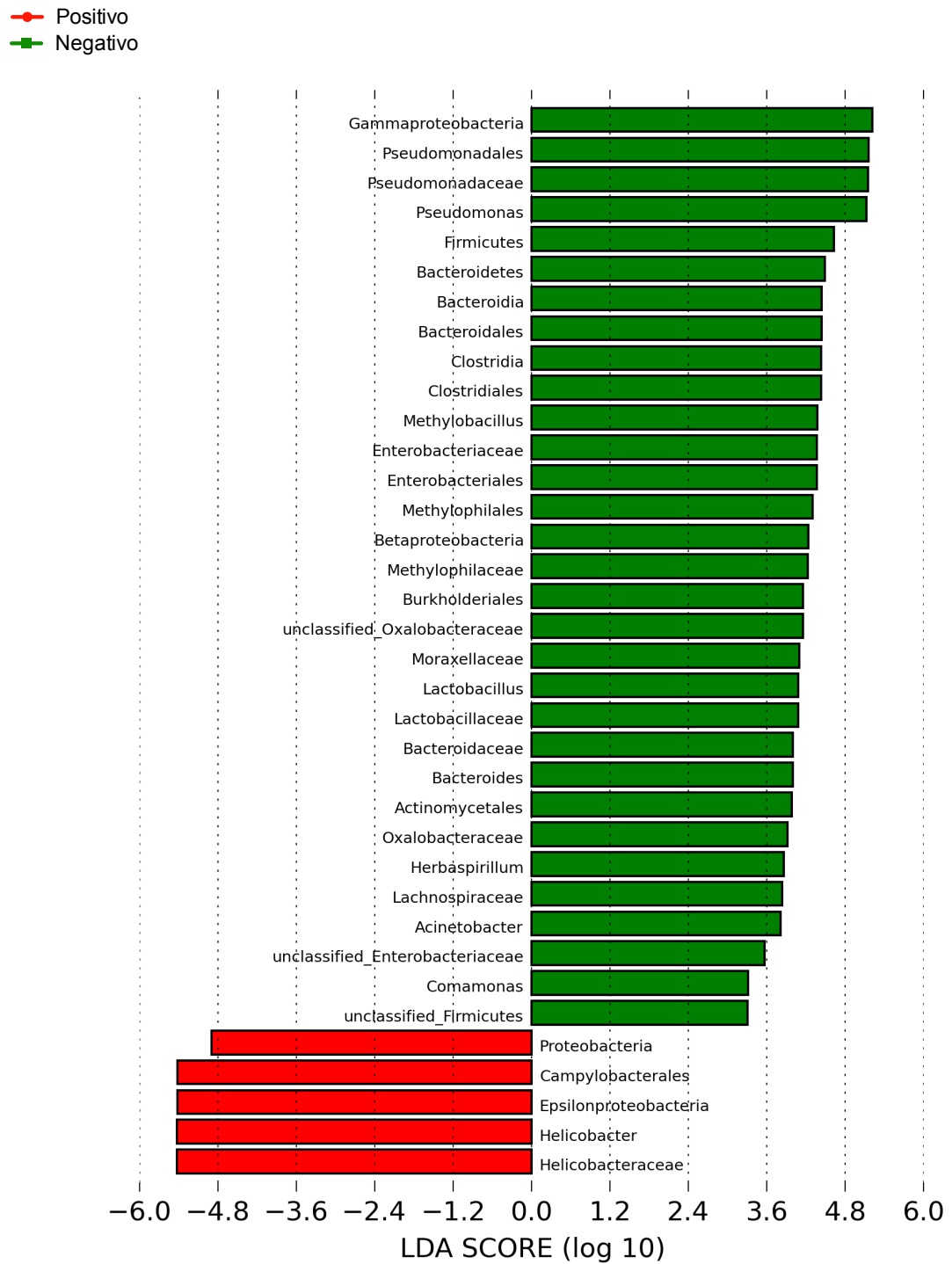


Figura 41. Histograma en función del estado de *H. pylori* a nivel de género

6.7.6. Predicción metagenómica de las comunidades microbianas con PICRUST

El análisis filogenético PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) se realizó para identificar las distintas funciones microbianas de los pacientes *H. pylori* positivos y negativos. Las funciones fueron categorizadas en los niveles 1 y 2 de la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

En primer lugar observamos la gráfica basada en el nivel 1 de la KEGG, en la que distinguimos que en los pacientes positivos para *H. pylori*, las funciones de los procesos celulares y procesamiento de la información genética se encuentran más representados mientras que en el grupo de pacientes *H. pylori* negativo, las funciones de procesamiento de la información del medio ambiente y el metabolismo se encuentran aumentadas (puntuación LDA > 4.0).

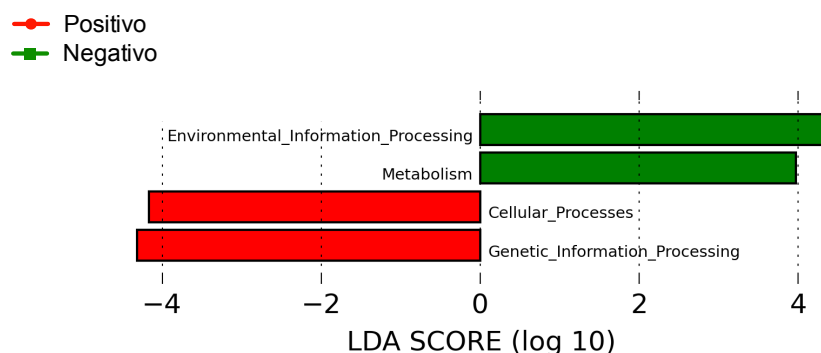


Figura 42. Predicción metagenómica por medio de PICRUST en función del estado de *H. pylori* a nivel 1 de la KEGG

En la siguiente gráfica, se profundiza de nivel de la KEGG (nivel 2), y distinguimos con mayor detalle que funciones se realizan en cada grupo.

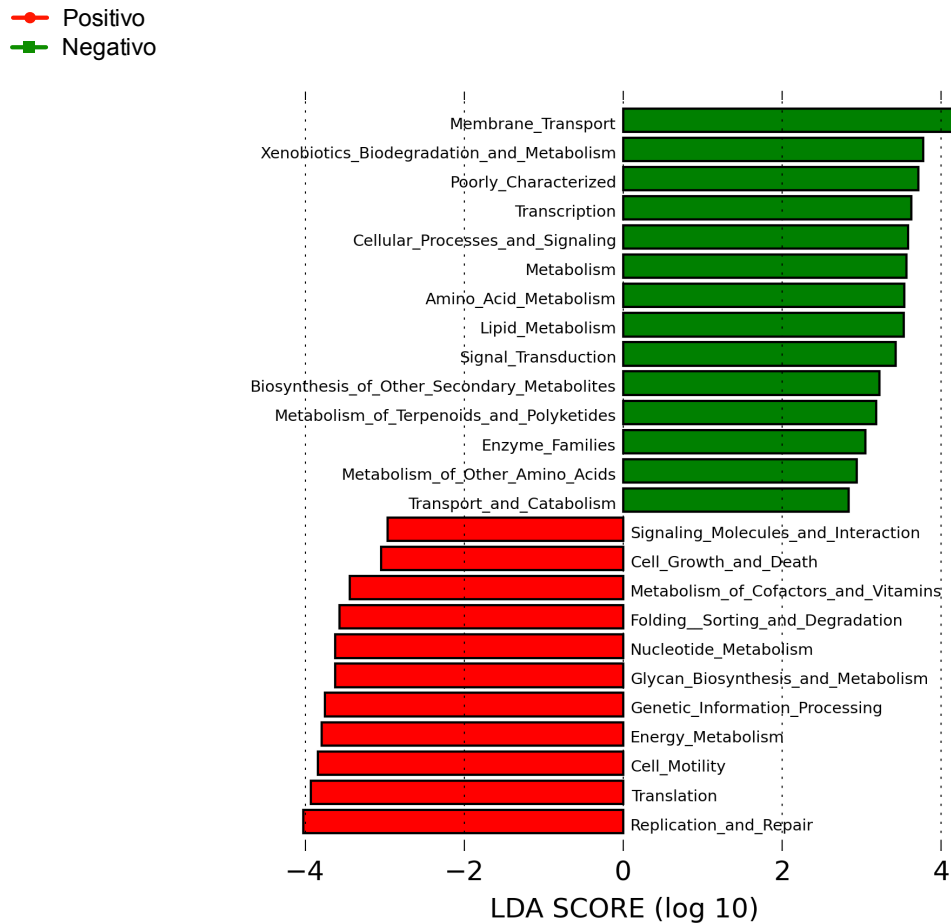


Figura 43. Predicción metagenómica por medio de PICRUSt en función del estado de *H. pylori* a nivel 2 de la KEGG

6.8. Microbioma de exudados rectales analizado mediante secuenciación de alto rendimiento

El número de secuencias obtenidas por medio de la secuenciación de alto rendimiento de los exudados rectales se pueden observar en la siguiente tabla:

Muestra	N	Máximo (secuencias)	Media (secuencias)	Mínimo (secuencias)
Exudado rectal	51	62462	21332.9	8456

Tabla 21. Número máximo, mínimo y media de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva del ADN en exudados rectales.

6.8.1. Estudio de la alfa diversidad en exudados rectales

De la misma forma, que en el estudio de la alfa diversidad de las muestras gástricas, en primer lugar, se muestra una gráfica de alfa diversidad de todas las muestras de exudados rectales para comprobar que todas las muestras alcanzan la meseta con lo que podemos considerar que estos datos representan la composición verdadera de nuestras muestras.

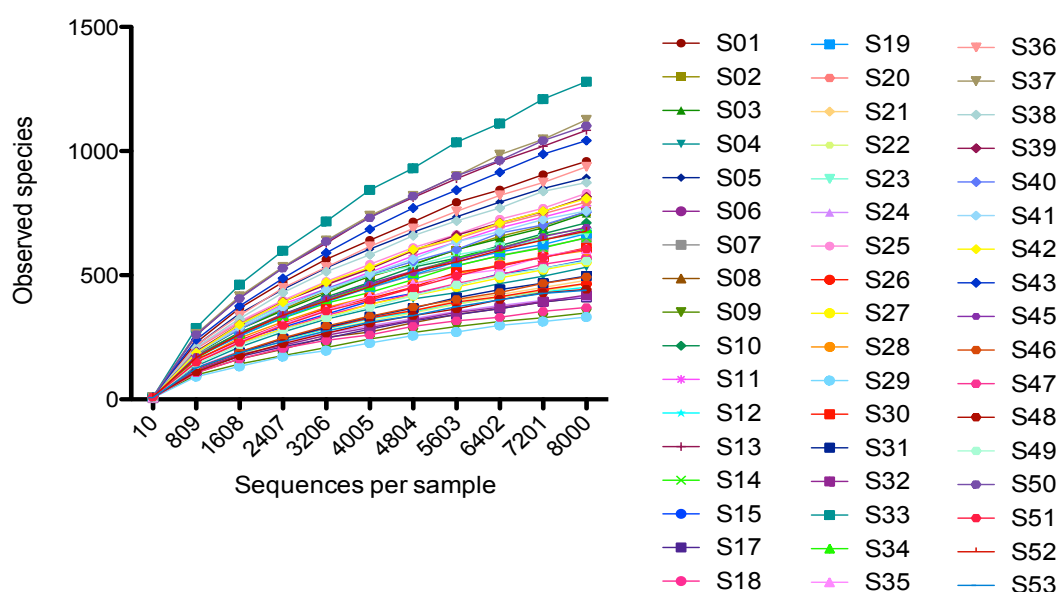


Figura 44. Alfa diversidad de los 51 exudados rectales incluidos en el estudio en función del número de especies observadas.

6.8.1.1. Estudio de la alfa diversidad en función del estado de *H. pylori*

En la siguiente gráfica, observamos la alfa diversidad intestinal en dos grupos de pacientes: *H. pylori* positivos (n=18) y *H. pylori* negativos (n=33).

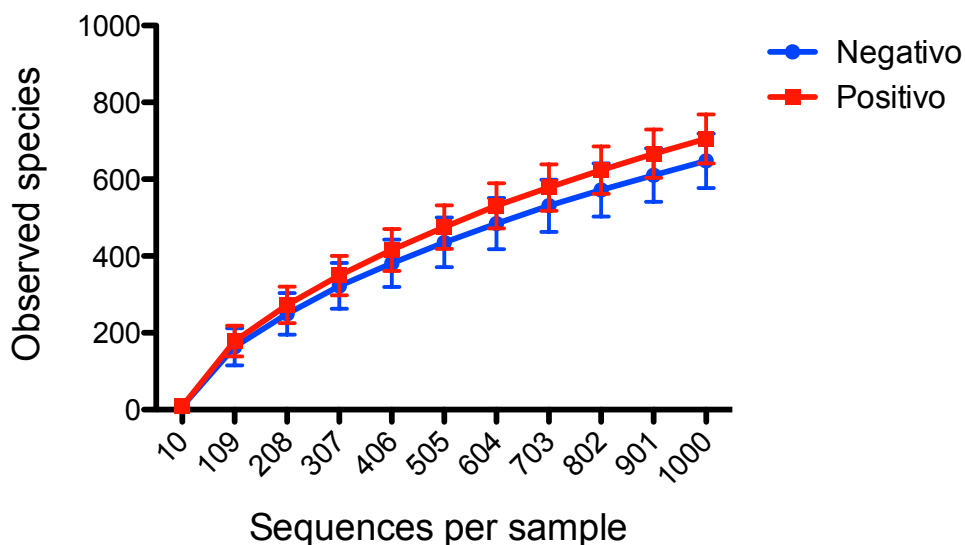


Figura 45. Alfa diversidad intestinal en función del estado de *H. pylori* representando el número de especies observadas

Como se puede observar, en el estudio de la alfa diversidad de las muestras rectales en función del número de especies observadas, los pacientes *H. pylori* positivos y negativos presentan una diversidad muy parecida, aunque ligeramente mayor en los pacientes positivos para *H. pylori*. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.329$) por lo que podemos decir que el estado del paciente frente a *H. pylori* no afecta a la diversidad microbiana intestinal.

Lo mismo ocurre cuando estudiamos la alfa diversidad en función de la distancia filogenética (Figura 46), en la que de la misma forma no hay diferencias entre la alfa diversidad de pacientes positivos para *H. pylori* y los negativos ($p=0.307$).

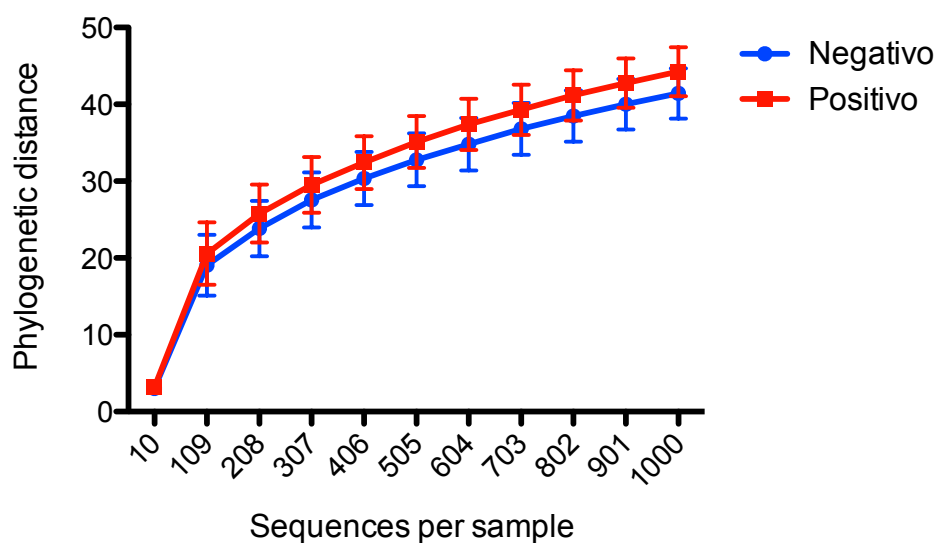


Figura 46. Alfa diversidad intestinal en función del estado de *H. pylori* representando la distancia filogenética

La media del índice Shannon fue $1,8 \pm 0,7$ para el grupo de pacientes *H. pylori* negativos y $2,0 \pm 0,7$ para el grupo de pacientes positivos para *H. pylori*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas lo que se traduce en que la diversidad del microbioma intestinal es muy similar en ambos grupos.

6.8.1.2. Estudio de la alfa diversidad en función de la histología

Como hemos visto anteriormente, según los resultados histológicos, se clasifican a los pacientes en 4 grupos: Pacientes con gastritis crónica (n=3), gastritis superficial activa (n=13), gastritis superficial no activa (n=18) y mucosa gástrica normal (n=13). La siguiente gráfica muestra la alfa diversidad en función de esta clasificación:

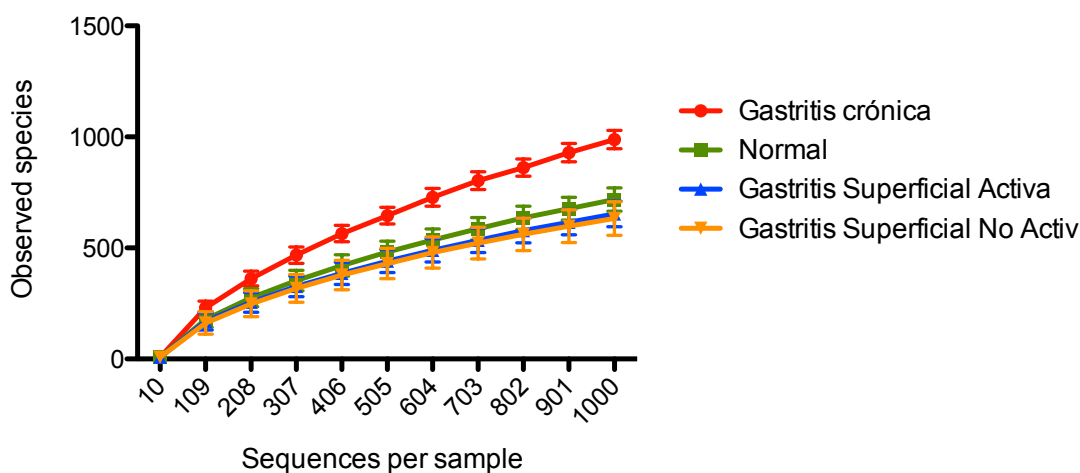


Figura 47. Alfa diversidad intestinal en función de los resultados histológicos representando el número de especies observadas

En esta gráfica observamos que los grupos de pacientes con gastritis superficial activa, gastritis superficial no activa y mucosa gástrica normal presentan una alfa diversidad muy similar entre sí tanto en función del número de especies observadas, como en función de la distancia filogenética. El grupo de pacientes que destaca es el de los que padecen gastritis crónica, los cuales tienen una mayor alfa diversidad.

En la siguiente gráfica, observamos la alfa diversidad intestinal en dos grupos de pacientes: Pacientes con gastritis activa (n=13) y pacientes con gastritis no activa

(n=18). La alfa diversidad está representada en función de la distancia filogenética y no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0.471$). Lo mismo ocurre cuando representamos la alfa diversidad en función del número de especies observadas.

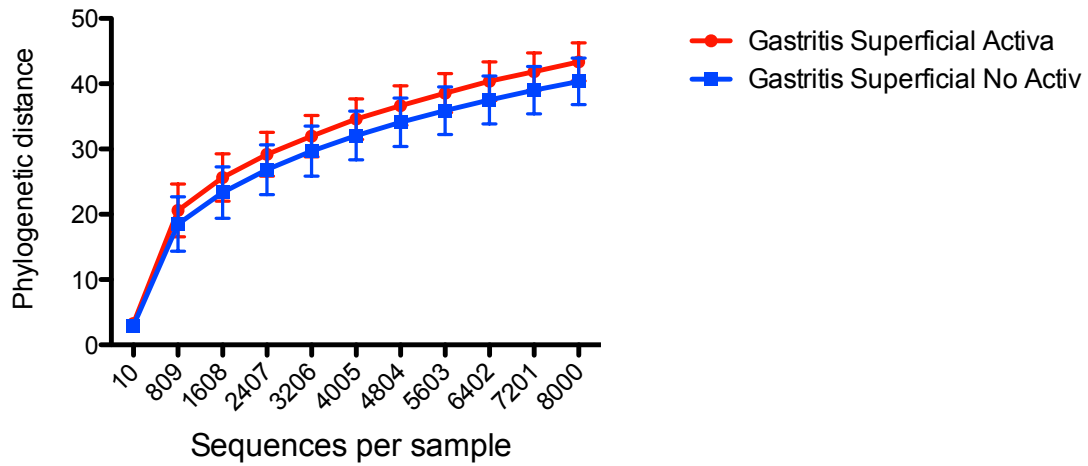


Figura 48. Alfa diversidad intestinal en función de la presencia de gastritis superficial activa o no activa representando la distancia filogenética

6.8.1.3. Estudio de la alfa diversidad en función del tipo de parto

Al comparar la alfa diversidad intestinal de los pacientes en función del tipo de parto por el que nacieron (cesárea o parto natural) vemos que los pacientes nacidos por cesárea (n=7) presentan una menor alfa diversidad que aquellos nacidos de forma natural (n=32) (Figura 49). La alfa diversidad en función de la distancia filogenética presentan la misma tendencia, pero en ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.629$). Esta misma situación ocurre al estudiar la diversidad gástrica, tal y como veíamos anteriormente.

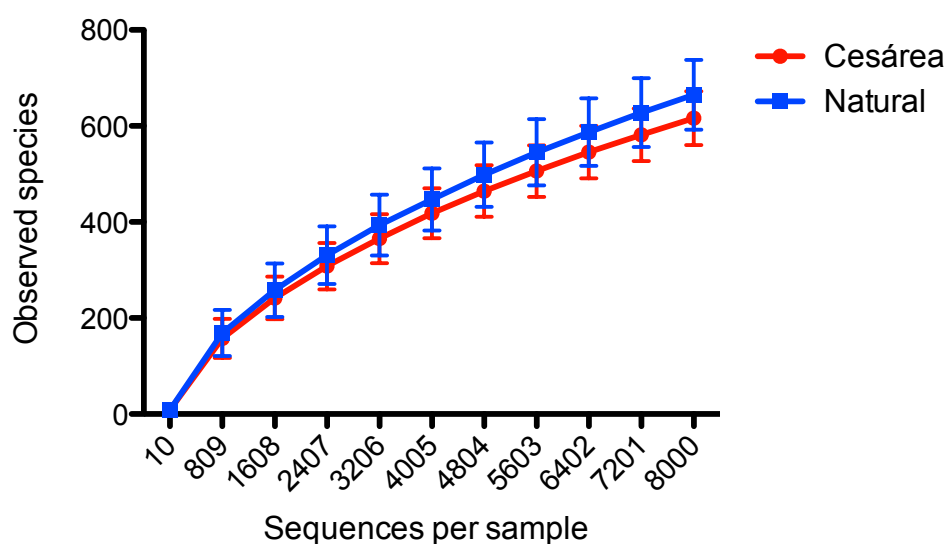


Figura 49. Alfa diversidad intestinal en función del tipo de parto representando el número de especies observadas

6.8.1.4. Estudio de la alfa diversidad en función de la nacionalidad

Al igual que en el estudio de la diversidad alfa en las muestras de biopsias gástricas vemos que los pacientes extranjeros (n=42) presentan una menor alfa diversidad intestinal que los pacientes españoles (n=9). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (p=0.082)

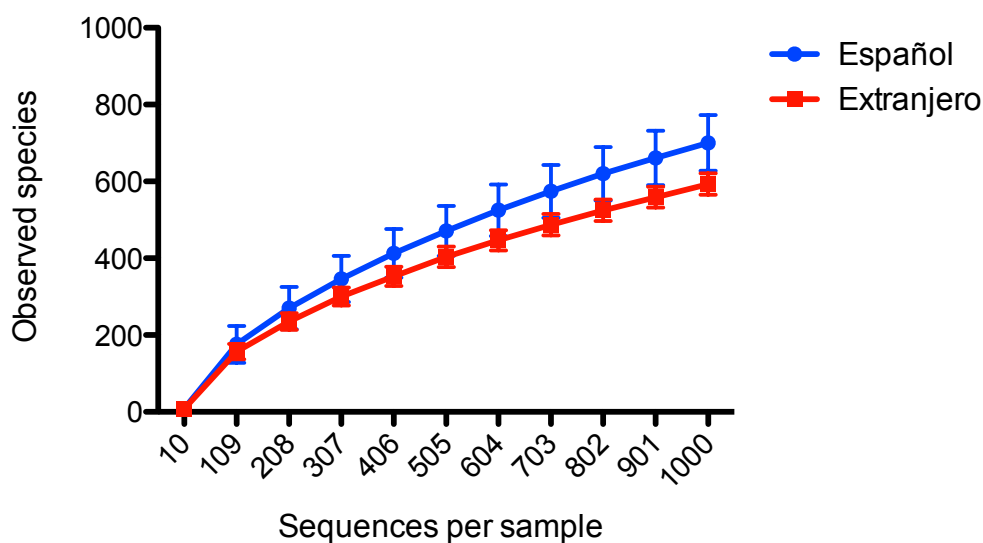


Figura 50. Alfa diversidad intestinal en función de la nacionalidad representando el número de especies observadas

6.8.1.5. Estudio de la alfa diversidad en función de otras variables

Al estudiar la alfa diversidad en función de otras variables como la edad, IMC, sexo o tratamiento previo no observamos diferencias significativas entre estos grupos de pacientes.

6.8.2. Estudio de la beta diversidad en las muestras rectales

6.8.2.1. Estudio de la beta diversidad en función del estado de *H. pylori*

El estudio de la beta diversidad de las muestras rectales en función del estado de *H. pylori*, da como resultado que la composición del microbioma intestinal de estos pacientes no se ve alterada por la presencia de *H. pylori* tanto en el análisis de la beta diversidad a nivel cuantitativo ($p=0.416$) como cualitativo ($p=0.614$).

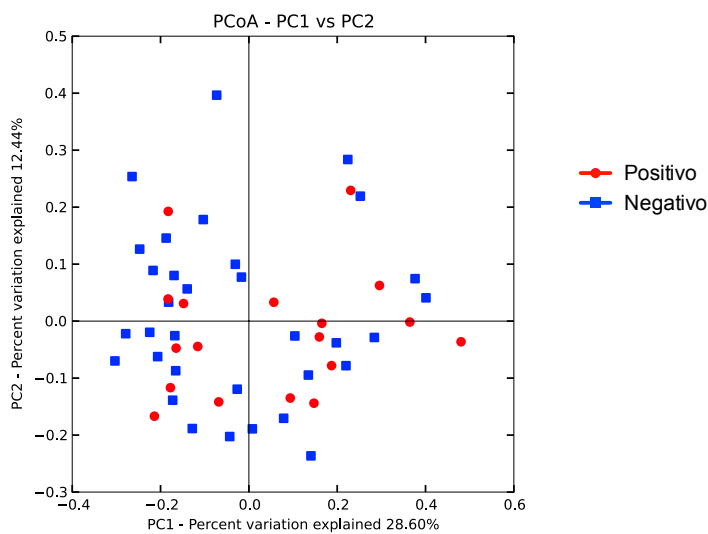


Figura 51. Análisis cuantitativo de la beta diversidad intestinal en función del estado de *H. pylori*

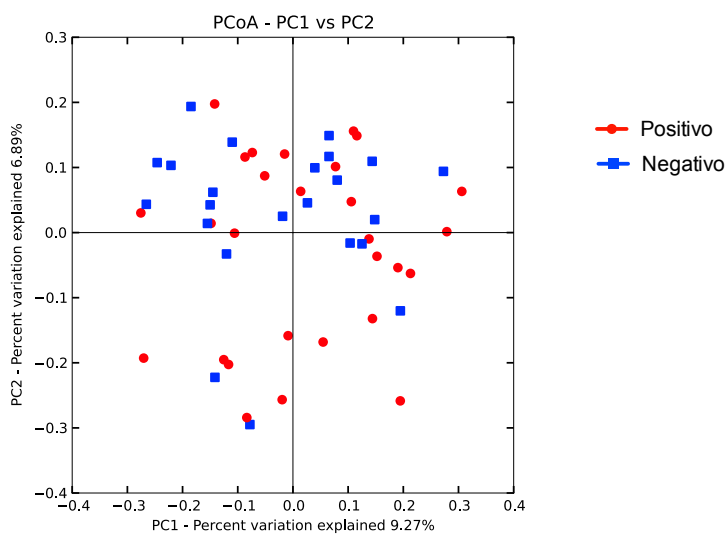


Figura 52. Análisis cualitativo de la beta diversidad intestinal en función del estado de *H. pylori*

6.8.2.2. Estudio de la beta diversidad en función de los resultados

histológicos

Se realizó el análisis de la beta diversidad en función de los resultados histológicos.

En primer lugar se realizó el estudio de la beta diversidad intestinal en función de si los pacientes presentaban gastritis superficial activa, gastritis superficial no activa, gastritis crónica o mucosa gástrica normal y no se encontraron diferencias en la composición bacteriana de estos grupos de pacientes.

Por otra parte, se realizó el estudio de la beta diversidad en función de si los pacientes presentaban gastritis activa superficial o gastritis no activa y tampoco se observaron diferencias.

6.8.2.3. Estudio de la beta diversidad en función de otras variables

Al estudiar la beta diversidad en función de otras variables como, el sexo, la edad, el IMC, la nacionalidad, el tipo de parto o el tratamiento previo recibido obtenemos resultados sin diferencias entre los grupos comparativos.

6.8.3. Análisis taxonómico de las comunidades microbianas intestinales

La mayoría de las bacterias del tracto gastrointestinal pertenecen a dos phyla:

Firmicutes y Bacteroidetes.

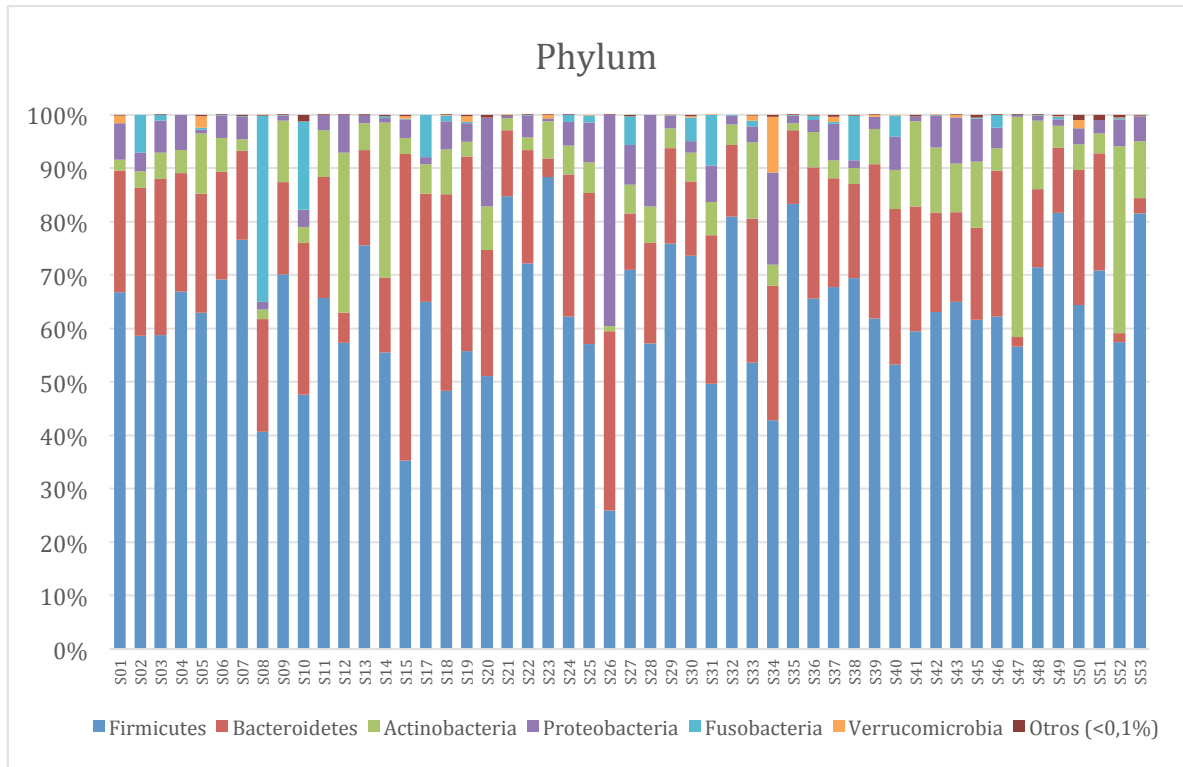


Figura 53. Análisis taxonómico a nivel de phylum de los 51 exudados rectales

6.8.3.1. Análisis taxonómico en función del estado de *H. pylori*

El análisis taxonómico a nivel de phylum de la microbiota intestinal, mostró que los phyla más abundantes en ambos grupos de pacientes fueron Firmicutes (59% en *H. pylori* positivos, 63% en *H. pylori* negativos), seguido de Bacteroidetes (21% en *H. pylori* positivos, 21% en *H. pylori* negativos), Actinobacteria (10% en *H. pylori* positivos, 8% en *H. pylori* negativos) y Proteobacteria (6% en *H. pylori* positivos, 3% en *H. pylori* negativos).

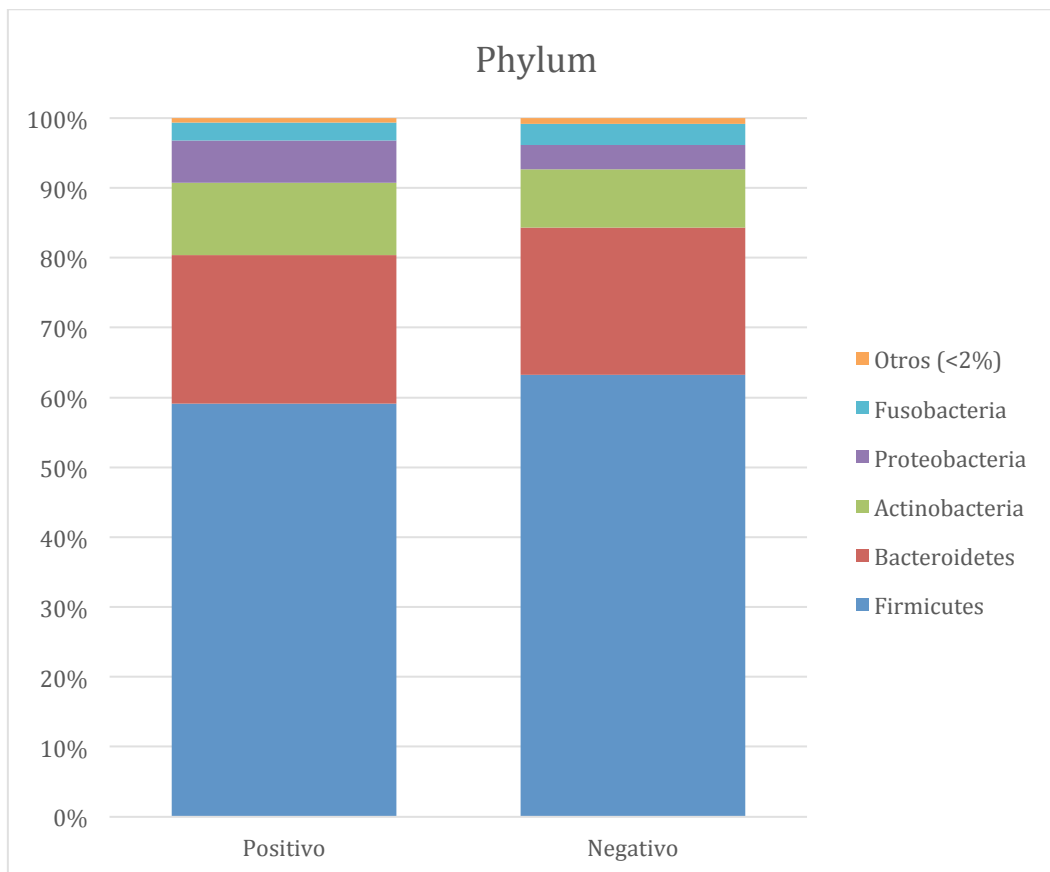


Figura 54. Asignación taxonómica a nivel de phylum en función del estado de *H. pylori*

Al realizar el análisis taxonómico a nivel de clase observamos que en ambos grupos de pacientes predomina principalmente la clase Clostridia, seguido de la clase Bacteroidia.

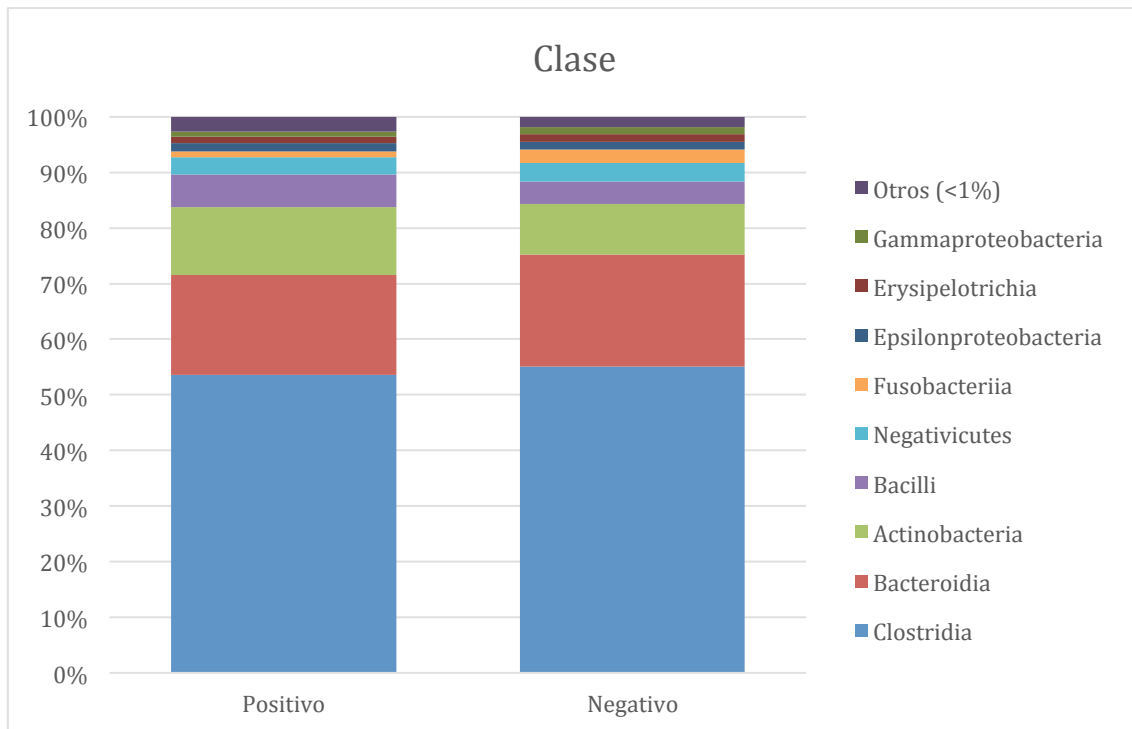


Figura 55. Asignación taxonómica a nivel de clase en función del estado de *H. pylori*

La taxonomía a nivel de orden sigue la misma tendencia vista en el nivel taxonómico anterior ya que las clases mayoritarias se desglosan en los órdenes Clostridiales y Bacteroidales.

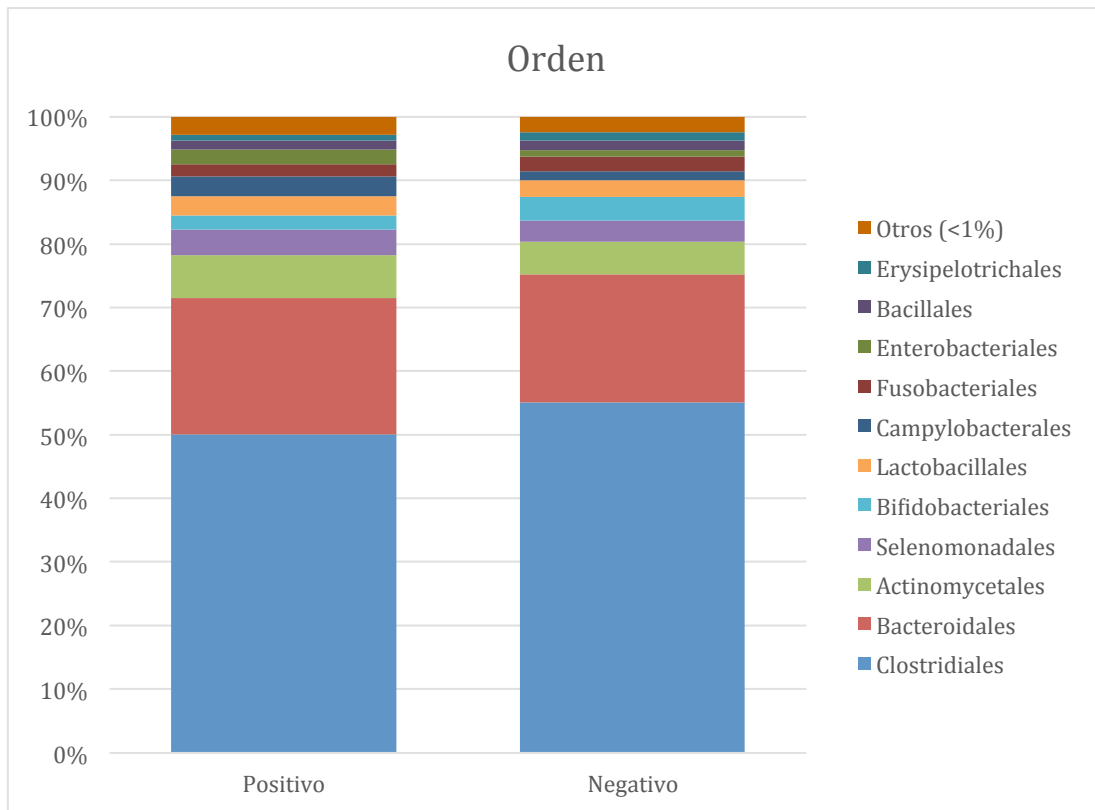


Figura 56. Asignación taxonómica a nivel de orden en función del estado de *H. pylori*

La composición taxonómica a nivel de familia indica que independientemente del estado del paciente frente a *H. pylori* la familia bacteriana más dominante es Clostridiales, seguido en menor proporción de las siguientes familias: Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Porphyromonadaceae.

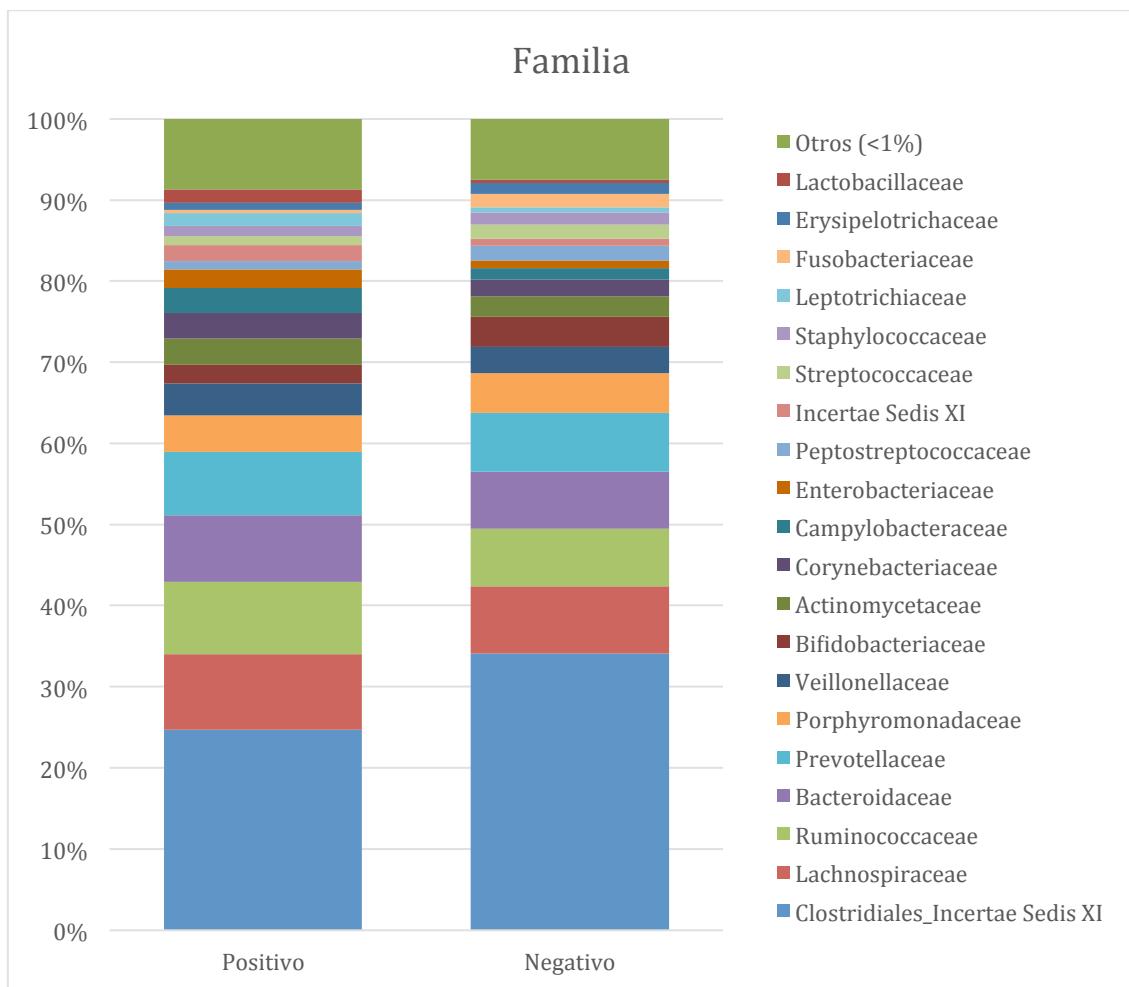


Figura 57. Asignación taxonómica a nivel de familia en función del estado de *H. pylori*

Profundizando a nivel de género observamos que en ambos grupo de pacientes predominan los mismos géneros: *Peptoniphilus*, *Bacteroides*, *Anaerococcus*, *Prevotella* y *Finogoldia*.

Cabe destacar que en ambos grupos hay un pequeño porcentaje del género *Campylobacter*, en los pacientes positivos un 3.1% y en los negativos un 1.5%.

Sin embargo, no se observa el género *Helicobacter* ni en el grupo de pacientes positivos ni en los negativos.

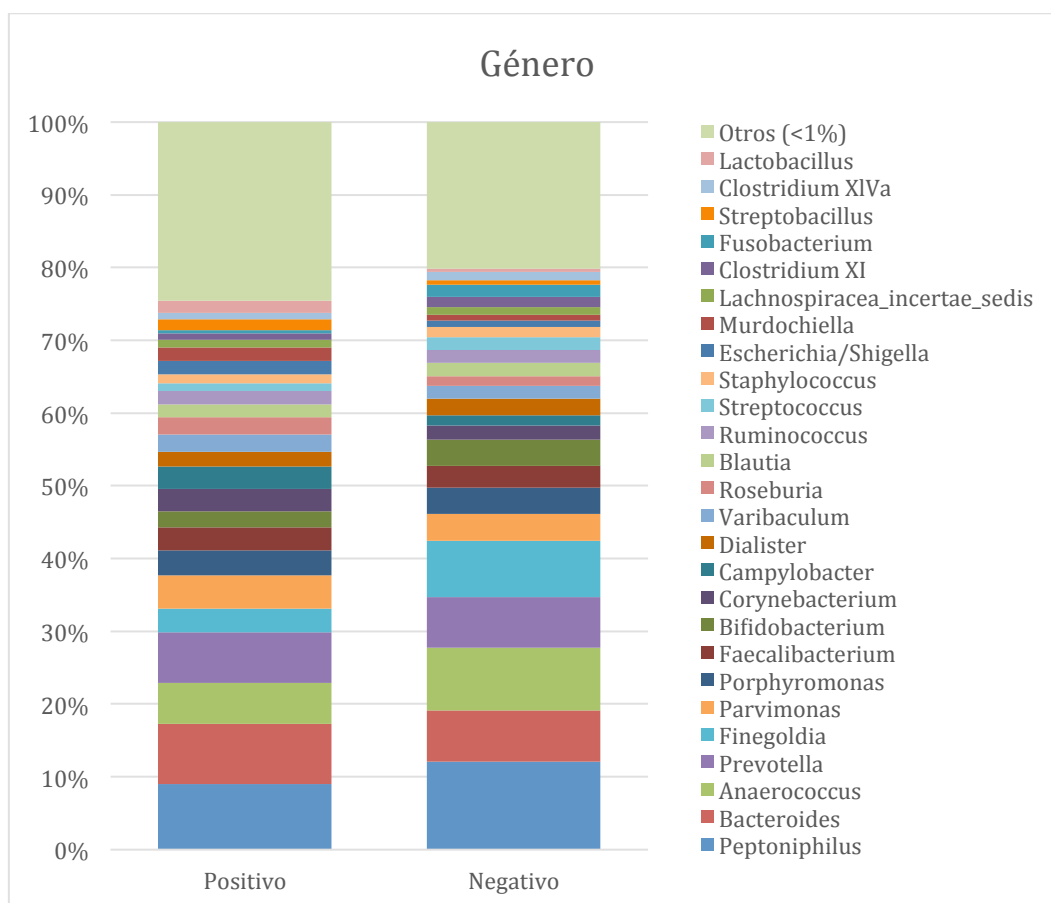


Figura 58. Asignación taxonómica a nivel de género en función del estado de *H. pylori*

6.8.4. Heatmap de los exudados rectales

Se ha realizado el heatmap a nivel de género y en relación al estado de *H. pylori* tal y como se muestra en la siguiente figura:

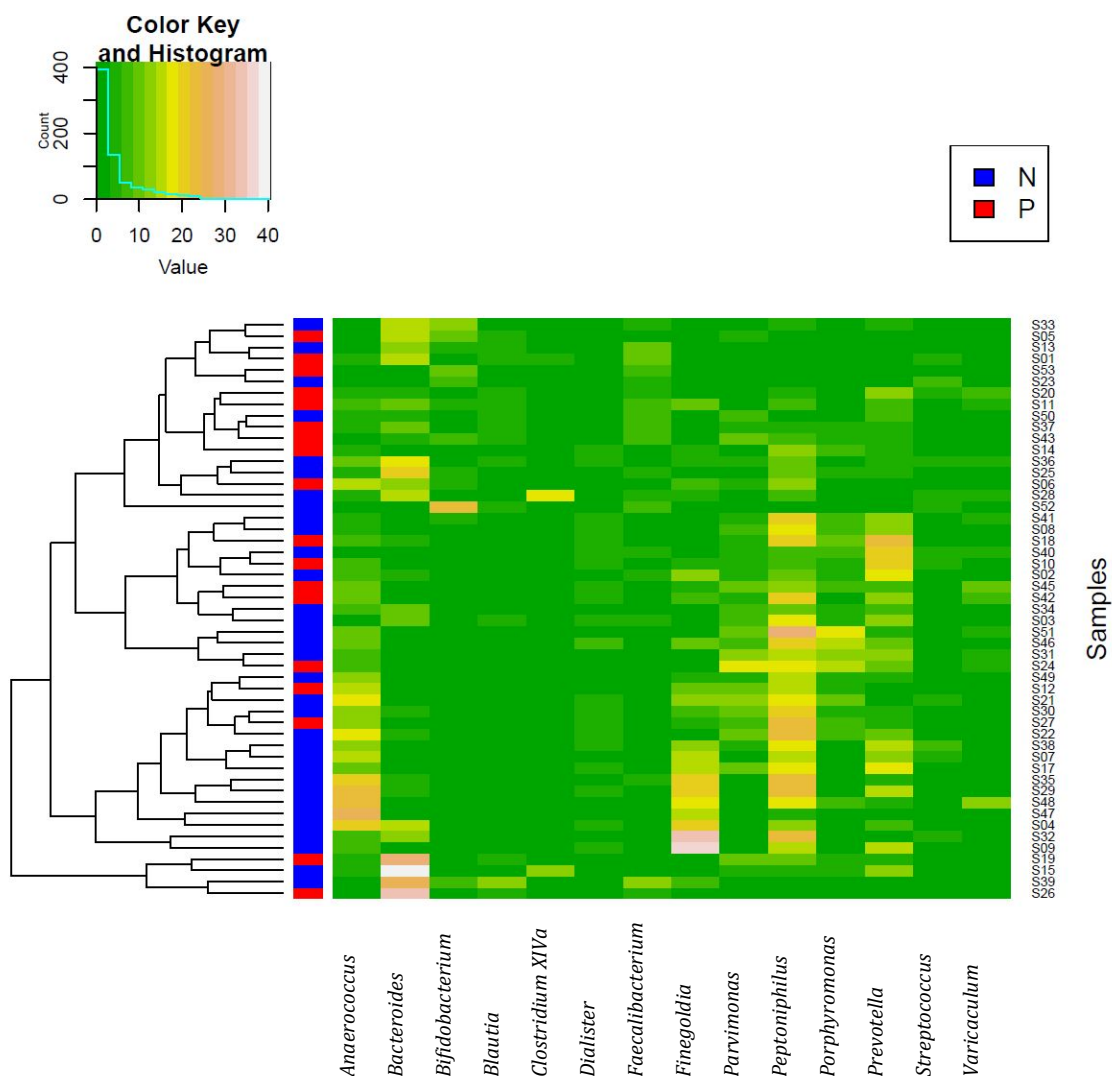


Figura 59. Heatmap a nivel de género de la microbiota intestinal (N=Negativo, P=Positivo)

En el heatmap de los datos obtenidos por secuenciación masiva del ADN de los exudados rectales vemos que hay algunos géneros que tienen una mayor abundancia relativa: *Anaerococcus*, *Bacteroides*, *Finegoldia*, *Peptoniphilus* y *Prevotella*. Sin embargo, no se observan diferencias entre los pacientes positivos y negativos para *H. pylori*.

6.8.5. LEfSe (LDA effect size analysis)

El análisis LEfSe de las comunidades microbianas intestinales en función del estado de *H. pylori*, se realizó en todos los niveles taxonómicos revelando diferencias significativas únicamente a nivel de phylum y género.

El análisis LEfSe a nivel de phylum reveló que hay una mayor representación del phylum Proteobacteria en los pacientes *H. pylori* positivos que en los negativos.

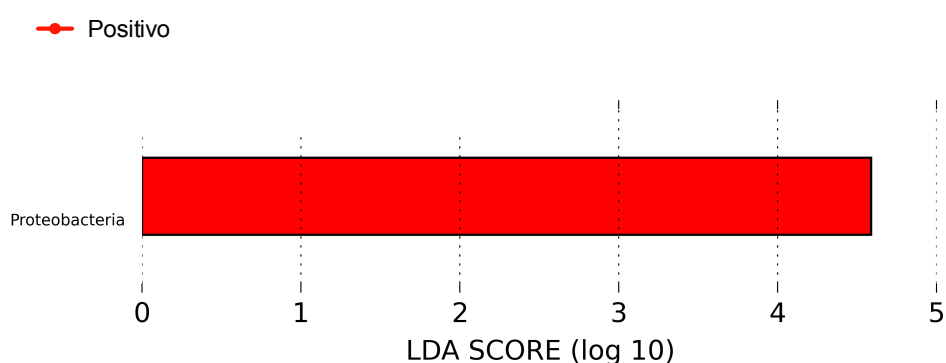


Figura 60. Análisis LEfSe a nivel de phylum en función del estado de *H. pylori*

El análisis LEfSe a nivel de género muestra que en los pacientes positivos para *H. pylori* hay una mayor abundancia del género *Anaerobacter* que en los pacientes negativos para *H. pylori*.

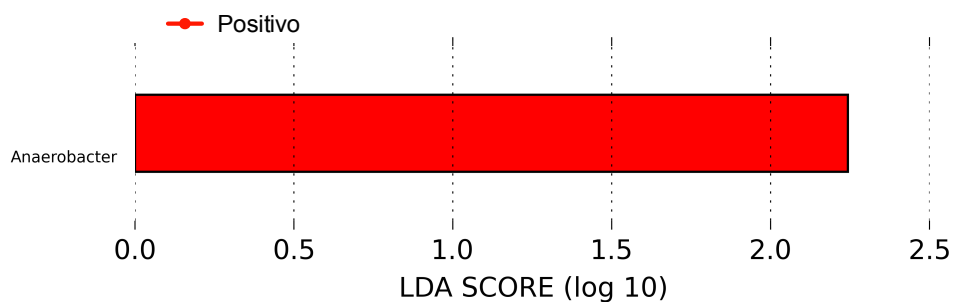


Figura 61. Análisis LEfSe a nivel de género en función del estado de *H. pylori*

6.9. Estudio de la diversidad microbiana entre los dos tipos de muestras

Debido a que el estudio del microbioma se realizó tanto a nivel gástrico como a nivel intestinal, es interesante comparar las comunidades microbianas de estos dos nichos ecológicos.

Como era de esperar el número de secuencias obtenidas por medio de la secuenciación masiva del ADN del material fecal que se encontraba en los exudados rectales es mucho mayor que el número de secuencias obtenidas tras la secuenciación masiva del ADN de las biopsias gástricas; tal y como podemos observar en la Tabla 22. En la que se presenta el número de muestras estudiadas en cada caso, el máximo, mínimo y media del número de secuencias obtenidas en cada tipo de muestra.

Muestra	Nº de muestras	Máximo nº de secuencias	Media	Mínimo nº de secuencias
Biopsia gástrica	51	21824	6395.3	1370
Exudado rectal	51	62462	21332.9	8456

Tabla 22. Número de secuencias obtenidas tras secuenciación masiva del ADN en función del tipo de muestra

Por otra parte, se ha realizado distintas medidas de diversidad entre estas dos comunidades microbianas. Se ha medido la alfa diversidad (diversidad en una muestra) y la beta diversidad (diversidad entre muestras).

Si consideramos en primer lugar la alfa diversidad de las comunidades microbianas gástricas e intestinales podemos observar en las Figuras 62 y 63 que en las muestras de biopsias gástricas hay una menor alfa diversidad en cuanto a la

distancia filogenética y en cuanto al número de especies observadas, que en las comunidades microbianas del material fecal. Esta diferencia es estadísticamente significativa en ambos casos ($p=0.001$).

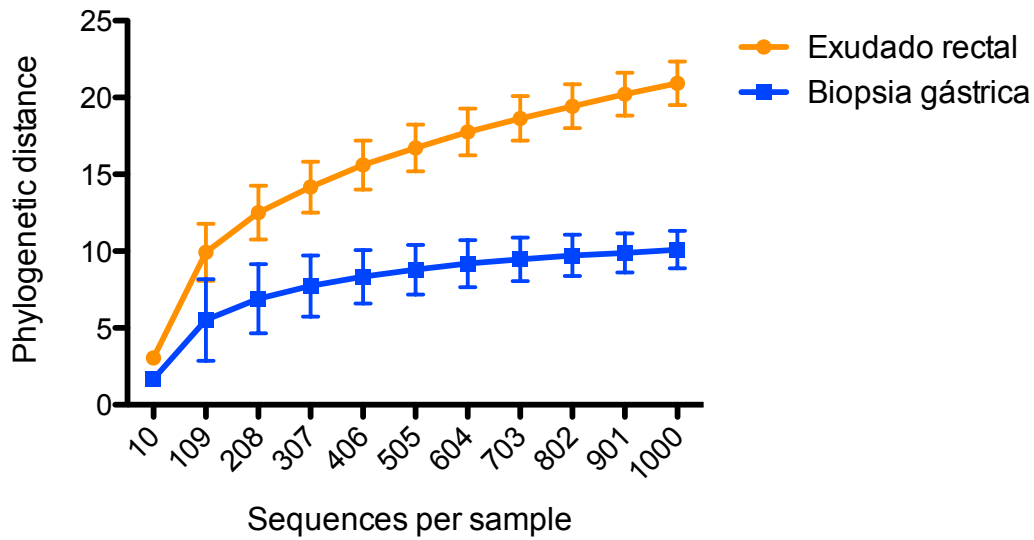


Figura 62. Alfa diversidad en función del tipo de muestra representando la distancia filogenética

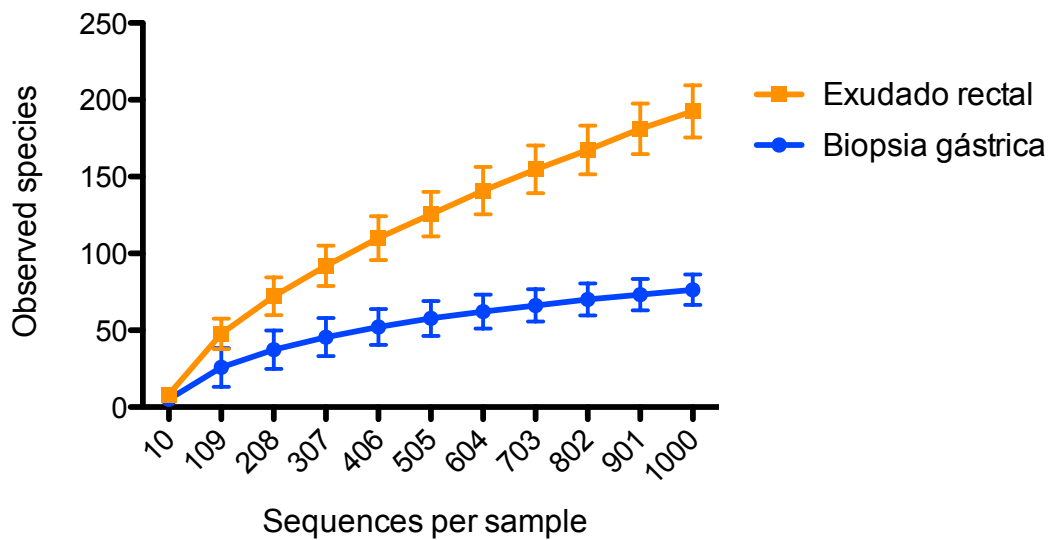


Figura 63. Alfa diversidad en función del tipo de muestra representando las especies observadas

Al estudiar la beta diversidad entre estas dos comunidades microbianas, llegamos a la conclusión observando las Figuras 64 y 65 de que estos dos tipos de muestra presentan una diferencia clara en cuanto a la composición bacteriana de las mismas, ya que en la gráfica de beta diversidad observamos dos clusters bien diferenciados para las muestras procedentes de biopsias gástricas y para las muestras de los exudados rectales. Estas diferencias se observan tanto en el análisis cualitativo ($p=0.001$) como en el cuantitativo ($p=0.001$).

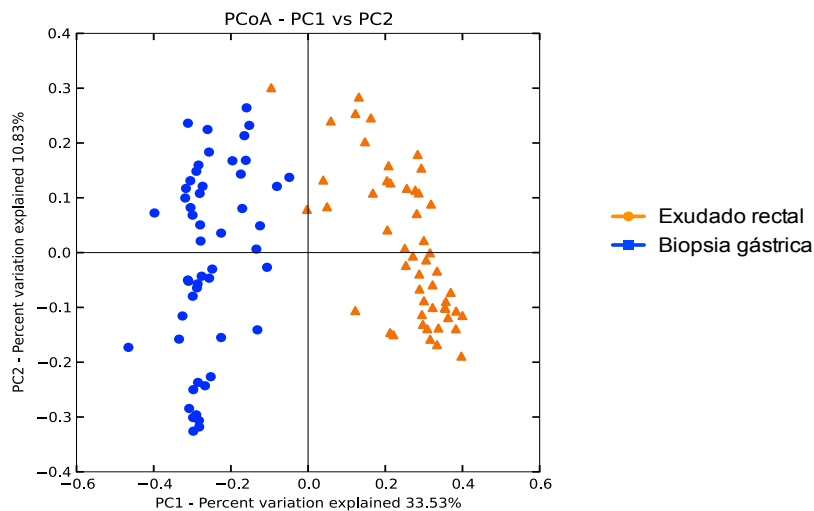


Figura 64. Análisis cuantitativo de la beta diversidad en función del tipo de muestra

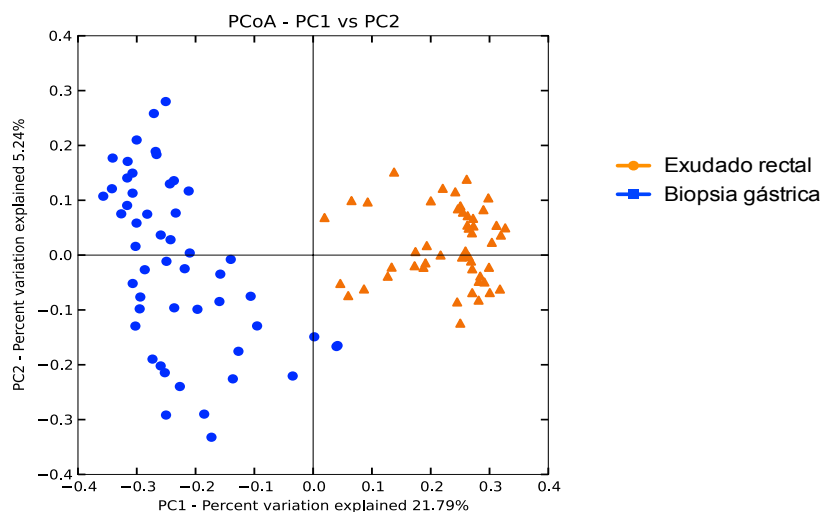


Figura 65. Análisis cualitativo de la beta diversidad en función del tipo de muestra

6.10. Análisis taxonómico en función del tipo de muestra

El análisis taxonómico en función del tipo de muestra, biopsia gástrica o exudado rectal, muestra que a pesar de que los filos mayoritarios son los mismos, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria, la abundancia relativa de estos filos varía mucho en función del tipo de muestra. Como vemos en la Figura 66 el filo mayoritario en las biopsias gástricas fue Proteobacteria y en los exudados rectales Firmicutes.

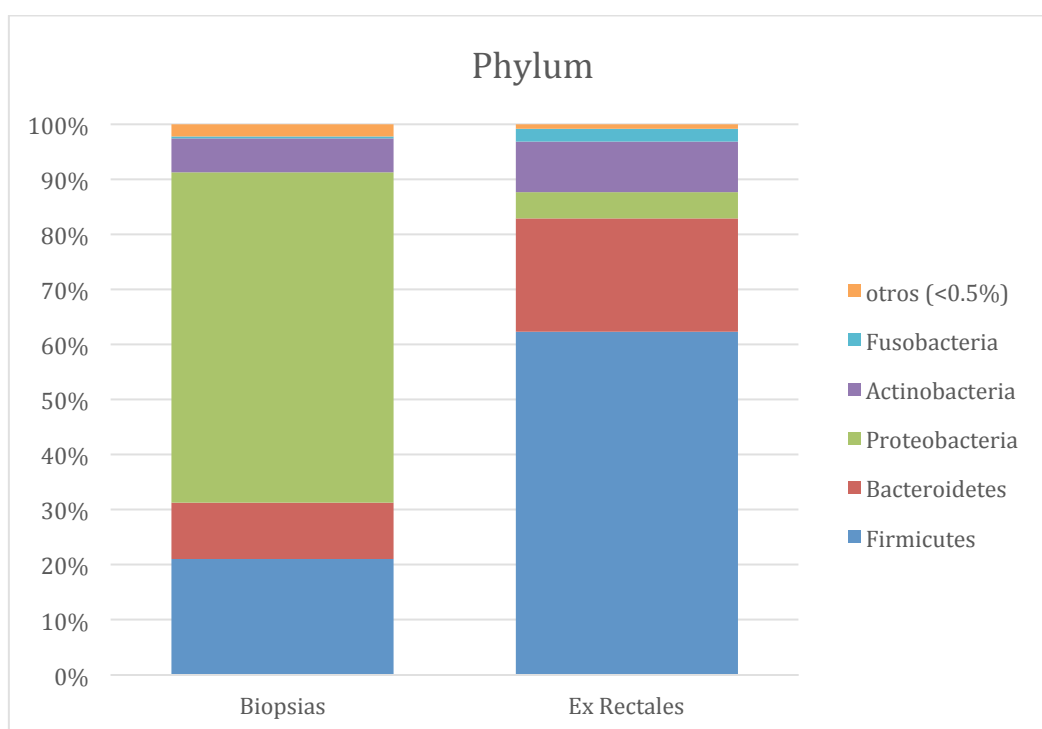


Figura 66. Asignación taxonómica a nivel de phylum en función del tipo de muestra

Como podemos observar al ir profundizando en los niveles taxonómicos siguientes estas dos comunidades microbianas se van diferenciando progresivamente la una de la otra, de forma que podemos distinguir dos nichos ecológicos distintos. Figuras 67,68 y 69.

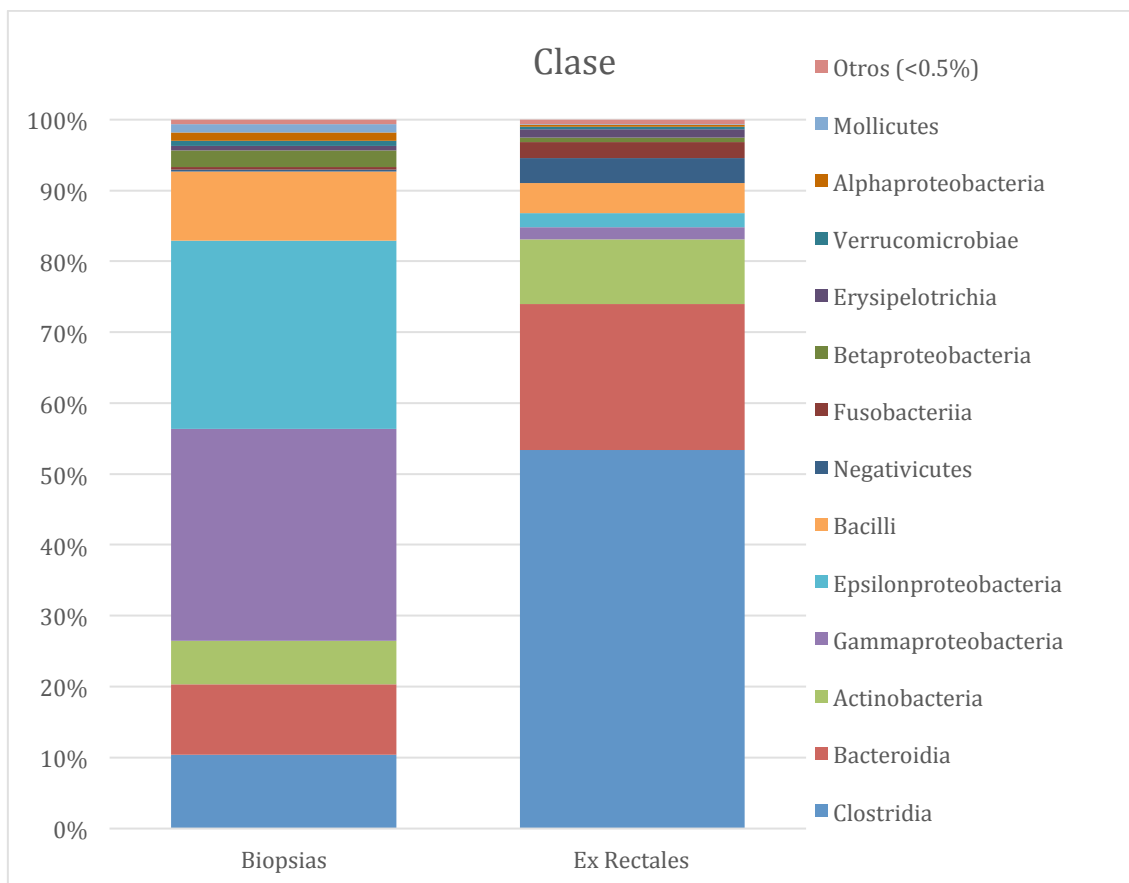


Figura 67. Asignación taxonómica a nivel de clase en función del tipo de muestra

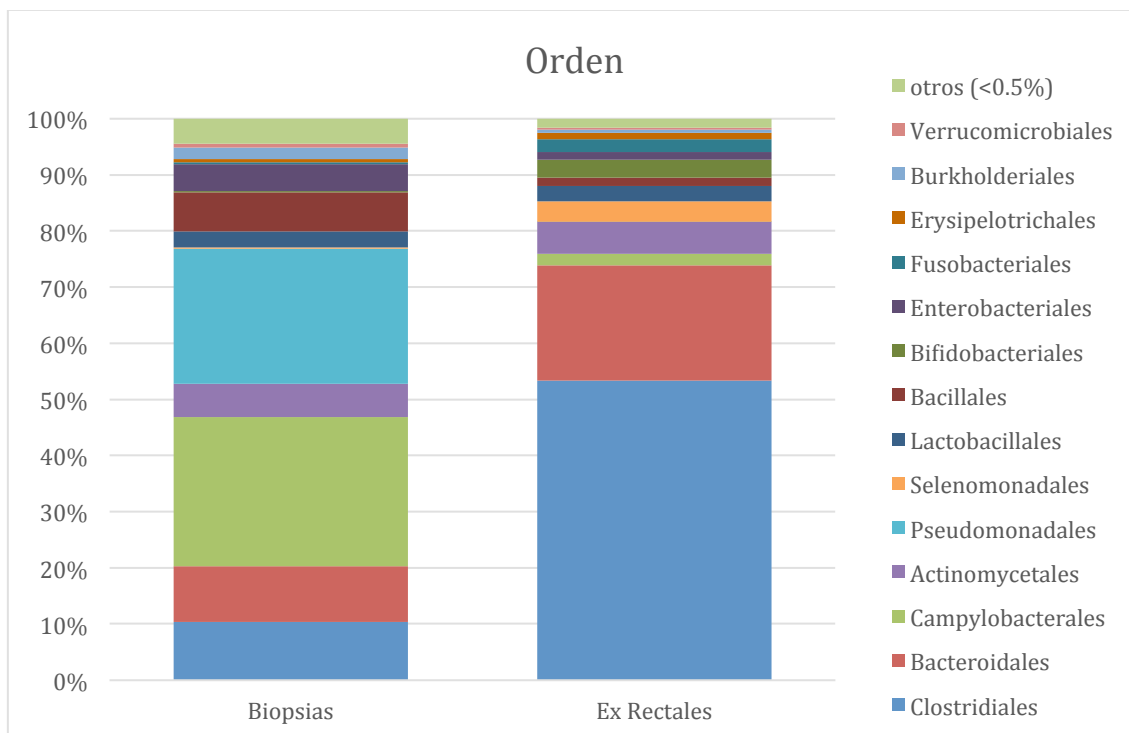


Figura 68. Asignación taxonómica a nivel de orden en función del tipo de muestra

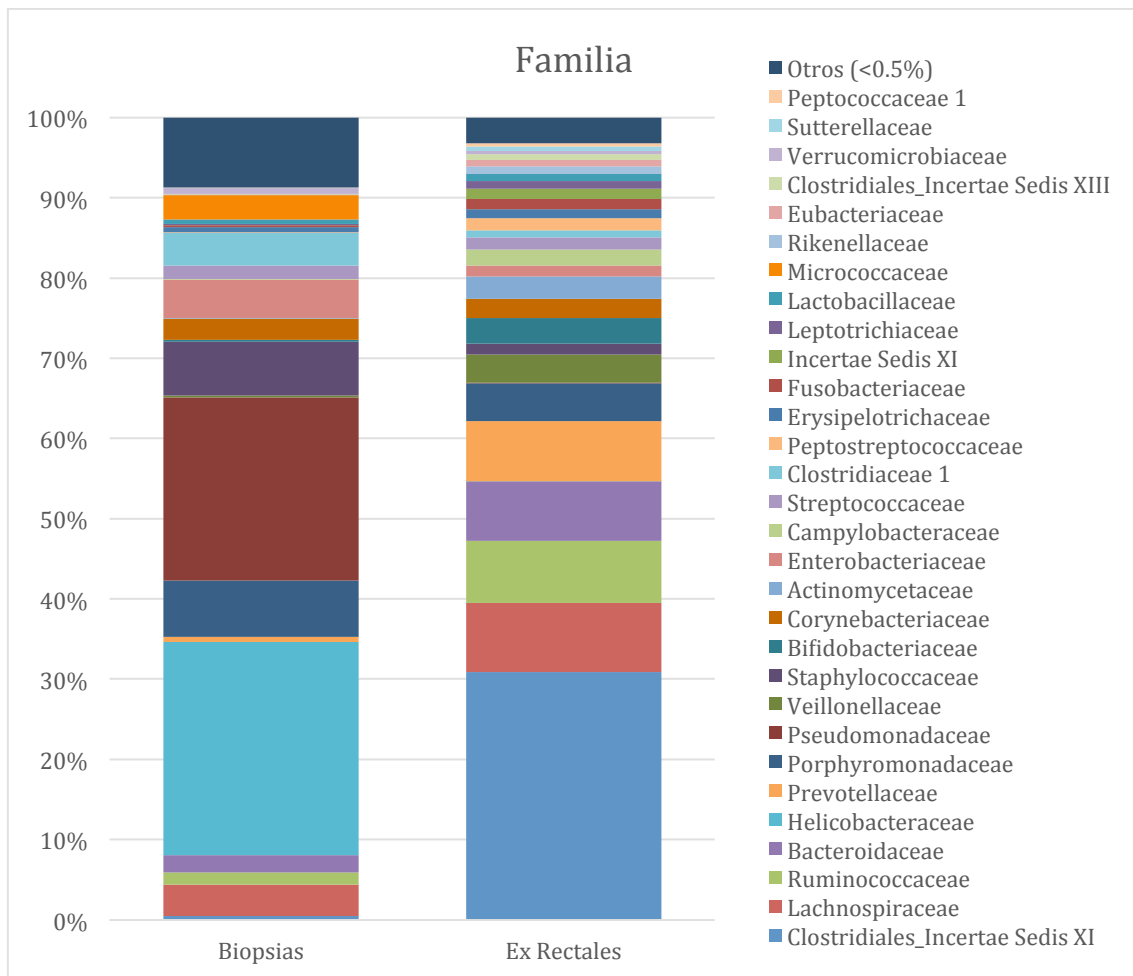


Figura 69. Asignación taxonómica a nivel de familia en función del tipo de muestra

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

La presencia de *H. pylori* se evaluó mediante pruebas convencionales como el TRU, el cultivo, la histología y con un método molecular, una PCR cuantitativa específica para *H. pylori*. Se confirmó que estas pruebas son métodos de diagnóstico fiables, ya que se observó que todos los pacientes considerados positivos por estos métodos tenían secuencias del género *Helicobacter* en el análisis del microbioma gástrico por secuenciación masiva.

Actualmente, no existe un método de referencia en el diagnóstico de *H. pylori*. Al elegir un método u otro 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) (215).

Del total de 18 pacientes *H. pylori* positivos, 8 tuvieron todas las pruebas positivas, 6 pacientes tuvieron 3 pruebas positivas y 4 pacientes sólo fueron positivos para dos pruebas. En este último grupo de pacientes, es importante aclarar que, en dos pacientes, no fue posible llevar a cabo todas las pruebas y el diagnóstico de *H. pylori* se llevó a cabo con sólo tres pruebas. En un paciente, la histología no se pudo realizar y en el otro paciente el cultivo de la biopsia no se pudo llevar a cabo.

El cultivo de *H. pylori* es sin duda, el método más específico pero presenta una sensibilidad más baja. En nuestro caso, en 3 pacientes con el resto de pruebas positivas (TRU, Histología y qPCR), no se pudo aislar *H. pylori* en cultivo. Esto se

debe principalmente a que *H. pylori* es un organismo muy lábil y que se contamina con facilidad, inhibiéndose su crecimiento.

Por otra parte, a pesar de que el TRU se considera un método muy sensible y específico, en dos pacientes (B6 y B10) con el resto de pruebas positivas el TRU fue negativo como podemos observar en la Figura 10. Tal y como comentan Uotani et al. las dos razones más comunes por las que el TRU puede dar resultados falsos negativos son el uso reciente de IBP y la presencia de metaplasia intestinal (216). En nuestro caso, ambos pacientes (B6 y B10) no habían recibido tratamiento reciente con IBP ni presentaban una metaplasia intestinal.

De la Figura 10, también vale la pena destacar los dos pacientes (B21 y B23) que presentaron el TRU positivo, sin embargo la PCR cuantitativa para la detección de *H. pylori* fue negativa. En el caso del primer paciente, B21, tuvo el resto de pruebas negativas (cultivo e histología) y en el caso del paciente B23 presentó el cultivo negativo y la histología positiva. Por lo que en el B21 se trata, probablemente, de un falso positivo del TRU mientras que en el B23 se trata de un falso negativo de la PCR cuantitativa.

Como hemos comentado anteriormente, la histología es la herramienta que nos permite conocer las lesiones presentes en la mucosa gástrica y detectar la presencia de *H. pylori*, aunque la sensibilidad y especificidad dependen del patólogo que lleva a cabo el análisis. En nuestro estudio, dos pacientes con el resto de pruebas positivas presentaron el examen histológico como negativo para la presencia de *H. pylori*.

La utilización de la PCR cuantitativa específica para *H. pylori* presenta la ventaja de que es un método muy sensible y específico y que permite detectar la presencia de *H. pylori* en aquellos pacientes que tienen una carga bacteriana baja (217). En

nuestro estudio no se dio el caso en el que un paciente tuviera la qPCR negativa y el resto de pruebas positivas. Algunos autores han demostrado que la PCR cuantitativa para detectar *H. pylori* en biopsias gástricas es más sensible que los métodos tradicionales (218). En nuestro trabajo, al utilizar un punto de corte <35 como positivo se consiguió una sensibilidad del 93.3% y una especificidad del 100%.

En población pediátrica, Agudo *et al* evaluaron un kit comercial de una PCR cuantitativa para la detección de *H. pylori* y de la resistencia a claritromicina en biopsias gástricas, MutaREAL *H. pylori* (Inmundiagnostik, Bensheim, Germany). La sensibilidad y la especificidad de este método para la detección de *H. pylori* fueron 93.3% y 86.9% respectivamente (219).

7.2. Características clínico-demográficas de los pacientes en función del estado de *H. pylori*

Varios estudios han evaluado la influencia de *H. pylori* sobre el peso del paciente obteniendo resultados diferentes tanto en niños como en adultos (220,221). En nuestro estudio, hubo una asociación significativa entre la positividad para *H. pylori* y un bajo IMC apoyando los hallazgos previos en Colombia (220,222); sin embargo, sería necesario confirmar estos resultados con un mayor número de pacientes. El estudio de Mera *et al.* (124) describe un impacto significativo de la adquisición de *H. pylori* en la estatura y el peso. Por otra parte, también se ha evaluado el efecto de la infección por *H. pylori* en la tasa de retraso de crecimiento, como en el estudio de Goodman *et al.* en el que se observa que la infección por *H. pylori* es acompañada por un crecimiento lento en niños en edad escolar de los

Andes de Colombia (222). Una publicación más reciente ha sugerido que el impacto en el crecimiento es el resultado de la anemia por deficiencia de hierro como consecuencia de la gastritis crónica causada por *H. pylori* (124). Otra posible explicación podría ser el efecto de la gastritis en las hormonas que intervienen en el control del apetito (223).

Por otra parte, nuestros hallazgos endoscópicos, y otros descritos previamente (224), confirmaron que hay un mayor porcentaje de nodularidad antral en los pacientes positivos para *H. pylori* que en los pacientes negativos ($p < 0,001$). En lo que se refiere a los resultados histológicos, la presencia de gastritis superficial activa fue más frecuentemente encontrada en los pacientes positivos, mientras que gastritis superficial no activa fue más frecuente en los pacientes negativos ($p = 0,001$).

7.3. Microbioma gástrico

Las bacterias que van colonizando al recién nacido afectan a su desarrollo durante las distintas etapas del crecimiento y están influidas por diversos factores tales como la flora de la madre, alimentación durante el embarazo, tipo de parto, dieta del bebé (lactancia materna o fórmula) e higiene.

Durante mucho tiempo, se pensó que el estómago era un órgano estéril, debido principalmente al bajo pH asociado a la producción de ácido clorhídrico. Sin embargo, con el descubrimiento de *H. pylori* la comunidad científica refutó este dogma y hoy en día, gracias a la llegada de las nuevas técnicas de secuenciación de ADN de alto rendimiento, es posible demostrar que otros microorganismos más allá de *H. pylori* pueden colonizar la mucosa gástrica (225), y que la distribución

bacteriana está dominada en pacientes adultos, principalmente por cuatro filos (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria)(226). La composición de la microbiota gástrica a nivel de género es muy dinámica y está afectada además de por la inflamación y la presencia de *H. pylori*, también por varios factores como los hábitos dietéticos, la toma de antibióticos, el tipo de vida urbano o rural, etc (225).

Para estudiar la influencia del estado de infección de *H. pylori* en la diversidad microbiana gástrica, se examinaron las curvas de rarefacción de la diversidad filogenética, las especies observadas y el Índice de Shannon (204,227).

El aumento de la alfa-diversidad bacteriana entre individuos *H. pylori*-negativo coincidiría con el estudio de Clemente en el que se mencionó que una mayor diversidad microbiana, era en general, asociada con un mejor estado de salud (228). Por otra parte, nuestros resultados informan que el estómago muestra una mayor diversidad microbiana cuando *H. pylori* está ausente que cuando está presente. Otros autores también han descrito estos resultados (229,230).

Al realizar el estudio de la diversidad beta en función del estado del paciente frente a *H. pylori*, podemos comprobar la hipótesis de nuestro estudio, según la cual comprobamos que la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica supone un claro predominio de esta bacteria lo que altera la composición microbiana de los pacientes positivos. Estas diferencias entre los grupos de pacientes positivos y negativos para *H. pylori* se observaron con significación estadística en el análisis cuantitativo de la beta diversidad ($p=0.001$) y aunque en el análisis cuantitativo no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.062$) se puede observar una tendencia de los pacientes positivos a agruparse entre sí

Tal y como hemos comentado anteriormente los pacientes positivos y negativos se separaban en dos agrupaciones en el análisis cuantitativo de la beta diversidad. Sin embargo, hubo seis muestras de pacientes *H. pylori* positivos que se solapan con el grupo de pacientes *H. pylori* negativos como vemos en la Figura 20. La característica que tienen en común estas seis muestras, era que tenían baja abundancia relativa en comparación con otras muestras de pacientes positivos para *H. pylori*. De hecho, a excepción de una muestra que tenía una abundancia relativa del género *Helicobacter* de 31,2%, las 5 muestras restantes no tenían más de 16% de abundancia relativa del género *Helicobacter*. Por lo tanto, este solapamiento puede ser explicado por la baja abundancia relativa del género *Helicobacter* en estas muestras debido a un reciente colonización por *H. pylori* o bien por tratarse de una cepa menos virulenta que no es capaz de dominar el ecosistema. El porcentaje de abundancia relativa del género *Helicobacter* del resto de pacientes positivos para *H. pylori* es del 75,1%.

El análisis de las comunidades microbianas gástricas reveló la presencia de un microbioma complejo y rico. Como se muestra en los estudios realizados con adultos, los filos más abundantes en el microbioma gástrico fueron Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria (225,226,231,232). En nuestro estudio, se confirmó que en la población pediátrica se observa el mismo patrón.

La presencia de *H. pylori* en el estómago no implica un cambio en los filos más abundantes, ya que estos cuatro filos son los mismos en los pacientes positivos y negativos. Sin embargo, si que se puede observar un cambio en la abundancia relativa. En primer lugar, se distingue un aumento del filo Proteobacteria en los pacientes *H. pylori* positivos y un ligero aumento en el filo Firmicutes en pacientes que resultaron negativos para *H. pylori*. El aumento del filo Proteobacteria en los

pacientes que dieron positivo para *H. pylori* se debe principalmente al predominio del género *Helicobacter*, ya que es una Proteobacteria. Esto fue confirmado posteriormente por medio del análisis LEfSe, mostrando que el filo Proteobacteria y la clase Epsilonproteobacteria estaban sobrerrepresentadas en pacientes *H. pylori* positivos.

Un análisis más detallado de la composición de las comunidades microbianas a nivel de género nos permite confirmar que en los pacientes *H. pylori* positivos hay un claro dominio de esta bacteria en relación con el grupo de pacientes negativos y coincide con lo informado en estudios anteriores llevados a cabo con muestras de individuos adultos (38,43). Sin embargo, como observamos en la Tabla 20, hay 8 pacientes negativos para *H. pylori* que presentan una abundancia relativa del género *Helicobacter* entre el 1% y el 3.5% (B32, B47, B15, B17, B41, B28, B03 y B07). De estos pacientes, 3 de ellos (B32, B15 y B28) habían recibido tratamiento previo para erradicar *H. pylori* y otro paciente (B47) había recibido IBP como tratamiento. Puede ser que estos pacientes tuvieran pocas secuencias de este microorganismo por haber recibido tratamiento previo. De todas formas, desconocemos la viabilidad del microorganismo, tal vez solo fueran restos de ADN de *Helicobacter*, y para comprobarlo tendríamos que llevar a cabo la técnica de metatranscriptómica.

Tanto en el grupo de pacientes *H. pylori* positivos como en los negativos, *Pseudomonas* fue el segundo género más abundante. Este género se ha descrito previamente en la microbiota gástrica por métodos convencionales (232,233) y también mediante secuenciación de alto rendimiento por Delgado et al. (234), aunque en menor abundancia relativa que en nuestro estudio. Sin embargo, no hay datos disponibles sobre la microbiota del estómago de pacientes pediátricos, por lo

que esto podría ser una característica específica de la microbiota gástrica pediátrica.

El tercer género que se encuentra tanto en niños positivos como en negativos para *H. pylori* fue el género *Staphylococcus*. La presencia de estas bacterias ha sido ampliamente descrita en muestras de estómagos adultos humanos (232).

Como se describe en los resultados, se encontró una microbiota similar en los grupos de pacientes positivos y negativos para *H. pylori* cuando se restaron las secuencias de *Helicobacter* (Figura 36), siendo el género *Corynebacterium* más representado en los pacientes positivos para *H. pylori* y los géneros *Clostridium*, *Escherichia/Shigella* y *Rothia* en pacientes *H. pylori* negativos. Esto sugiere que el entorno de la mucosa gástrica es de alguna manera alterada por la presencia de *Helicobacter*, o que existen ciertas interacciones antagónicas entre *Helicobacter* y estas bacterias. Yang et al. (235) informaron que los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Veilonella* fueron los más frecuentes en los pacientes *H. pylori* negativos. Estos resultados son consistentes con nuestros resultados en cuanto al género *Clostridium* donde se observó un aumento significativo en los pacientes *H. pylori* negativos. Se observó una discrepancia interesante entre nuestro estudio y el estudio de Yang et al. ya que encontramos el género *Corynebacterium* de forma más frecuente en pacientes *H. pylori* positivos. Sin embargo, Khosravi et al. también informó de un aumento del número de *Corynebacterium* en pacientes *H. pylori* positivos(236). Por otra parte, en nuestro estudio, el género *Lactobacillus* fue encontrado en un bajo porcentaje en ambos grupos.

En cuanto al análisis de la microbiota, en función de los resultados histológicos fue muy interesante observar que el grupo de pacientes con menor alfa diversidad fueron los que tenían gastritis superficial activa como hemos mencionado anteriormente. Esto se puede explicar por el hecho de que estos pacientes tienen una alta prevalencia de *H. pylori* en las muestras gástricas según lo revelado por el análisis taxonómico, gracias al cual es posible saber que el porcentaje medio de la abundancia relativa de *H. pylori* en estos pacientes es 61,2 %. Se detectó una mayor abundancia relativa de la clase *Erysipelotrichia* en los pacientes *H. pylori* negativos que tenían gastritis superficial activa en comparación con los que no la tenían, mientras el género *Comamonas* fue más abundante en los pacientes *H. pylori* negativos sin gastritis superficial activa.

El análisis de la microbiota en función de la nacionalidad no aporta diferencias significativas, sin embargo, sería conveniente realizar este estudio con un número de muestras más grande ya que los dos grupos no son equiparables (pacientes españoles n=42; pacientes extranjeros n=9). Otros autores han estudiado el efecto de la nacionalidad en la microbiota intestinal y han visto que cambia considerablemente según la zona geográfica (237,238).

Utilizando el análisis predictivo metagenómico PICRUSt se observaron algunas diferencias en categorías funcionales KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) en los pacientes positivos y negativos para *H. pylori*, principalmente se observa que en los pacientes positivos predominan las funciones relacionadas con los procesos celulares y procesamiento de la información genética. Actualmente esta herramienta, todavía es muy novedosa, pero ya hay varios trabajos en los que se ha realizado la predicción metagenómica a partir del análisis PICRUSt (211,239–242). Este análisis tiene ciertas limitaciones ya que no se trata de una

medición, sino de una aproximación de las funciones microbianas. Para corroborar las funciones de las comunidades microbianas gástricas sería conveniente realizar una secuenciación del genoma completo o una técnica de metaproteómica(214).

Se ha descrito que en raros casos, el estómago humano puede estar colonizado por otras especies de *Helicobacter* (235). Por ejemplo, *Helicobacter heilmannii* se ha aislado de biopsias gástricas humanas (243). Por ello, en estas técnicas de secuenciación en las que el análisis del ADN a nivel de especie no siempre se puede realizar, una posible limitación del estudio sería que las secuencias del género *Helicobacter* pertenecieran a especies de *Helicobacter* distintas de *H. pylori*. Sin embargo, la prevalencia de especies no-*pylori* en el estómago humano es muy baja, cuando se utilizan métodos de diagnóstico convencionales, especialmente en niños (244,245).

Parece que la acidez gástrica es un factor fundamental para la diversidad y la composición de las comunidades microbianas intestinales, ya que este órgano actúa como un filtro ecológico, por lo que además de iniciar el proceso de la digestión también tiene un papel muy importante como primera línea de defensa de los microorganismos transmitidos por los alimentos, tal y como explican en algunos artículos publicados (246,247). Esta función de filtro, puede ser alterada por distintas situaciones como la presencia de *H. pylori*, por lo que sería interesante seguir investigando en esta línea para comprobar las alteraciones que pueden aparecer en la microbiota intestinal tras la colonización por *H. pylori*.

7.4. Microbioma intestinal

La caracterización de las comunidades microbianas intestinales es el tema dentro del análisis del microbioma humano que más se ha estudiado por diferentes autores. La intención al estudiar el microbioma intestinal en este trabajo era por una parte corroborar cuales eran las comunidades microbianas más prevalentes en la población pediátrica y sobretodo ver si el microbioma intestinal se veía afectado por la presencia de *H. pylori* en el estómago.

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo de más de 1.000 géneros de bacterias además de un gran número de levaduras y virus. La microbiota intestinal está dominada sustancialmente por anaerobios estrictos, los principales filos bacterianos que dominan la composición de la microbiota intestinal infantil son, al igual que ocurre en las poblaciones adultas, Firmicutes y Bacteroidetes (228,248), otros filos sub-dominantes son Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (230,249,250). En nuestro estudio podemos observar el mismo patrón, en el que los filos más abundantes son Firmicutes, Bacteroides y en menor medida se encuentran los filos Actinobacteria y Proteobacteria.

En la asignación taxonómica a nivel de orden, observamos que en ambos grupos de pacientes los órdenes con mayor abundancia relativa fueron Clostridiales y Bacteroidales y en menor proporción Actinomycetales. Es interesante destacar, que el orden Enterobacteriales se encuentra en un porcentaje bajo respecto a los géneros comentados anteriormente, en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* encontramos un 2.3% y en el grupo de los pacientes negativos el porcentaje de Enterobacteriales es 0.95%. Aún así, en nuestro grupo de estudio este

porcentaje es mayor que en el estudio de Ellis *et al* (251) en el que indican que los pacientes controles presentan menos del 0.05% de Enterobacteriales.

En cuanto a los géneros que mayor abundancia relativa presentan en ambos grupos de pacientes, como se puede observar en la Figura 58, son *Peptoniphilus*, *Bacteroides*, *Anaerococcus*, *Prevotella* y *Fingoldia*. En menor abundancia, encontramos la presencia del género *Campylobacter*, en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* observamos un 3.1% del género *Campylobacter* y en los negativos para *H. pylori* un 1.5%. Sería interesante, cultivar estas muestras en medio específico para *Campylobacter* y poder ver de que especie se trata.

En cuanto al análisis de la alfa y beta diversidad en función del estado de *H. pylori* no se observan diferencias estadísticamente significativas. Esto se puede deber principalmente a que en las secuencias del ADN obtenidas de las muestras fecales no se ha observado la presencia del género *Helicobacter*. En cuanto al análisis del microbioma intestinal en función del tratamiento con IBP o del tratamiento para erradicar *Helicobacter* en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, sin embargo en el artículo de Jackson *et al* (252) describieron una menor diversidad intestinal tras la toma de IBP. La diferencia de este estudio con el nuestro es que nuestros pacientes abandonaron cualquier tratamiento con antibióticos o con IBP como mínimo un mes antes de la realización de la endoscopia. Sin embargo, decidimos estudiar de todos modos si el tratamiento previo recibido podía haber alterado la flora gástrica e intestinal.

La secuenciación masiva del ADN es el primer paso para caracterizar las comunidades microbianas del estómago y del intestino; sin embargo, este enfoque no da información sobre el estado fisiológico de los microorganismos. De hecho, no es posible distinguir entre bacterias vivas y muertas con esta técnica (253). Por lo

tanto, serían necesarios más estudios con el fin de ver cuál de estos microorganismos están muertos. El uso de la secuenciación de alto rendimiento del ARN permitiría discriminar las bacterias funcionales y las no funcionales.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La PCR cuantitativa en Tiempo Real específica de *H. pylori* con un punto de corte de <35 ciclos como criterio de positividad mostró una sensibilidad de 93.3% y especificidad de 100% comparándolo con los resultados obtenidos mediante los métodos convencionales realizados en biopsia gástrica.
2. Los pacientes positivos para *H. pylori* presentaron un menor Índice de Masa Corporal que los pacientes negativos, además de presentar con mayor frecuencia nodularidad antral y gastritis superficial activa.
3. La densidad bacteriana según la PCR a tiempo real demuestra que hay un mayor número de bacterias totales en las biopsias gástricas de los pacientes positivos para *H. pylori* que en los pacientes negativos, además de un mayor número de *H. pylori*.
4. El microbioma que coloniza la cavidad gástrica de pacientes pediátricos positivos para *H. pylori* presenta una menor alfa diversidad comparándolo con el de los pacientes pediátricos no colonizados por *H. pylori*.
5. Según el estudio de la beta diversidad, la composición de las comunidades microbianas gástricas de los pacientes positivos y negativos para *H. pylori* se diferencian significativamente, principalmente debido a un predominio del género *Helicobacter* en los pacientes positivos.

6. El análisis taxonómico de las comunidades microbianas gástricas revela que tanto en los pacientes positivos como negativos para *H. pylori*, los filotipos más abundantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria. Sin embargo, los porcentajes de abundancia relativa de los mismos varían considerablemente en estos grupos de pacientes, siendo el phylum Proteobacteria más abundante en los pacientes positivos (69.3%) que en los pacientes negativos (52.6%).

7. El análisis LEfSe en las comunidades microbianas gástricas nos indica que hay un claro predominio del género *Helicobacter* en los pacientes positivos, y que en los negativos hay una mayor diversidad representada principalmente por los género *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Acinetobacter* y *Comamonas*.

8. Al realizar el estudio taxonómico suprimiendo las secuencias del género *Helicobacter* se observan mayores similitudes en la microbiota gástrica de ambos grupos de pacientes. Sin embargo, el género *Corynebacterium* estaba más representado en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori*, mientras que los géneros *Clostridium*, *Escherichia/Shigella* y *Rothia* presentaron una mayor abundancia relativa en los niños negativos para *H. pylori*.

9. El análisis metagenómico PICRUST indica que en el grupo de pacientes positivos para *H. pylori* predominan las funciones relacionadas con los procesos celulares y con el procesamiento de la información genética. En

los pacientes negativos para este microorganismo predominan las funciones relacionadas con el proceso e la información ambiental y con el metabolismo.

10. Los phylum que dominan el microbioma intestinal en niños, al igual que en adultos son principalmente Bacteroides y Firmicutes y en menor medida Actinobacteria y Proteobacteria. La alfa y beta diversidad intestinal no muestran diferencias en función del estado de *H. pylori*.

11. La microbiota gástrica e intestinal representan dos nichos ecológicos ricos y complejos pero que están perfectamente diferenciados, principalmente según la densidad bacteriana determinada mediante la PCR a tiempo real y por otra parte en cuanto a la composición taxonómica.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Blaser MJ. An Endangered Species in the Stomach. *Sci Am.* 2005;292:38–45.
2. Bizzorero G. Ueber die schlauchförmigen drüsen des magendarmkanals und die bazillenförmigen epithelien zudem oberflächepithel der schleimhaut. *Arch F Mikr Anat.* 1893;42:82–152.
3. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek JW, Pawlik WW. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastroenterology during last century. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(4):507–30.
4. Rickes S. Walter Krienitz and one of the first descriptions of gastric bacteria. *Z Gastroenterol.* 2011;49(11):1491–2.
5. Doenges J. Spirochetes in gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Med Biol.* 1938;38:536–8.
6. Palmer E. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology.* 1954;27:218–20.
7. Buzas G. History of the discovery of *Helicobacter pylori*. *Orvostört Kozl.* 2004;49:45–56.
8. Pajares JM, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006;98(10):770–85.
9. Steer H. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol.* 1975;28(8):639–46.
10. Skirrow M. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *Br Med J.* 1977;2:9–11.
11. Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54:23–41.
12. Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol.* 1987;82(3):192–9.
13. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, SLY L, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;39(4):397–405.
14. López-Brea M, Jiménez M, Blanco M, Pajares J. *Campylobacter* en patología gástrica. *Microbiología.* 1985;1:97–9.
15. Borody T, Cole P, Noonan S, Morgan A, Lenne J, L H, et al. Recurrence of duodenal ulcer and *Campylobacter pylori* infection after eradication. *Med J Aust.* 1989;151:431–5.
16. Yamada T, JG S, Ahnen D, Al E. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA.* 1994;272(1):65–9.
17. IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans Monographs Eval

- Carcinog Risks to Humans. 1994;61:1-241.
18. Sisto F, Brenciaglia MI, Scaltrito MM, Dubini F. *Helicobacter pylori*: ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;15(4):277-82.
 19. Kusters J, Gerrits M, Van Strijp J, Vandenbroucke-Grauls C. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*. 1997;65(9):3672-9.
 20. Datta De D, Roychoudhury S. To be or not to be: The host genetic factor and beyond in *Helicobacter pylori* mediated gastro-duodenal diseases. *World J Gastroenterol*. 2015;21(10):2883-95.
 21. Rivas F, Hernandez F. *Helicobacter pylori* : Factores de virulencia , patología y diag-. *Rev Biomed*. 2000;11(3):187-205.
 22. McNulty R, Ulmschneider JP, Luecke H, Ulmschneider MB. Mechanisms of molecular transport through the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Nat Commun*. 2013;4:2900.
 23. Visek WJ. Some aspects of ammonia toxicity in animal cells. *J Dairy Sci*. 1968;51(2):286-95.
 24. Mobley HLT, Mendz GL HS. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. Washington (DC); 2001.
 25. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *H pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(35):5599-605.
 26. Posselt G, Backert S, Wessler S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal*. 2013;11:77.
 27. Smolka AJ, Backert S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. *J Gastroenterol*. 2012;47(6):609-18.
 28. Kalali B, Mejías-Luque R, Javaheri A, Gerhard M. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:426309.
 29. Wirth HP, Yang M, Peek RM, Höök-Nikanne J, Fried M, Blaser MJ. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same host. *J Lab Clin Med*. 1999;133(5):488-500.
 30. Wirth H-P, Yang M, Sanabria-Valentín E, Berg DE, Dubois A, Blaser MJ. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *FASEB J*. 2006;20(9):1534-6.
 31. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Volland P, Borén T, Karttunen R, et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(2):151-6.
 32. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergström J, Borén T, Danielsson D, et al. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem*.

- 2005;280(15):15390-7.
33. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med.* 2008;47(12):1077-83.
 34. Nyström J, Svennerholm A-M. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine.* 2007;25(14):2591-8.
 35. Huang C-H, Chiou S-H. Clinical proteomics identifies potential biomarkers in *Helicobacter pylori* for gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(6):1529-36.
 36. Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(3):261-70.
 37. Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2006;61(4):847-60.
 38. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(1):32-40.
 39. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(6):385-99.
 40. García Campos J. Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*. ¿Qué podemos aprender de los niños? In: Ergon, editor. *La infección por Helicobacter pylori en el niño.* Madrid; 2007. p. 35-48.
 41. Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, et al. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog.* 1999;26(1):45-52.
 42. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 2000;19(23):6361-70.
 43. Foo JH, Culvenor JG, Ferrero RL, Kwok T, Lithgow T, Gabriel K. Both the p33 and p55 subunits of the *Helicobacter pylori* VacA toxin are targeted to mammalian mitochondria. *J Mol Biol.* 2010;401(5):792-8.
 44. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:92.
 45. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrone D, Cover TL, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(17):10212-7.
 46. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2597-603.
 47. Zhang B-B, Li Y, Liu X-Q, Wang P-J, Yang B, Bian D-L. Association between

- vacA genotypes and the risk of duodenal ulcer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41(11):7241–54.
48. Cavalcante MQ de F, Silva CIS, Braga-Neto MB, Fialho ABC, Nunes Fialho A, Barbosa AMC, et al. *Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases.* *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(4):561–3.
 49. Iwanczak B, Laszewicz W, Iwanczak F, Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek M, Dzierzanowska D, et al. Genotypic and clinical differences of seropositive *Helicobacter pylori* children and adults in the Polish population. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(6):801–7.
 50. da Costa DM. What exists beyond cag A and vac A? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World J Gastroenterol.* 2015;21(37):10563.
 51. Zanotti G, Cendron L. Structural and functional aspects of the *Helicobacter pylori* secretome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(6):1402–23.
 52. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14648–53.
 53. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2013;19(45):8192–202.
 54. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9300–5.
 55. Chmiela M, Mischczyk E, Rudnicka K. Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace. *World J Gastroenterol.* 2014;20(29):9882–97.
 56. Moran AP. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10 Suppl 1:39–50.
 57. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20(36):12781–808.
 58. Appelmelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, et al. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun.* 1996;64(6):2031–40.
 59. Kuzuhara T, Suganuma M, Kurusu M, Fujiki H. *Helicobacter pylori*-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(5):287–96.
 60. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection Worldwide: A Systematic Review of Studies with National Coverage. *Dig Dis Sci.* 2014;(September 2013).
 61. Boixeda D, Martín de Argila C. Epidemiología y factores de riesgo.

- Helicobacter pylori y enfermedades relacionadas. 2004. p. 251.
62. Logan RP, Walker MM. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. *BMJ*. 2001;323(7318):920–2.
 63. Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. Trends in Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(8):1874–7.
 64. Kivi M, Tindberg Y. Helicobacter pylori occurrence and transmission: a family affair? *Scand J Infect Dis*. 2006;38(6-7):407–17.
 65. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, et al. Age at acquisition of Helicobacter pylori infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*. 2002;359(9310):931–5.
 66. Imrie C, Rowland M, Bourke B, Drumm B. Is Helicobacter pylori infection in childhood a risk factor for gastric cancer? *Pediatrics*. 2001;107(2):373–80.
 67. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of Helicobacter pylori infection. *J Adv Res*. 2013;6(4):539–47.
 68. El-Sharouny E, El-Shazli H, Olama Z. Detection of Helicobacter pylori DNA in Some Egyptian Water Systems and Its Incidence of Transmission to Individuals. *Iran J Public Health*. 2015;44(2):203–10.
 69. Czinn SJ. Helicobacter pylori infection: Detection, investigation, and management. *J Pediatr*. 2005;146(3):S21–6.
 70. Sherman PM. Appropriate strategies for testing and treating Helicobacter pylori in children: when and how? *Am J Med*. 2004;117:30S – 35S.
 71. Brown LM. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):283–97.
 72. Hernandez C, Serrano C, Einisman H, Villagran A, Pena A, Duarte I, et al. Peptic ulcer disease in Helicobacter pylori-infected children: clinical findings and mucosal immune response. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(6):773–8.
 73. Roma E, Kafritsa Y, Panayiotou J, Liakou R, Constantopoulos A. Is peptic ulcer a common cause of upper gastrointestinal symptoms? *Eur J Pediatr*. 2001;160(8):497–500.
 74. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404(6776):398–402.
 75. Escalona MG, Pérez AMM, Cobas JB, Gámez AMM. Gastritis crónica antral por Helicobacter pylori. *Correo Científico Médico de Holguín*. 2005;9(2).
 76. Suerbaum S, Josenhans C. Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):441–52.
 77. Di Lorenzo C, Colletti RB, Lehmann HP, Boyle JT, Gerson WT, Hyams JS, et al. Chronic Abdominal Pain In Children: a Technical Report of the American Academy of Pediatrics and the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(3):249–61.

78. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;323(8390):1311–5.
79. IARC. *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans. 2012;100B:385–435.
80. Trajkov D, Stardelova K, Dimitrova M, Mishevski J, Serafimoski V. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Prilozi*. 2007;28(2):39–46.
81. Song Z-Q, Zhou L-Y. *Helicobacter Pylori* and Gastric Cancer: Clinical Aspects. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(22):3101–5.
82. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917.
83. Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology*. 2002;122(1):119–33.
84. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, et al. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology*. 2000;118(1):36–47.
85. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(3):1003–8.
86. Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg*. 2006;95(4):218–24.
87. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):280–322.
88. Homan M, Hojsak I, Kolaček S. *Helicobacter pylori* in pediatrics. *Helicobacter*. 2012;17 Suppl 1:43–8.
89. Veres G, Pehlivanoglu E. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter*. 2007;12 Suppl 1:38–44.
90. Kuo C-H, Chen Y-H, Goh K-L, Chang L-L. *Helicobacter pylori* and Systemic Disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:358494.
91. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J*. 1994;71(5):437–9.
92. Vcev A, Nakić D, Mrden A, Mirat J, Balen S, Ruzić A, et al. *Helicobacter pylori* infection and coronary artery disease. *Coll Antropol*. 2007;31(3):757–60.
93. Ozdogru I, Kalay N, Dogan A, Inanc MT, Kaya MG, Topsakal R, et al. The relationship between *Helicobacter pylori* IgG titre and coronary atherosclerosis. *Acta Cardiol*. 2007;62(5):501–5.
94. Jin S-W, Her S-H, Lee J-M, Yoon H-J, Moon S-J, Kim P-J, et al. The association between current *Helicobacter pylori* infection and coronary artery disease.

- Korean J Intern Med. 2007;22(3):152–6.
95. Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO. Helicobacter pylori seropositivity in patients with acute coronary syndromes. Dig Dis Sci. 2009;54(6):1253–6.
 96. Khodaii Z, Vakili H, Ghaderian SMH, Najar RA, Panah AST. Association of Helicobacter pylori infection with acute myocardial infarction. Coron Artery Dis. 2011;22(1):6–11.
 97. Hervé F, Cailleux N, Benhamou Y, Ducrotté P, Lemeland J-F, Denis P, et al. [Helicobacter pylori prevalence in Raynaud's disease]. Rev Med Interne. 2006;27(10):736–41.
 98. Csiki Z, Gál I, Sebesi J, Szegedi G. [Raynaud syndrome and eradication of Helicobacter pylori]. Orv Hetil. 2000;141(52):2827–9.
 99. Urrego Díaz JA, Otero Regino W, Gómez Zuleta M. Helicobacter pylori and hematologic diseases. Rev Colomb Gastroenterol. 28(4):329–37.
 100. Kikuchi T, Kobayashi T, Yamashita T, Ohashi K, Sakamaki H, Akiyama H. Eight-year follow-up of patients with immune thrombocytopenic purpura related to *H. pylori* infection. Platelets. 2011;22(1):61–4.
 101. Abdollahi A, Shoar S, Ghasemi S, Zohreh O-Y. Is Helicobacter pylori infection a risk factor for idiopathic thrombocytopenic purpura in children? Ann Afr Med. 2015;14(4):177–81.
 102. Smyk DS, Koutsoumpas AL, Mytilinaiou MG, Rigopoulou EI, Sakkas LI, Bogdanos DP. Helicobacter pylori and autoimmune disease: cause or bystander. World J Gastroenterol. 2014;20(3):613–29.
 103. Tan H-J, Goh K-L. Extragastrintestinal manifestations of Helicobacter pylori infection: facts or myth? A critical review. J Dig Dis. 2012;13(7):342–9.
 104. Cardenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and Helicobacter pylori infection in the United States. Am J Epidemiol. 2006;163(2):127–34.
 105. Muhsen K, Cohen D. Helicobacter pylori infection and anemia. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(2):398.
 106. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C a, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 2012;61(5):646–64.
 107. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. Gut. 2011;60(10):1309–16.
 108. Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, Ferri R, Carnemolla A, Pennisi G. Helicobacter pylori and Alzheimer's disease: a possible link. Eur J Intern Med. 2004;15(6):381–6.
 109. Kountouras J, Boziki M, Zavos C, Gavalas E, Giartza-Taxidou E, Venizelos I, et al. A potential impact of chronic Helicobacter pylori infection on Alzheimer's disease pathobiology and course. Neurobiol Aging. 2012;33(7):e3–4.
 110. Nielsen HH, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Ritz B. Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. Eur J Neurol.

- 2012;19(6):864–9.
111. National Parkinson Foundation [Internet]. Available from: <http://www.parkinson.org/>
 112. Lee WY, Yoon WT, Shin HY, Jeon SH, Rhee P-L. Helicobacter pylori infection and motor fluctuations in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008;23(12):1696–700.
 113. Weller C, Charlett A, Oxlade NL, Dobbs SM, Dobbs RJ, Peterson DW, et al. Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 3: predicted probability and gradients of severity of idiopathic parkinsonism based on *H. pylori* antibody profile. *Helicobacter*. 2005;10(4):288–97.
 114. Magen E, Schlesinger M, Hadari I. Chronic urticaria can be triggered by eradication of Helicobacter pylori. *Helicobacter*. 2013;18(1):83–7.
 115. Fukuda S, Shimoyama T, Umegaki N, Mikami T, Nakano H, Munakata A. Effect of Helicobacter pylori eradication in the treatment of Japanese patients with chronic idiopathic urticaria. *J Gastroenterol*. 2004;39(9):827–30.
 116. Di Campli C, Gasbarrini A, Nucera E, Franceschi F, Ojetti V, Sanz Torre E, et al. Beneficial effects of Helicobacter pylori eradication on idiopathic chronic urticaria. *Dig Dis Sci*. 1998;43(6):1226–9.
 117. Chiu Y-C, Tai W-C, Chuah S-K, Hsu P-I, Wu D-C, Wu K-L, et al. The Clinical Correlations of Helicobacter pylori Virulence Factors and Chronic Spontaneous Urticaria. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:436727.
 118. Hellmig S, Troch K, Ott SJ, Schwarz T, Fölsch UR. Role of Helicobacter pylori Infection in the treatment and outcome of chronic urticaria. *Helicobacter*. 2008;13(5):341–5.
 119. Curth H-M, Dinter J, Nigemeier K, Kütting F, Hunzelmann N, Steffen H-M. Effects of Helicobacter pylori Eradication in Chronic Spontaneous Urticaria: Results from a Retrospective Cohort Study. *Am J Clin Dermatol*. 2015;16(6):553–8.
 120. Gravina A, Federico A, Ruocco E, Lo Schiavo A, Masarone M, Tuccillo C, et al. Helicobacter pylori infection but not small intestinal bacterial overgrowth may play a pathogenic role in rosacea. *United Eur Gastroenterol J*. 2015;3(1):17–24.
 121. El-Khalawany M, Mahmoud A, Mosbeh A-S, A B D Alsalam F, Ghonaim N, Abou-Bakr A. Role of Helicobacter pylori in common rosacea subtypes: a genotypic comparative study of Egyptian patients. *J Dermatol*. 2012;39(12):989–95.
 122. Sharma VK, Lynn A, Kaminski M, Vasudeva R, Howden CW. A study of the prevalence of Helicobacter pylori infection and other markers of upper gastrointestinal tract disease in patients with rosacea. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(2):220–2.
 123. Jones MP, Knable AL, White MJ, Durning SJ. Helicobacter pylori in rosacea: lack of an association. *Arch Dermatol*. 1998;134(4):511.

124. Mera RM, Bravo LE, Goodman KJ, Yopez MC, Correa P. Long-term effects of clearing *Helicobacter pylori* on growth in school-age children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(3):263–6.
125. Richter T, List S, Müller DM, Deutscher J, Uhlig HH, Krumbiegel P, et al. Five- to seven-year-old children with *Helicobacter pylori* infection are smaller than *Helicobacter*-negative children: a cross-sectional population-based study of 3,315 children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33(4):472–5.
126. Arslan E, Atılgan H, Yavaşoğlu İ. The prevalence of *Helicobacter pylori* in obese subjects. *Eur J Intern Med*. 2009;20(7):695–7.
127. Dzierzanowska-Fangrat K, Lehours P, Mégraud F, Dzierzanowska D. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2006;11 Suppl 1:6–13.
128. Lan H-C, Chen T-S, Li AF-Y, Chang F-Y, Lin H-C. Additional corpus biopsy enhances the detection of *Helicobacter pylori* infection in a background of gastritis with atrophy. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:182.
129. Lash JG, Genta RM. Adherence to the Sydney System guidelines increases the detection of *Helicobacter* gastritis and intestinal metaplasia in 400738 sets of gastric biopsies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(4):424–31.
130. Chey WD, Wong BCY. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(8):1808–25.
131. Naumov I, Fenjvesi A. [Correlation between rapid urease test and pathohistological gastrobiopsy finding with positive immunological test in detecting *Helicobacter pylori* infection]. *Med Pregl*. 64(7-8):413–7.
132. Gold BD, Colletti RB, Abbott M, Czinn SJ, Elitsur Y, Hassall E, et al. *Helicobacter pylori* infection in children: recommendations for diagnosis and treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31(5):490–7.
133. Pellicano R, Smedile A, Ponzetto A, Berrutti M, Astegiano M, Saracco G, et al. How accurate is the culture of *Helicobacter pylori* in a clinical setting? An appraisal. *Panminerva Med*. 2005;47(3):191–4.
134. Simala-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS*. 112(11-12):886–97.
135. Perri F, Quitadamo M, Ricciardi R, Piepoli A, Cotugno R, Gentile A, et al. Comparison of a monoclonal antigen stool test (Hp StAR) with the 13C-urea breath test in monitoring *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol*. 2005;11(37):5878–81.
136. 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*. 2003;56(10):769–71.
137. Falsafi T, Valizadeh N, Sepehr S, Najafi M. Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents from Tehran, Iran. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(9):1094–7.

138. Raguza D, Granato CFH, Kawakami E. Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. *Dig Dis Sci.* 2005;50(3):453–7.
139. Shaikh S, Khaled MA, Islam A, Kurpad A V, Mahalanabis D. Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using ¹³C-urea breath test as a standard. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40(5):552–4.
140. Pourakbari B, Ghazi M, Mahmoudi S, Mamishi S, Azhdarkosh H, Najafi M, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):795–8.
141. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut.* 2007;56:772–81.
142. Oderda G, Shcherbakov P, Bontems P, Urruzuno P, Romano C, Gottrand F, et al. Results from the pediatric European register for treatment of *Helicobacter pylori* (PERTH). *Helicobacter.* 2007;12(2):150–6.
143. Malfertheiner P, Mégraud F, O’Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M, et al. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPSG). *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9(1):1–2.
144. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut.* 2010;59(8):1143–53.
145. Gisbert JP, Calvet X, O’Connor A, Mégraud F, O’Morain CA. Sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a critical review. *J Clin Gastroenterol.* 44(5):313–25.
146. Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, et al. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146(8):556–63.
147. Gisbert JP, Calvet X. Review article: non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(6):604–17.
148. Essa AS, Kramer JR, Graham DY, Treiber G. Meta-analysis: four-drug, three-antibiotic, non-bismuth-containing “concomitant therapy” versus triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter.* 2009;14(2):109–18.
149. Gisbert JP. Enfermedades relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol y Hepatol.* 2013;36(2):39–50.
150. Kanizaj TF, Kunac N. *Helicobacter pylori*: future perspectives in therapy reflecting three decades of experience. *World J Gastroenterol.* 2014;20(3):699–705.
151. Wu T-S, Hu H-M, Kuo F-C, Kuo C-H. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Kaohsiung J Med Sci.* 2014;30(4):167–72.
152. Alarcón T, Martínez MJ, Madruga D, Domingo D, López-Brea M. One week vs

- two weeks triple therapy in paediatric patients: Impact of treatment duration and metronidazole resistance. *Rev española Quimioter.* 2000;13:55.
153. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004;53(9):1374–84.
 154. Martínez-Gómez M-J, Perdomo Giraldi M. Infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Protoc diagnóstico-terapéuticos Gastroenterol Hepatol y Nutr Pediátrica SEGHNPAEP.* 2010;93–8.
 155. Urruzuno Tellería P. Manejo de la infección por *Helicobacter pylori* en el niño. *An Pediatría Contin.* 2012;10(4):192–200.
 156. McColl KE, El-Omar E, Gillen D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. *Br Med Bull.* 1998 Jan;54(1):121–38.
 157. Lind T, Mégraud F, Unge P, Bayerdörffer E, O'morain C, Spiller R, et al. The MACH2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology.* 1999;116(2):248–53.
 158. Laine L, Fennerty MB, Osato M, Sugg J, Suchower L, Probst P, et al. Esomeprazole-based *Helicobacter pylori* eradication therapy and the effect of antibiotic resistance: results of three US multicenter, double-blind trials. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(12):3393–8.
 159. Pajares JM, Gisbert JP. [Is a 1-week treatment enough and safe for the healing of peptic ulcer?]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2000;92(1):1–4.
 160. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol.* 2007;51(10):939–44.
 161. Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(2):282–6.
 162. Jenks PJ, Ferrero RL, Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(6):753–8.
 163. Kwon DH, Hulten K, Kato M, Kim JJ, Lee M, El-Zaatari FA, et al. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 pairs of metronidazole-sensitive and -resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2609–15.
 164. Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Mégraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol.* 2003;154(2):137–44.
 165. Matteo MJ, Pérez CV, Domingo MR, Olmos M, Sanchez C, Catalano M. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(2):152–8.
 166. Kim SY, Joo YM, Lee HS, Chung I-S, Yoo Y-J, Merrell DS, et al. Genetic analysis

- of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2009;62(1):43–50.
167. Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, Capobianco J. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(7):1496–500.
 168. Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*. 2001;413(6858):814–21.
 169. Versalovic J. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40(2):283–6.
 170. Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sutcliffe J. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(8):2118–25.
 171. Garrido L, Toledo H. Novel genotypes in *Helicobacter pylori* involving domain V of the 23S rRNA gene. *Helicobacter*. 2007;12(5):505–9.
 172. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5(6):321–31.
 173. Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;12(1):19–26.
 174. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Document M100-S25. Wayne, PA; 2015.
 175. Boyanova L, Ilieva J, Gergova G, Mitov I. Levofloxacin susceptibility testing against *Helicobacter pylori*: evaluation of a modified disk diffusion method compared to E test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;
 176. Ogata SK, Gales AC, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Braz J Microbiol*. 2014;45(4):1439–48.
 177. King A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48 Suppl 1:77–80.
 178. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST: European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
 179. Gazi S, Karameris A, Christoforou M, Agnantis N, Rokkas T, Stefanou D. Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol*.

- 2013;26(3):226–32.
180. Tseng H, Hullar M, Li F. A microbial profiling method for the human microbiota using high-throughput sequencing. *Metagenomics*. 2013;(1):1–15.
 181. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. 1993;7(1):113–23.
 182. Rodicio M del R, Mendoza M del C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(04):238–45.
 183. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova O V, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*. 2010;2010:baq013.
 184. Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 1):60–5.
 185. Suárez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp*. 2013;28:38–41.
 186. Benitez AJ, Hoffmann C, Muir AB, Dods KK, Spergel JM, Bushman FD, et al. Inflammation-associated microbiota in pediatric eosinophilic esophagitis. *Microbiome*. 2015;3:23.
 187. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4250–5.
 188. Harris JK, Fang R, Wagner BD, Choe HN, Kelly CJ, Schroeder S, et al. Esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128346.
 189. Yang L, Chaudhary N, Baghdadi J, Pei Z. Microbiome in reflux disorders and esophageal adenocarcinoma. *Cancer J*. 20(3):207–10.
 190. Llorca L, Ruiz V, Perez GP. *Helicobacter pylori*: The balance between a role as colonizer and pathogen. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(6):1017–29.
 191. Gut Microbiota World Watch.
 192. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res*. 2009;16(1):1–12.
 193. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(33):4145–51.
 194. Moore WE, Holdeman L V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. 1974;27(5):961–79.
 195. Nagalingam NA, Lynch S V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(5):968–84.
 196. Ouwehand A, Vesterlund S. Health aspects of probiotics. *IDrugs*. 2003;6(6):573–80.

197. Ott SJ, Musfeldt M, Timmis KN, Hampe J, Wenderoth DF, Schreiber S. In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(4):237–45.
198. Hooper L V, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:283–307.
199. Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics--the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(5):492–8.
200. Vaughan EE, Schut F, Heilig HG, Zoetendal EG, de Vos WM, Akkermans AD. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2000;1(1):1–12.
201. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004;134(2):465–72.
202. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol.* 2010;11(5):207.
203. Whittaker R. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon.* 1972;21:213–51.
204. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(4):557–78.
205. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60.
206. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27–30.
207. Marshall BJ, Warren JR, Francis GJ, Langton SR, Goodwin CS, Blincow ED. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1987;82(3):200–10.
208. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *The American journal of surgical pathology.* 1996. p. 1161–81.
209. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. Correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat Publ Gr.* 2010;7(5):335–6.
210. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2460–1.
211. Lee SC, Tang MS, Lim Y a L, Choy SH, Kurtz ZD, Cox LM, et al. Helminth Colonization Is Associated with Increased Diversity of the Gut Microbiota. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5).
212. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8228–35.

213. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5261–7.
214. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):814–21.
215. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiol Clínica.* 2004;1–25.
216. Uotani T, Graham DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl Med.* 2015;3(1):9.
217. Kalach N, Gosset P, Dehecq E, Decoster A, Spyckerelle C, Papadopolos S, et al. Usefulness of Gastric Biopsy-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;61(3):307–12.
218. Saez J, Belda S, Santibáñez M, Rodríguez JC, Sola-Vera J, Galiana A, et al. Real-time PCR for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with upper gastrointestinal bleeding: comparison with other classical diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3233–7.
219. Agudo S, Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, López-Brea M. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance in gastric biopsies of pediatric patients by using a commercially available real-time polymerase chain reaction after NucliSens semiautomated DNA extraction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(3):213–9.
220. Mera RM, Correa P, Fontham EE, Reina JC, Pradilla A, Alzate A, et al. Effects of a new *Helicobacter pylori* infection on height and weight in Colombian children. *Ann Epidemiol.* 2006;16(5):347–51.
221. Yap TW-C, Leow AH-R, Azmi AN, Francois F, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Changes in Metabolic Hormones in Malaysian Young Adults following *Helicobacter pylori* Eradication. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135771.
222. Goodman KJ, Correa P, Mera R, Yepez MC, Cerón C, Campo C, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on growth velocity of school-age Andean children. *Epidemiology.* 2011;22(1):118–26.
223. Urruzuno P. Clínica. La infección por *Helicobacter pylori* en el niño. *Ergon.* Madrid; 2007. p. 61–8.
224. Łazowska-Przeorek I, Kotowska M, Banasiuk M, Karolewska-Bochenek K, Banaszkiwicz A, Gawrońska A, et al. Value of Antral Nodularity for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Med Sci Monit.* 2015;21:1827–30.
225. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J.* 2015;3(3):255–60.
226. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras

- M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J*. 2011;5(4):574–9.
227. Faith DP, Baker AM. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evol Bioinform Online*. 2006;2:121–8.
228. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258–70.
229. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom E a, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):732–7.
230. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*. 2008;3(7):e2836.
231. Delgado Palacio S. Microbiota Intestinal Humana: Bacterias probióticas. *Univ Oviedo*. 2005;1–162.
232. Fox J, Sheh A. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes*. 2013;4(6):1–27.
233. Monstein HJ, Tiveljung A, Kraft CH, Borch K, Jonasson J. Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. *J Med Microbiol*. 2000;49(9):817–22.
234. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol*. 2013;65(3):763–72.
235. Yang I, Nell S, Suerbaum S. Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(5):736–61.
236. Khosravi Y, Dieye Y, Poh B. Culturable Bacterial Microbiota of the Stomach of *Helicobacter pylori* Positive and Negative Gastric Disease Patients. *Sci World*. 2014;2014.
237. Chong CW, Ahmad AF, Lim YAL, Teh CSJ, Yap IKS, Lee SC, et al. Effect of ethnicity and socioeconomic variation to the gut microbiota composition among pre-adolescent in Malaysia. *Sci Rep*. 2015;5:13338.
238. Hester CM, Jala VR, Langille MG, Umar S, Greiner KA, Haribabu B. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World J Gastroenterol*. 2015;21(9):2759–69.
239. Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, Büyükleblebici O, Steiner JM, Jergens AE, et al. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2014;(June):37–41.
240. Suchodolski JS, Foster ML, Sohail MU, Leutenegger C, Queen E V., Steiner JM, et al. The Fecal Microbiome in Cats with Diarrhea. *PLoS One*.

- 2015;10(5):e0127378.
241. Horton JM, Gao Z, Sullivan DM, Shopsin B, Perez-Perez GI, Blaser MJ. The Cutaneous Microbiome in Outpatients Presenting With Acute Skin Abscesses. *J Infect Dis.* 2015;211(12):1895–904.
242. Lang JM, Eisen JA, Zivkovic AM. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ.* 2014;2:e659.
243. Bartolomé Resano R, Martínez Martínez B, Martínez Echeverría A, Martínez Peñuela J, Istúriz Abadía A, Olcoz Flamarique F, et al. Gastritis caused by *Helicobacter heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*). Report of 3 cases. *Gastroenterol Hepatol.* 2001;24(4):202–4.
244. Yakoob J, Abbas Z, Khan R, Naz S, Ahmad Z, Islam M, et al. Prevalence of non *Helicobacter pylori* species in patients presenting with dyspepsia. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:3.
245. Mention K, Michaud L, Guimber D, Martin De Lasalle E, Vincent P, Turck D, et al. Characteristics and prevalence of *Helicobacter heilmannii* infection in children undergoing upper gastrointestinal endoscopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29(5):533–9.
246. Hunt RH, Camilleri M, Crowe SE, El-Omar EM, Fox JG, Kuipers EJ, et al. The stomach in health and disease. *Gut* [Internet]. 2015 Oct [cited 2015 Dec 31];64(10):1650–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342014>
247. Beasley DE, Koltz AM, Lambert JE, Fierer N, Dunn RR. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134116.
248. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas).* 2014;13(6):17–22.
249. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14691–6.
250. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5(7):e177.
251. Ellis CL, Ma Z-M, Mann SK, Li C-S, Wu J, Knight TH, et al. Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57(5):363–70.
252. Jackson MA, Goodrich JK, Maxan M-E, Freedberg DE, Abrams JA, Poole AC, et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut.* 2015;0:1–8.
253. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27(1):39–45.