

Artículo original

La placa dental como reservorio de *Helicobacter pylori*

Marianella Perrone^{a,*}, Maria Correnti^{a,b}, Alejandra Berroteran^c, Tatiana López^c, Mayra Avila^b,
Maria Eugenia Cavazza^d, Vicente Lecuna^e

^aInstituto de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología

^bInstituto de Oncología y Hematología, Ministerio de Salud

^cMaestría de Medicina Estomatológica, Facultad de Odontología

^dInstituto de Biomedicina, Ministerio de Salud

^eHospital Universitario de Caracas

Universidad Central de Venezuela

Caracas - Venezuela

Recibido 25 de julio de 2007; aceptado 10 de septiembre de 2007

Resumen: La placa dental ha sido propuesta como un reservorio para *Helicobacter pylori*, sugiriéndose que el microambiente oral pueda ser un nicho permanente para la bacteria. El objetivo de este estudio fue determinar el papel que juega la placa dental como reservorio de esta especie, evaluando la presencia de ADN de *H. pylori* en la placa dental y biopsias gástricas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Fueron evaluados 71 pacientes sintomáticos gastrointestinales referidos para examen endoscópico, provenientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas, Venezuela y 40 sujetos asintomáticos. Las muestras de placa dental fueron analizadas por PCR, basada en la secuencia del gen *ure c*. Se tomaron biopsias gástricas para análisis histopatológico y PCR. *H. pylori* fue detectado en las biopsias gástricas de 48(68%) de los 71 pacientes, todos con gastritis crónica y en placa dental de 13(18%) de los 71 sujetos. En 8 (17%) de estos 48 pacientes, *H. pylori* fue también detectado en placa dental. De estos pacientes 4 presentaban adicionalmente displasia y 4 metaplasia. Tres pacientes del grupo control fueron positivos por PCR para *H. pylori* en placa dental. La placa dental puede ser un reservorio para la bacteria, y su presencia podría representar un factor de riesgo para la reinfección gastrointestinal, posterior al tratamiento de erradicación de la bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, placa dental, cavidad bucal

Dental plaques as *Helicobacter pylori* reservoirs

Abstract: Dental plaques have been proposed as *Helicobacter pylori* reservoirs, suggesting that the oral microenvironment can be a permanent niche for the bacterium. The objective of this study was to determine the role played by the dental plaque as reservoir for this species, evaluating the presence of *H. pylori* DNA in dental plaques and gastric biopsies through the polymerase chain reaction (PCR). The evaluation included seventy-one gastro-intestinal symptomatic patients referred for endoscopic examination by the Gastroenterology Service of the Caracas University Hospital, as well as 40 asymptomatic subjects. The dental plaque samples were analyzed by PCR based on the *ure c* gene sequence. Gastric biopsies were taken for histopathological analysis and PCR. *H. pylori* was detected in 48 (68%) gastric biopsies from the 71 patients, all with chronic gastritis, and in the dental plaque of 13 (18%) of the same 71 patients. In 8 (17%) of these 48 patients *H. pylori* was also detected in dental plaque. Four of these patients also presented displasia and metaplasia. Three patients from the control group were PCR positive for *H. pylori* in dental plaque. Dental plaques can be a reservoir for these bacteria and their presence could represent a risk factor for gastrointestinal re-infection after treatment for eradicating this bacterium.

Keywords: *Helicobacter pylori*, dental plaque, bucal cavity

* Correspondencia:

E-mail: mperrone@cantv.net

Introducción

Actualmente está bien establecido que *H. pylori* es un importante patógeno humano, que causa gastritis crónica y está asociado con el desarrollo de úlcera péptica, y gastritis atrófica. Este microorganismo es considerado como el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico y linfomas tipo MALT [1-5].

La infección usualmente se adquiere en la niñez, aunque la expresión de la enfermedad ocurre en muchas ocasiones en la etapa adulta. La presencia de este organismo causa inflamación gástrica en todos los individuos, que con el tiempo permite el daño a la mucosa gástrica [6]. La infección durante la niñez es usualmente transitoria y puede ocurrir una remisión espontánea de la misma [7].

La enfermedad sólo ocurre en el 15% de las personas infectadas, siendo influenciada su aparición, por la virulencia de la cepa bacteriana infectante, la susceptibilidad genética del hospedero y la presencia de cofactores ambientales [8,9]. La bacteria tiene una gran variabilidad genética, evidenciada por estudios de genotipos y secuenciación de ADN [10,11]. Recientemente se han descrito genes específicos que están asociados con la virulencia de las especies bacterianas [12,13].

La prevalencia de la infección varía notablemente en todo el mundo, con una tasa del 19 a 57% en los países desarrollados y cerca del 90% en los países en vías de desarrollo [14-17].

El modo de transmisión de *H. pylori* es ampliamente discutido. Aunque algunas evidencias indican que ésta ocurre predominantemente por contacto de persona a persona, otros autores proponen la vía fecal oral. De igual forma ha sido reportado que una vía importante de adquisición de la infección ocurre a través de las aguas de consumo [18].

Actualmente las evidencias a favor y en contra de la transmisión vía oral-oral del microorganismo son muy debatidas. Desde que *H. pylori* fue exitosamente aislado mediante cultivo de la placa dental de algunos pacientes [19], la cavidad bucal comenzó a recibir especial interés como un posible reservorio del microorganismo [20]. Sin embargo, la tasa de recuperación del microorganismo en la cavidad bucal es muy controversial; mientras que *H. pylori* ha podido ser aislado de la cavidad bucal en algunos casos [19,21], otros esfuerzos para cultivar el organismo han fallado [22]. Adicionalmente se ha señalado que al ser *H. pylori* parte de una biopelícula como lo es la placa dental, esto hace que el organismo permanezca inaccesible a los antibióticos que son usados para erradicar la infección a nivel estomacal [23,24].

Se han desarrollado varios tipos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con la finalidad de detectar el organismo de la cavidad bucal, muchos de ellos basados en la secuencia del gen de ureasa y de los genes ribosomales de ARN, reportando en algunos casos una alta prevalencia [14,25-32] y en otros no se ha detectado o se ha hecho en una proporción muy baja [33-35].

El objetivo de este estudio fue determinar el papel que juega la placa dental como reservorio de esta especie,

evaluando la ocurrencia de ADN de *H. pylori* en la placa dental y biopsias gástricas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Materiales y Métodos

Selección de los pacientes

Se evaluaron 71 pacientes provenientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas, Venezuela, referidos para examen endoscópico entre julio 1999-julio 2001, por presentar enfermedad de las vías digestivas superiores. Como grupo control se seleccionaron 40 sujetos sin sintomatología gastrointestinal que estaban recibiendo tratamiento odontológico en la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. Se les presentó el consentimiento informado a cada uno de ellos y el protocolo de experimentación fue previamente aprobado por el comité de ética del FONACIT. A cada sujeto se le realizó una detallada historia clínica y se le pidió firmar la carta de consentimiento para participar en el protocolo. Los criterios de exclusión del presente trabajo fueron: tratamiento con antibióticos y compuestos que contuviesen bismuto u omeprazol, durante dos semanas previas al examen.

Recolección de la muestra

Se tomaron muestras de placa dental de ambos grupos de pacientes, mediante raspado de las superficies supra y subgingival con cureta de Gracey. Igualmente se obtuvieron de cada uno de los pacientes con sintomatología gastrointestinal, dos especímenes de biopsia antral, uno para diagnóstico histopatológico, y el otro para PCR.

Detección de ADN de H. pylori de placa dental

Las muestras fueron agitadas. La suspensión fue lavada con agua estéril y centrifugada a 12.000X g por 3 min. El sedimento resultante fue resuspendido en 500 µl de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25mM EDTA, 0,5% dodecilsulfato de sodio), y 10 µl de proteínaasa K (10mg/ml) fue añadido. La incubación se realizó a 50°C por 20 h; esto fue seguido por la extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol. El sedimento resultante fue disuelto en 100 µl de buffer TE (10 mM), Tris-HCl [pH 7.4], 0.1 mM EDTA [pH 8.0] por 20 h a 37° C. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Los siguientes oligonucleótidos fueron usados como iniciadores: HPU 1 (5'- GCC-AAT-GGT-AAA-TTA-GTT-3'). El producto esperado después de la amplificación con estos primers era de 411 pares de bases. Una sonda interna marcada con digoxigenina HPU II (5'- ATT-GAC-ATT-GGC-GGT-AAC-3'), fue usada para la hibridación.

La amplificación de la PCR fue realizada en un volumen de reacción total de 50 µl: 10 µl del ADN extraído y 40 µl de la mezcla de (50 µM KCl, 20 µM Tris -HCl pH 8.3, 3.0

μM de MgCl_2 , 0.01 de gelatina, 2.5 U de Taq polimerasa, 0.2 μM dNTPs, 0.5 μM primer HPU 1, 0.5 μM del primer HPU 2). La denaturalización inicial fue llevada a cabo por 4 min. a 94°C .

Treinta y cinco ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador automático. Cada ciclo consistía de tres pasos de 1 min cada uno: un paso de desnaturalización a 94°C , un paso de anillado a 45°C , y un paso de extensión a 72°C . Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y examinados con luz ultravioleta. Las muestras fueron consideradas positivas cuando una banda de 411 pb pudo ser observada en el gel.

Hibridización

La especificidad de los amplificadores de ADN fue confirmada por hibridización con una sonda marcada con digoxigenina (HPU II; DNA Enzyme IMMUNO assay). El plato de microtitulación fue cubierto con una sonda específica para el ensayo: Se colocaron 100 μl de la solución con la sonda biotinilada a cada pocillo. Los platos fueron incubados de 18-22 horas a $2-8^\circ\text{C}$. Al final de la incubación, los platos fueron lavados para remover cualquier exceso. Previamente al inicio de la hibridización los productos amplificados fueron desnaturalizados en un Termociclador por 15min a 94°C . Posterior al paso del lavado 100 μl de buffer de hibridización fue servido en cada pocillo (a excepción del blanco). 20 μl del amplificado desnaturalizado fue dispensado dentro de su respectivo pocillo. El plato fue lavado tres veces con 100 μl de Anti-ds-AND y 100 μl de cromógeno + sustrato fueron dispensados e incubados por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se agregaron 200 μl de solución bloqueadora por pozo. Los platos fueron leídos a 450/360nm. La corrida fue válida cuando el radio del valor positivo de la absorbancia era mayor o igual a 10 (CP /CN >10).

Análisis Estadístico

La data fué analizada mediante la prueba de Fisher's.

Resultados

Setenta y un pacientes, 49 femeninos y 22 masculinos, con un rango de edad entre 20-79 años (media de 50 años), fueron incluidos en el presente estudio. *H. pylori* fue detectado en las biopsias gástricas de 48 (68%) de 71 pacientes, todos con gastritis crónica. *H. pylori* fue también detectado en la placa dental de 13 (18%) de los 71 sujetos. La frecuencia de *H. pylori* en las biopsias gástricas fué significativamente más alta que en la placa dental de los pacientes ($p < 0.001$). En 8 (17%) de estos 48 pacientes, *H. pylori* fué también detectado en placa dental. De estos pacientes 4 presentaban adicionalmente displasia y 4 metaplasia. En el caso del grupo control, tres pacientes fueron positivos por PCR para *H. pylori* en placa dental, observándose un porcentaje mucho menor que en aquellos pacientes que presentaban sintomatología gastrointestinal.

Discusion

La cavidad bucal ha sido propuesta como un reservorio de infección de *H. pylori*, usando datos provenientes de una variedad de técnicas empleadas, con resultados muy variables [19,20,36]. Algunos estudios han demostrado frecuentemente la presencia de *H. pylori* en muestras de la cavidad bucal, particularmente de placa dental. [14,25,37]. Otros lo han observado sólo en aislamientos ocasionales [33,34,35], y muchos han fallado para demostrar la presencia del microorganismo en la cavidad bucal [22,32]. Estas diferencias en la frecuencia de *H. pylori* en la placa dental, pueden ser explicados por diferencias en los métodos de recolección de muestras y técnicas de detección o por contaminación causada por el reflujo gástrico en el momento de la endoscopia.

De esta forma, tanto la saliva como la placa dental han sido implicadas como posibles vías de adquisición de la infección por *H. pylori*. Aún cuando se han realizado numerosos esfuerzos dirigidos a mejorar los métodos diagnósticos para detectar este agente [38,39], su identificación a nivel bucal se percibe como muy complicada, quizás porque su tasa de recuperación es muy controversial. Así, mientras que la bacteria pudo ser aislada de la cavidad bucal en algunos estudios [14,25-32], en otros los esfuerzos para cultivarla han fracasado [33-35]. En muchos casos, pacientes con resultados positivos a nivel de biopsias gástricas son también positivos en placa dental, pero otros pacientes no presentan coinfección a nivel bucal. A este respecto, algunos investigadores han sugerido que posiblemente formas cocoides no cultivables del organismo puedan sobrevivir en la boca [40].

En el presente trabajo se demostró una alta frecuencia de la infección a nivel de estómago donde fue detectado en el 68 % de los casos, datos que corroboran otros estudios previos realizados en nuestro país, donde se ha demostrado que la tasa de infección de *H. pylori* es elevada [14,41].

La detección de *H. pylori* en placa dental fue en 13/71 (18%) pacientes, lo cual representa un porcentaje más bajo, que el reportado previamente por nuestro grupo (37,5%) [14].

Sería importante considerar que para la toma de la muestra de placa dental deberían ser incluidos sujetos que tengan una cantidad mediana de placa en sus superficies dentarias o quizás solicitarle al paciente el no cepillado el día de la toma de la muestra, ya que al acudir el paciente a una cita médica como en este caso refuerza su cepillado ese día. Igualmente es necesario tratar de recolectar la mayor cantidad posible de muestra de cada uno de los pacientes, ya que las posibilidades de detección del microorganismo, serán mayores.

Sin embargo, a pesar de haber sido más bajo el porcentaje de detección en placa dental, se logró demostrar la presencia de microorganismo, datos que coinciden con los de otros investigadores, [28, 29] y difieren de algunos reportes donde no se ha podido demostrar su presencia o se ha hecho en porcentajes sumamente bajos (solo un caso positivo). [28,33-35].

Los resultados del presente estudio demostraron que todos los pacientes positivos para *H. pylori* en placa dental, tenían gastritis crónica, observándose adicionalmente otras enfermedades que incluyeron metaplasia intestinal y cambios displásicos. Estos resultados confirman la estrecha asociación existente entre *H. pylori* y gastritis, duodenitis u otras enfermedades. [1-4], y corrobora lo sugerido por otros autores en el sentido de que la saliva puede ser responsable de la transmisión de la bacteria, y puede servir como una posible vía de reinfección, posterior al tratamiento antibiótico. [23,24]. La relación existente entre los síntomas gástricos y la presencia de *H. pylori* en la cavidad bucal no está clara. Es posible que la cavidad bucal pueda ser el sitio inicial de la infección, y persista a ese nivel en bajo número por un largo período de tiempo sin colonizar el estómago [31].

En el presente estudio se observó que en 8 (17%) de los 48 pacientes positivos para *H. pylori* en estómago presentaron la bacteria también a nivel de la placa dental, lo que corroboraría lo antes expuesto, referente a las posibilidades de reinfección del microorganismo.

Es importante señalar que se observó la presencia de *H. pylori* en tres de los pacientes del grupo control (pacientes asintomáticos), siendo estos valores similares a nuestros reportes previos [14].

En conclusión podemos señalar que la placa dental puede ser un reservorio para *H. pylori*. La presencia de este microorganismo a nivel de placa dental, podría representar un riesgo para la reinfección posterior a la terapia antibiótica.

Agradecimientos

Trabajo financiado por CDCH 10.30.3792.1996
FONACIT G-2005000371.

Referencias

- Graham DY, Go M. *Helicobacter pylori*: current status. *Gastroenterology*. 1993; 105: 279-82.
- Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DAF, West AP, Mapstone NP y col. *Helicobacter pylori* and dental care. *Gut* 1995; 37: 44-6.
- Hopkins R, Girardi LS, Turney EA. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and Gastric ulcer recurrence: A Review. *Gastroenterology* 1996; 110: 1244-52.
- Dunn B.E, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:720-41.
- Parsonett J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Prittkin J, Chang Y. *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse- type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83: 640-3.
- Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med*. 1991; 324:1043-8.
- Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman K, Atherton J, Gold B, Harris A et al. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori*. *Arch Med Res*. 2000; 31:431-69.
- Atherton JC: *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 1998; 54: 1012- 20.
- Blaser M.J. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated?. *Lancet* 1997; 349:1020-2.
- Hirschl AM, Ritcher M, Makrithatis PM, Pruckl B, Willinger K, Schutze K, y col. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J Infect Dis* 1994; 170: 473-75.
- Van der Ende A, Rauws ME Feller M, Mulder C, Tytgat G, Dankert J. Heterogenous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1996; 11: 638-47.
- Atherton, JC: The clinical relevance of strains types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997; 40: 701-3.
- Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question to mucosal damage?. *Ann Med* 1995; 27:559-63.
- Berrotarán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazzi C, Goncalvez R, y col. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J Med Microbiol*. 2002; 51:764-9.
- Mitchell A, Silva TM, Barret L, Lima AA, Guerrant R. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast. Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1326-8.
- O'Rourke K, Goodman KJ, Grazioplene M, Redlinger T, Day RS. Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-Mexico border. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 816-24.
- De Sousa L, Vasquez L, Velasco J, Parlapiano D. Isolation of *Helicobacter.pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. *Invest Clin* 2006; 47: 109-16.
- Klein PD, Graham DY, Gaillor A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet* 1991; 337: 1503-6.
- Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, y col. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin Microbiol* 1989; 27: 1397-8.
- Nguyen AM, El-Zaatari FA, Gram. DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1995; 76: 705-9.
- Ferguson D, Chuanfu L, Patel N, Mayberry W, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2802-4.
- Bernander S, Dalen J, Gastrin B, Hedenborg L, Lamke L, Ohn R. Absence of *Helicobacter pylori* in dental plaques in *Helicobacter pylori* positive dyspeptic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 282-5.
- Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatzu T. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter*. *Helicobacter* 2000; 5: 30-7.
- Gebara EC, Faria CM, Panuti, Chehter L, C, Mayer MP, Lima LA. Persistente of *H. pylori* in the oral cavity alter systemic eradication therapy. *J Clin Periodontal* 2006; 33: 329-33.
- Banatvala N, Lopez R, Owen Y, Abdi G, Davies J, Hardie R y col. *Helicobacter pylori* in dental plaque. *Lancet* 1993; 341: 380.
- Mapstone N, Lynch D, Lewis F, Axon A; Tompkins D, Dixon M. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in

- the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993; 46: 540-3.
27. Teaman I, Ozmeric N, Ozcan G, Aladimoglu E, Dumlu S, Akyann Y. Comparison of different methods to detect *H. pylori* in the dental plaque of dyspeptic patients. Clin Oral Invest 2007; 11:201-5.
 28. Chumpitas J, Gutierrez J, Cordova R, Sanchez M, Vasquez N, Rivadeira C y col Isolation of *Helicobacter pylori* in dental plaque in patients with gastritis at "Amazomas" clinic. Rev Gastroenterol Peru 2006; 26: 273-376.
 29. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. J Periodontol. 2003; 74: 129-34.
 30. Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham D.Y, El-Zaatari FA. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 783-5.
 31. Li C, Ha T, Tuanzhu M, Donald M, Ferguson D, Chi D y col. A Newly Developed PCR Assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Dig Dis Sci. 1996; 41: 2142-9.
 32. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. J Clin Pathol 2000; 53:218-22.
 33. Okuda K, Ishihara K, Miura T, Katakura A, Noma H, Ebihara Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. Microbiol Immunol 2003; 44: 385-8.
 34. Martinez Gomis J, Diouf A, Lakhassassi N, Sixou M. Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non dyspeptic patients demonstrated by real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 407-10.
 35. Kignel S, De Almeida Pina F, Andre EA, Alves Mayer MP, Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. Oral Dis 2005; 11: 17-21.
 36. Madmujar P, Shah SM, Dhunjiboy KR, Desai HG. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy individuals. Ind J Gastroenterol 1990; 9:271-2.
 37. Dowsett SA; Archila L; Segreto VA; Gonzalez CR; Silva A; Vastola KA y col. *Helicobacter pylori* infection in Indigenous families of Central America: serostatus and oral and finger nail carriage. J Clin Microbiol 1999; 37: 2456-60.
 38. López Brea M, Alarcón T, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Gastroenterol 1997; 13:13-19.
 39. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polimerase chain reaction J Clin Microbiol 1992; 30: 54-8.
 40. Von Recklinghausen G, Weischer T, Ansorg R, Mohr C. No cultural detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque. Zentrabl Bakteriologie 1994; 281: 102-6.
 41. Piñero R, Urrestarazu M, Serrano N, Gonzalez R, Olavarría R, Moncada J y col. Frecuencia de *Campylobacter pylori* en venezolanos aparentemente sanos y asintomáticos. Gen 1989; 43: 777-80.