



## Identificación de *Helicobacter pylori* en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente

### RESUMEN

**Antecedentes:** la bacteria *Helicobacter pylori* se ha detectado en regiones extragástricas, como la cavidad bucal y el oído medio. Algunos autores muestran evidencias de que también puede afectar el tejido amigdalino; pero existen datos contradictorios acerca de su presencia en este sitio. La bacteria en el tejido adenoamigdalino puede ser un reservorio extragástrico para su transmisión o reinfección.

**Objetivo:** identificar la bacteria *Helicobacter pylori* en las amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente mediante tres distintos métodos.

**Pacientes y método:** estudio observacional, transversal y prospectivo en el que se incluyeron 50 pacientes ( $7.4 \pm 2.9$  años) programados para amigdalectomía por faringoamigdalitis recurrente en el Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes durante 2012. La prueba rápida de ureasa se realizó a partir de tejido amigdalino en amortiguador de urea. Se realizó cultivo por siembra de tejido amigdalino en base agar sangre e incubación a 37°C en condiciones microaerófilas. En la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó ADN genómico obtenido de tejido amigdalino para la amplificación de segmentos correspondientes a los genes *ureC* y *hsp60*, específicos de la bacteria.

**Resultados:** todas las muestras fueron negativas por prueba rápida de la ureasa. El cultivo de la bacteria fue negativo en todas las muestras de tejido amigdalino. La amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de *ureC* y *hsp60* no se identificó en ninguna de las muestras provenientes de los pacientes.

**Conclusión:** no se demostró la presencia de *Helicobacter pylori* en las amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente mediante tres distintos métodos.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, amígdalas, faringoamigdalitis recurrente.

Samuel Valdés Durán,<sup>1</sup> Rodolfo González Segovia,<sup>2</sup> Rafael Gutiérrez Campos,<sup>3</sup> Alejandro Rosas Cabral,<sup>4</sup> Yolanda Romo Lozano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Otorrinolaringólogo, Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias, Departamento de Microbiología.

<sup>3</sup> Doctor en Ciencias, Departamento de Química.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias, Departamento de Medicina. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## Identification of *Helicobacter pylori* in Tonsils of Patients with Recurrent Pharyngotonsillitis

### ABSTRACT

**Background:** *Helicobacter pylori* bacterium has been detected in extragastric regions such as oral cavity and middle ear. Some authors have shown evidence that it could also be present in tonsillar tissue,

Recibido: agosto 2013

Aceptado: octubre 2013

### Correspondencia

Dr. Samuel Valdés Durán  
Emiliano Zapata 504  
20070 Aguascalientes, Aguascalientes  
valdesam@hotmail.com

### Este artículo debe citarse como

Valdés-Durán S, González-Segovia R, Gutiérrez-Campos R, Rosas-Cabral A y col. Identificación de *Helicobacter pylori* en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente. An Orl Mex 2014;59:45-50.

but there is contradictory data about its presence in this site. Bacterial presence in adenotonsillar tissue could be an extragastric reservoir for its transmission and/or reinfection.

**Patients and method:** An observational, cross-sectional and prospective study was done including 50 patients ( $7.4 \pm 2.9$  years) scheduled for tonsillectomy for recurrent pharyngotonsillitis at the Hospital Miguel Hidalgo of Aguascalientes, Mexico, in 2012. Rapid urease test (RUT) was performed from tonsillar tissue in urea buffer. Tonsillar tissue was seeded in blood agar base and incubated at 37°C in microaerophilic conditions. Genomic DNA was used in PCR obtained from tonsillar tissue for amplification of the segments corresponding to *ureC* and *hsp60* specific bacterial genes.

**Results:** All samples were negative to RUT. Bacterial culture was negative in all tonsillar tissue samples. PCR amplification of *ureC* and *hsp60* was not identified in any of the patient samples.

**Conclusion:** The presence of *H. pylori* was not demonstrated in tonsils of recurrent pharyngotonsillitis patients using three different methods.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, tonsils, recurrent pharyngotonsillitis.

En la actualidad, la bacteria *Helicobacter pylori* no es sólo un agente causal de enfermedades gastroduodenales, sino también un microorganismo que puede afectar sitios extragástricos,<sup>1,2</sup> como las amígdalas y las adenoides.<sup>3</sup> Estos últimos tejidos pueden constituir reservorios para la diseminación de la bacteria y para la autoinfección; sin embargo, existen datos contradictorios en relación con la existencia de *Helicobacter pylori* en las amígdalas.<sup>4</sup>

La identificación de *Helicobacter pylori* en las amígdalas se estudia mediante distintos métodos. Existen trabajos que muestran que por medio de la prueba rápida de la ureasa, a partir de tejido amigdalino de sujetos con amigdalitis recurrente se obtienen porcentajes de positividad cercanos a 50%.<sup>5</sup> Sin embargo, otros estudios muestran positivities considerablemente menores.<sup>6,7</sup> El cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas es un diagnóstico de referencia para determinar la colonización. Wibawa y colaboradores

determinaron, a través de cultivo amigdalino, la existencia de la bacteria en 15.7% de 19 pacientes con amigdalitis crónica;<sup>3</sup> mientras que Kusano y su grupo no la encontraron en el cultivo de amígdalas de 41 pacientes con faringoamigdalitis recurrente.<sup>8</sup>

Trabajos realizados con análisis de la reacción en cadena de la polimerasa para identificar el gen *ureC* detectaron la bacteria en amígdalas de pacientes con amigdalitis.<sup>9</sup> Por el contrario, un estudio efectuado en una población de 55 pacientes con amigdalitis no la identificaron al realizar también un análisis de la reacción en cadena de la polimerasa para este gen.<sup>6</sup>

El mecanismo exacto por el que la bacteria se transmite de un individuo a otro aún no está completamente claro.<sup>1</sup> La secreción gástrica contaminada por *H. pylori* pudiera entrar a la cavidad nasofaríngea mediante el reflujo gastroesofágico y colonizar las placas dentales y



el tejido adenoamigdalino. La retención de la bacteria en las amígdalas mediante este proceso puede estar relacionada con la unión de la bacteria al tejido linfoide asociado con las mucosas.<sup>7,9</sup>

Debido a la existencia de reportes controvertidos con respecto a *Helicobacter pylori* en las amígdalas, este estudio tiene como objetivo identificar la bacteria en las amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente mediante tres distintos métodos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional, transversal y prospectivo efectuado con pacientes programados para amigdalectomía en el Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes, durante 2012, con faringoamigdalitis recurrente, sin administración de antiácidos, bloqueadores-H2 o antibióticos durante el mes previo a la cirugía. Las amígdalas se resecaron bajo anestesia general con la técnica clásica de disección y electrocauterización.

### Prueba rápida de ureasa

Se realizó a partir de la incubación de tejido amigdalino en amortiguador de urea.<sup>10</sup> La prueba se consideró positiva cuando ocurrió un viraje de color en los primeros 30 minutos de incubación.

### Cultivo de *Helicobacter pylori*

El cultivo de la bacteria se realizó mediante protocolo previamente descrito.<sup>11</sup> La identificación de la bacteria se realizó por medio de la morfología colonial y microscópica, así como por positividad a ureasa y catalasa.

### Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN genómico se obtuvo a partir de tejido amigdalino mediante la técnica de fenol-cloroformo.<sup>12</sup> Se analizó el gen *ureC* utilizando

cebadores glmM1 y glmM2<sup>13</sup> y gen *hsp60* con HSP1 y HSP2.<sup>14</sup> El gen humano *Nod1* usado como control de integridad de ADN se amplificó con cebadores diseñados con base en la secuencia reportada en GenBank (NM\_006092.2). Los productos de amplificación se tiñeron con bromuro de etidio y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% en amortiguador TBE.

## RESULTADOS

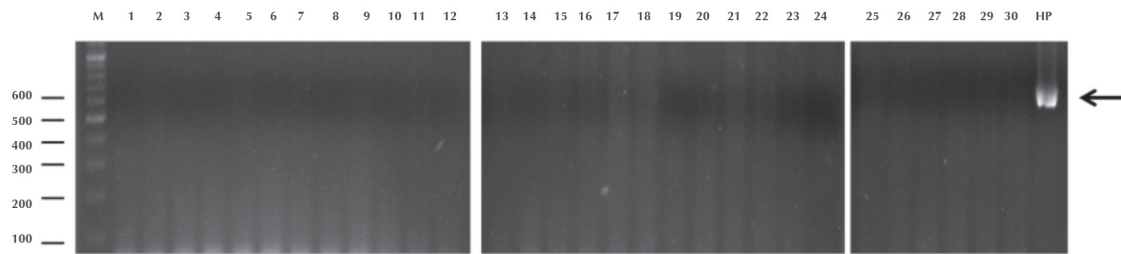
El estudio consideró una población de 50 pacientes con indicación de faringoamigdalitis recurrente; de éstos, 62% correspondió a pacientes del sexo masculino. Los individuos del estudio tuvieron límites de edad de 1 y 42 años, con media de  $7.4 \pm 2.9$  años.

La prueba rápida para identificar actividad ureasa en el tejido amigdalino de la población de estudio fue negativa en todos los casos, lo que indicó la ausencia de actividad ureasa en el tejido amigdalino de nuestra población.

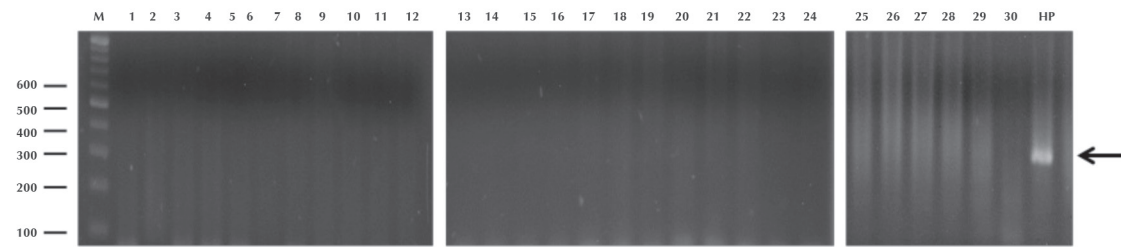
En ningún cultivo de tejido amigdalino realizado en los sujetos de este estudio se observó el desarrollo de colonias con características típicas de la bacteria.

La identificación de la bacteria en las muestras amigdalinas mediante el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa consideró la amplificación de los genes *ureC* y *hsp60* de *H. pylori* (segmentos de 294 y 590 pb, respectivamente). Al realizar este análisis para el gen *hsp60*, el producto de 590 pb fue amplificado a partir del ADN de *H. pylori* usado como control positivo; sin embargo, en ninguna muestra de la población de pacientes se generó la amplificación correspondiente (Figura 1).

La amplificación del gen *ureC* generó el producto de 294 pb en el control positivo de *H. pylori*, pero fue negativo en las muestras de pacientes (Figura 2).



**Figura 1.** Amplificación del gen *hsp60* por la reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se muestra la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1-30) de un total de 50 sujetos analizados, amplificación con ADN de *H. pylori* control positivo (HP) y marcador de peso (M). La flecha indica el producto de amplificación específico de *hsp60* (590 pb).



**Figura 2.** Amplificación del gen *ureC* por la reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se muestra la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1-30) de un total de 50 sujetos analizados, amplificación con ADN de *H. pylori* control positivo (HP) y marcador de peso (M). La flecha indica el producto de amplificación específico de *ureC* (294 pb).

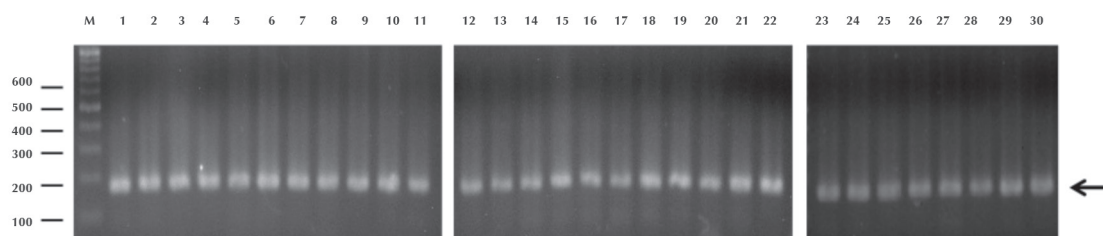
Al considerar la posibilidad de que la bacteria no fue detectada en la primera amplificación debido a una baja densidad bacteriana en el tejido, se realizó la reamplificación de *ureC* y *hsp60* en las muestras resultantes del primer análisis de amplificación. En ninguna de ellas se identificó el producto correspondiente a los dos genes analizados.

Para descartar que la ausencia de amplificaciones de *ureC* y *hsp60* pudiera ser consecuencia de muestras de ADN genómico con alto grado de degradación, se realizó la amplificación del gen humano *Nod1* a partir de las muestras de

ADN utilizadas en el estudio. Mediante este análisis se identificó el producto de la reacción en cadena de la polimerasa de 164 pb específico del gen *Nod1* en todas las muestras de ADN de las amígdalas (Figura 3). Se comprobó así que la calidad del ADN de las muestras fue adecuada para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa.

## DISCUSIÓN

Diferentes autores han llegado a conclusiones opuestas en relación con la existencia de la bacteria en las amígdalas. Esto pudiera ser



**Figura 3.** Amplificación del gen *Nod1* por la reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se muestra la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1-30) de un total de 50 sujetos analizados y marcador de peso (M). La flecha indica el producto de amplificación específico de *Nod1* (164 pb).

consecuencia de características particulares de la población estudiada. Debido a que la prevalencia de la infección gástrica se incrementa con la edad, ésta puede ser un factor importante.<sup>15,16</sup> En nuestro estudio se trabajó con una población mixta (niños-adultos), en la que no se identificó la bacteria. Otros estudios con poblaciones mixtas equivalentes a nuestro trabajo muestran resultados semejantes.<sup>7</sup>

Otro aspecto que puede generar disparidad en la identificación de *H. pylori* es la aplicación de métodos validados para el diagnóstico gástrico, mas no para regiones extragástricas, como las amígdalas. La prueba rápida de ureasa no es un análisis *H. pylori*-específico (determina microorganismos productores de ureasa), por lo que en sitios de mayor diversificación de especies bacterianas que la mucosa gástrica (por ejemplo, las amígdalas), la positividad puede relacionarse con otros microorganismos ureasa-positivos.<sup>4</sup> Lo anterior se explica porque algunos estudios muestran datos de positividad a ureasa en las amígdalas sin correlación con otros métodos diagnósticos.<sup>9</sup>

En ninguna muestra amigdalina de los 50 pacientes incluidos en nuestro estudio identificamos la bacteria mediante cultivo. La mayor parte de los trabajos que intentaron identificar la bacteria en las amígdalas mediante este método llegó a

conclusiones semejantes.<sup>8,17</sup> Llama la atención el trabajo de Wibawa y su grupo, que mediante el cultivo de tejido amigdalino realizaron el aislamiento de *H. pylori* a partir de individuos con amigdalitis.<sup>3</sup> Estos resultados, además de relacionarse con factores particulares de la población analizada (por ejemplo, edad y consumo de antibióticos), pueden vincularse con características del cultivo de *H. pylori*. Como ocurre con otros bacilos gramnegativos, *H. pylori* puede generar formas cocoides no cultivables cuando se enfrenta a ambientes desfavorables.<sup>8</sup> Esta situación puede reducir de manera importante la probabilidad de identificar la bacteria mediante cultivo de tejido amigdalino.

La identificación de *H. pylori* en tejido amigdalino se ha mostrado por amplificación de genes conservados a nivel de especie, así como mediante marcadores genéticos de patogenicidad.<sup>18,19</sup> Sin embargo, en nuestro estudio, que incluyó un análisis de los genes *ureC* y *hsp60*, marcadores especie-específicos altamente conservados, no se identificó *H. pylori* en nuestra población. Este resultado es congruente con varios trabajos que no identifican a la bacteria en las amígdalas mediante este método.<sup>4,6</sup>

La identificación de *H. pylori* en las amígdalas puede correlacionarse con el incremento de la

edad de la población analizada. Los estudios en poblaciones adultas o en poblaciones mixtas con edades promedio mayores muestran mayor probabilidad de identificar la bacteria en las amígdalas,<sup>18,19</sup> mientras que esta probabilidad se reduce en la población infantil.<sup>20</sup> Nuestro estudio incluyó una población mixta, pero con preponderancia de individuos menores de 10 años (7.4 ± 2.9 años). La mayor probabilidad de identificar la bacteria en las amígdalas también puede asociarse con poblaciones de mayor prevalencia de la bacteria, así como con otros factores importantes, como el reflujo gastroesofágico.

## CONCLUSIONES

La existencia de *Helicobacter pylori* en las amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente no se identificó usando tres distintas estrategias metodológicas. Mediante los análisis de la prueba rápida de ureasa y cultivo no se encontraron bacterias viables; asimismo, no hubo amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de los genes *ureC* y *hsp60* de *H. pylori* a partir de tejido amigdalino.

## REFERENCIAS

1. Kurtaran H, Uyar ME, Kasapoglu B, Turkay C, et al. Role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis of upper respiratory system diseases. J Natl Med Assoc 2008;100:1224-1230.
2. Malfertheiner MV, Kandulski A, Schreiber J, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* infection and the respiratory system: a systematic review of the literature. Digestion 2011;84:212-220.
3. Wibawa T, Surono A, Widodo I. Isolation of viable *Helicobacter pylori* in the tonsillar tissues of chronic tonsillitis patients. J Infect Dev Ctries 2011;5:561-564.
4. Vilarinho S, Guimarães NM, Ferreira RM, Gomes B, et al. *Helicobacter pylori* colonization of the adenotonsillar tissue: fact or fiction? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2010;74:807-811.
5. Lin HC, Wu PY, Friedman M, Chang HW, et al. Difference of *Helicobacter pylori* colonization in recurrent inflammatory and simple hyperplastic tonsil tissues. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2010;136:468-470.
6. Eyigor M, Eyigor H, Gultekin B, Aydin N. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue specimens by rapid urease test and polymerase chain reaction. Eur Arch Otorhinolaryngol 2009;266:1611-1613.
7. Skinner LJ, Winter DC, Curran AJ, Barnes C, et al. *Helicobacter pylori* and tonsillectomy. Clin Otolaryngol 2001;26:505-509.
8. Kusano K, Inokuchi A, Fujimoto K, Miyamoto H, et al. Coccoid *Helicobacter pylori* exists in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy. J Gastroenterol 2010;45:406-412.
9. Abdel-Monem MH, Magd EA, Nour YA, Harfoush RA, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue of children with chronic adenotonsillitis using rapid urease test, PCR and blood serology: a prospective study. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011;75:568-572.
10. Pande PR, Karki BB, Pande R, Khatri R. Evaluation of locally made rapid urease test for diagnosis of *Helicobacter pylori*. PMJN 2009;9:50-53.
11. Muñoz L, González-Valencia G, Pérez-Pérez GI, Giono-Cerezo S, et al. A comparison of Lewis X and Lewis Y expression in *Helicobacter pylori* obtained from children and adults. J Infect Dis 2001;183:1147-1151.
12. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. World J Gastroenterol 2009;15:484-488.
13. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the *urease C* gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. J Med Microbiol 1993;39:338-344.
14. Singh V, Mishra S, Rao GRK, Jain AK, et al. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: *hsp60*. Helicobacter 2008;13:30-34.
15. Calvet X, Ramírez Lázaro MJ, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2013;18:5-11.
16. Goh KL, Chan WK, Shiota S, Yamaoka Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. Helicobacter 2011;16:1-9.
17. Di Bonaventura G, Catamo G, Neri M, Neri G, et al. Absence of *Helicobacter pylori* in tonsillar swabs from dyspeptic patients. New Microbiol 2000;23:445-448.
18. Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, Bayiz U, et al. Detection of *Helicobacter pylori* and its *CagA* gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003;129:1225-1229.
19. Nártová E, Kraus J, Pavlík E, Lukeš P, et al. Presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome. Eur Arch Otorhinolaryngol 2013.
20. Yilmaz M, Kara CO, Kaleli I, Demir M, et al. Are tonsils a reservoir for *Helicobacter pylori* infection in children? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2004;68:307-310.