

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública



TESIS DOCTORAL

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HELICOBACTER
PYLORI Y SU RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN MUESTRAS GÁSTRICAS Y
ORALES.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Presentada por

PABLO BALTAR MARTÍNEZ DE LA RIVA

Santiago de Compostela

2016



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública

TESIS DOCTORAL

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HELICOBACTER
PYLORI Y SU RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN MUESTRAS GÁSTRICAS Y
ORALES.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Presentada por

PABLO BALTAR MARTÍNEZ DE LA RIVA

Santiago de Compostela

2016



DON JUAN GESTAL OTERO y DON BENITO REGUEIRO GARCÍA,

Catedráticos de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada **“TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI Y SU RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS GÁSTRICAS Y ORALES”** que, para optar al grado de Doctor, presenta Don Pablo Baltar Martínez de la Riva, ha sido realizada en el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiagobajo mi dirección y la del Prof Dr. Benito José Regueiro García, Catedrático de Microbiología, y que, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, 31 de marzo de 2016

Fdo. D. Benito Regueiro García

Fdo. D. Juan Gestal Otero



Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos:

“MRSA and detection of simple viability and Tandem real-time PCR for detection of Cryptosporidium spp, Dientamoeba fragilis, Entamoeba histolytica and Giardia instestinalis” Becton Dickinson a través de la Fundación Ramón Domínguez.



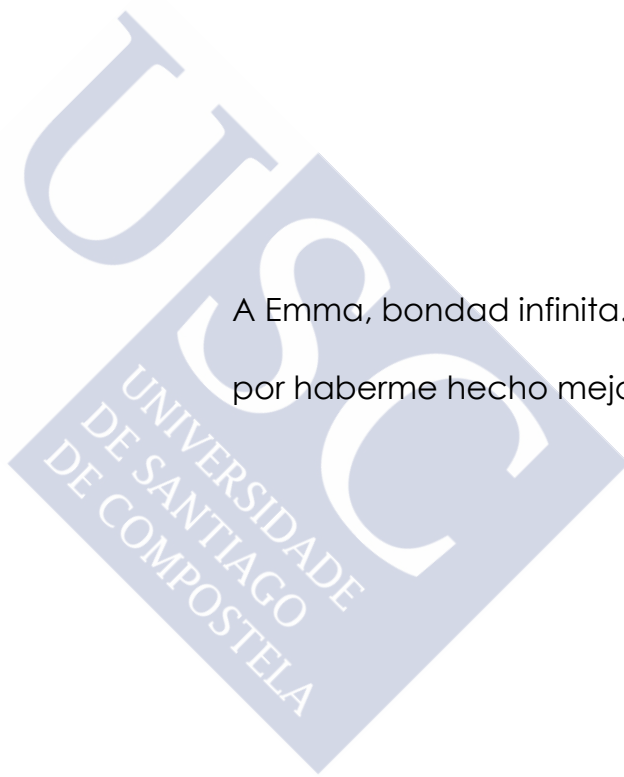
“Detección molecular de la viabilidad bacteriana en hemocultivos. Uso combinado de nanopartículas de absorción específica y citostáticos”.
Instituto Carlos III de Madrid y el Ministerio de Sanidad.



Proyecto P114/00620, integrado en el Plan Estatal de I+D+I 2013-2016 y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación del Fondo Europeo de Desarrollo regional (FEDER)

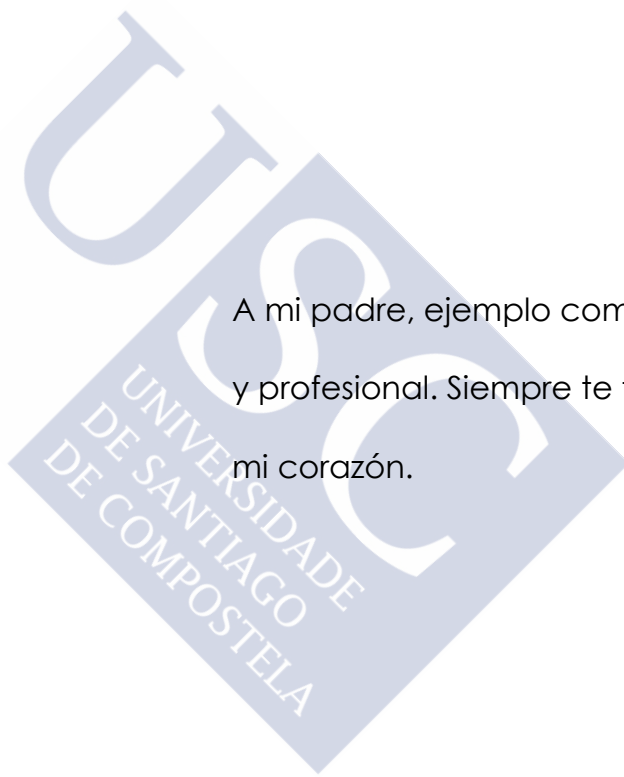


A Emma, bondad infinita. Gracias
por haberme hecho mejor persona.





A mi padre, ejemplo como persona
y profesional. Siempre te tendré en
mi corazón.





Agradecimientos

A mis Directores, por su inestimable apoyo e incansable ayuda. Por su bondad ilimitada y por sus consejos más allá de lo profesional. Gracias por su ejemplo constante. Gracias por confiar en mi más que yo mismo y por demostrarme que con trabajo y esfuerzo todo se consigue.

Al Dr. D. José Llovo, por sus innumerables aportaciones y por la pasión que transmite en su trabajo.

Al Dr. Xavier Rodríguez Calviño, gracias por tu esfuerzo y dedicación. Gracias por haberme ayudado siempre con tanto interés.

A mis compañeros del Servicio de Microbiología del CHUS, por haber estado siempre dispuestos a ayudarnos.

A la empresa Becton Dickinson SA, por su apoyo técnico y financiero.

He de extender también mi agradecimiento a buena parte de los técnicos del servicio de microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, cuyo trabajo ha sido imprescindible para poder realizar este trabajo.





ÍNDICE



ÍNDICE

ÍNDICE	XV
RESUMEN	XXI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>. Microbiología	4
1.1.1. Descripción de género y filogenia	4
Helicobacter gástricos	5
Helicobacter enterohepáticos	5
1.1.2. Microbiología del <i>H. pylori</i>	6
1.1.3. Factores de virulencia del <i>H. pylori</i>	6
1.1.3.1. Vacuolating Cytotoxin Gene (<i>vacA</i>)	7
1.1.3.2. Gen promotor de la úlcera duodenal (<i>dupA</i>)	9
1.1.3.3. Gen inducido por contacto con el epitelio (<i>iceA</i>)	9
1.1.3.4. Ureasa	10
1.1.3.5. Outer membrane proteines(OMPs)	10
1.1.3.6. Blood group antigen-binding adhesión (<i>BabA</i>)	11
1.1.3.7. Sialic acid-binding adhesion(<i>SabA</i>)	11
1.1.3.8. Outer inflammatory protein (<i>OipA</i>)	12
1.2. Morfología	13
1.3. Requisitos para su crecimiento	14
1.4. Metabolismo	16
1.4.1. Respiración y defensa frente al estrés oxidativo	16
1.4.2. Metabolismo de nitrógeno	17
1.4.3. Envuelta celular, membrana externa y lipopolisacáridos (LPS)	17
1.5. Regulación genética	18
1.6. Clínica	18
1.6.1. Gastritis aguda y crónica	19
1.6.2. Úlcera péptica	21
1.6.3. La dispepsia no ulcerosa	24
1.6.4. Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico	25
1.6.5. Linfoma gástrico(MALT)	26
1.6.6. Reflujo gastroesofágico (ERGE)	27
1.6.7. Desórdenes extragástricos	28
1.7. Manifestaciones hematológicas	28
1.7.1. Púrpura trombocitopénica inmune (PTI)	29
1.8. Manifestaciones cardioplumonares	31
1.8.1. Enfermedad de la arteria coronaria(EAC)	31
1.8.2. Asma	32
1.9. Manifestaciones metabólicas	34

1.9.1.	Resistencia a la insulina y síndrome metabólico	34
1.9.2.	Diabetes Mellitus Tipo 2	35
1.10.	Manifestaciones neurológicas	37
1.10.1.	Parkinson	38
1.10.2.	Enfermedad de Alzheimer	39
1.10.3.	Migrañas	39
1.11.	Manifestaciones dermatológicas	41
1.11.1.	Urticaria espontánea crónica	42
1.11.2.	Rosácea	43
1.12.	Otras manifestaciones	44
1.12.1.	Fibromialgia	44
1.13.	Diagnóstico y tratamiento	45
1.13.1.	Diagnóstico	45
1.13.2.	Los métodos no invasivos	46
1.13.3.	Los métodos invasivos	48
1.13.4.	Conclusiones	49
1.14.	Tratamiento	52
1.14.1.	Terapia de primera línea en áreas con baja resistencia a claritromicina	54
1.14.2.	Terapia de primera línea en zonas con alta tasa de resistencia a claritromicina	55
1.14.2.1.	La terapia secuencial	55
1.14.2.2.	La terapia concomitante	56
1.14.2.3.	Terapia híbrida	58
1.14.3.	El tratamiento de segunda línea en áreas con bajas tasas de resistencia a la claritromicina	60
1.14.4.	El tratamiento de segunda línea en áreas que tienen altas tasas de resistencia a claritromicina	60
1.14.5.	Tratamiento de tercera línea	60
1.14.6.	Uso de probióticos en el tratamiento	61
1.15.	Vacuna frente al H. pylori	63
1.15.1.	Los estudios en ratones	63
1.16.	Epidemiología	66
1.16.1.	Incidencia	70
1.16.2.	Rutas de transmisión	71
1.17.	Presencia de H. pylori en la cavidad oral y sus implicaciones en el tratamiento	72
1.17.1.	H. pylori en placa dental y saliva	73
1.17.2.	Identificación	75
1.17.3.	Enfermedad periodontal y H. pylori	77
1.18.	Detección de h. pylori en heces	79
1.18.1.	Siembra en placa	79
1.18.2.	PCR	80
2.	OBJETIVOS	83
3.	MÉTODOS	87
3.1.	Pacientes	89

3.2.	BD Max	90
3.3.	Reactivos de PCR INCLUIDOS EN LAS TIRAS DE EXTRACCIÓN DEL BD Max	94
3.4.	Fases de trabajo del BD Max™	94
3.5.	Diseño de la PCR en BD Max™	95
3.6.	Optimización de tiempos en la PCR de H. Pylori	100
3.7.	Extracción y PCR en BD Max	102
3.8.	Procesamiento de muestras em Maldi ToF	105
3.9.	Endoscopia digestiva alta	106
3.10.	Procesamiento de biopsias gástricas	106
3.11.	Las pruebas de sensibilidad a antibióticos	107
3.12.	Flujo de biopsias gástricas	108
3.13.	Muestras de heces	109
3.14.	Muestras orales	111
3.15.	Muestras parafinadas	112
3.16.	Medición de tiempos y costes de detección con BD Max™	114
4.	RESULTADOS	115
4.1.	Dendograma y cluster de muestras	117
4.2.	Biopsias gástricas	120
4.2.1.	Límite de detección de la técnica	125
4.3.	Análisis en heces	130
4.4.	Muestras orales	134
4.5.	Muestras desparafinadas y desparafinadas	136
4.6.	Medición de tiempos y costes de detección con BD Max™	137
4.6.1.	Análisis comparativo protocolos de detección Microscan Siemens	138
4.6.2.	Análisis de coste de las técnicas de detección	139
5.	DISCUSIÓN	145
5.1.	DETECCIÓN DE H.pylori y resistencia a Cla en heces	145
5.2.	Muestras orales	146
5.3.	Muestras parafinadas	151
5.4.	Muestras de biopsias gástricas	152
5.5.	Resistencia a Cla	152
5.6.	Flujograma de trabajo del BD Max	153
6.	CONCLUSIONES	155
7.	BIBLIOGRAFÍA	159





RESUMEN



RESUMEN

Los servicios clínicos exigen una rápida respuesta a las demandas diagnósticas. La evolución de las resistencias a antibióticos en estos últimos tiempos hacen necesario contar con sistemas de detección rápidos y fiables que permitan al clínico instaurar un tratamiento de primera línea eficaz y eficiente. En este trabajo hemos diseñado sistemas de detección del prevalente H.pylori y su resistencia a claritromicina que supone pasar de los 10 días actuales a 1h 30 minutos donde el clínico podrá conocer el resultado de la muestra clínica y su resistencia a Claritromicina.

ABSTRACT

Clinical services require a rapid response to the diagnostic demands. The evolution of antibiotic resistance in recent times make it necessary to have a fast and reliable systems that enable the clinical detection that allows an effective and efficient first line treatment. In this work we have designed a detection system for the prevalent H.pylori and resistance to clarithromycin of moving from the current 10 days to 1 hour 30 minutes where the clinician can have the outcome of the clinical sample and its resistance to clarithromycin.

RESUMO

Os Servizos clínicos esixen unha resposta rápida ás demandas de diagnóstico. A evolución da resistencia aos antibióticos nos últimos tempos fan necesario ter sistemas rápidos e fiables que permiten a detección clínica e instauración dun tratamento de primeira liña eficaz e eficiente. Co sistemas de detección desenvolados neste traballo para a detección do prevalente H.pylori e resistencia á claritromicina permitirá mover-se dos actuais 10 días a 1 hora e 30 minutos, onde o médico pode saber o resultado da mostra clínica ea súa resistencia á claritromicina.



1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

En 1984, Marshall y Warren identificaron definitivamente el *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) en el Hospital Royal Perth de Australia. Se sembró a partir de muestras de biopsias gástricas de pacientes con gastritis y úlcera péptica. Basándose en estos resultados, propusieron que el *H. pylori* podría ser el agente etiológico de estas patologías. (1,2).

Los experimentos de auto-ingestión de la bacteria llevados a cabo por Marshall y Morris y los posteriores con voluntarios, demostraron que estas bacterias pueden colonizar el estómago humano, induciendo de este modo la inflamación de la mucosa gástrica. Marshall desarrolló un episodio transitorio de gastritis después de la ingestión de *H. pylori* y en el caso de Morris se convirtió en una gastritis más persistente, que se resolvió después de la terapia secuencial con doxiciclina primero y luego con salicilato de bismuto. Estos resultados motivaron las investigaciones posteriores sobre *H. pylori* en las que se demostró que la colonización gástrica por *H. pylori* puede conducir a una gran variedad de trastornos del tracto gastrointestinal superior, tales como: gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma asociado a mucosas (MALT) y carcinoma gástrico (1,3,4).

En 1994 este microorganismo fue reconocido como carcinógeno de tipo I y es considerado como el agente etiológico más común en los

cánceres relacionados con enfermedades infecciosas. En 2.005 Marshall y Warren fueron distinguidos con el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de esta bacteria y su relación con la úlcera péptica. Aproximadamente el 10% de los individuos con *H. pylori* desarrollan úlcera péptica, entre un 1% y 3% desarrollan adenocarcinoma gástrico y menos de un 0,1 % desarrollan linfoma relacionado con mucosa (5).

1.1. *Helicobacter pylori*. Microbiología

1.1.1. Descripción de género y filogenia

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión de la Proteobacteria, Campylobacterales, familia Helicobacteraceae. Esta familia también incluye: *Wolinella* géneros, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira*, y *Thiovulum*. Hasta la fecha, el género *Helicobacter* consta de más de 20 especies reconocidas, con muchas otras a la espera de un reconocimiento formal (6). Todos los microorganismos pertenecientes al género *Helicobacter* son microaerófilos y en la mayoría de los casos son catalasa y oxidasa positivos. Un gran número de ellos son también ureasa positivos.

Las especies de *Helicobacter* pueden subdividirse en dos grandes grupos: *Helicobacter* gástricos y *Helicobacter* enterohepáticos (no gástricos). Ambos grupos muestran una gran especificidad orgánica, lo que provoca que los *Helicobacter* gástricos no sean capaces de colonizar el intestino o el hígado y viceversa (7).

Helicobacter gástricos

La especie de *Helicobacter* gástrico ha tenido que adaptarse al inhóspito ambiente de la superficie de la mucosa gástrica. Todas las especies de *Helicobacter* gástricos conocidos son ureasa positivos y muy móviles a través de flagelos (8, 9). La producción de la enzima ureasa permite la supervivencia a corto plazo en un medio muy ácido como el gástrico, mientras que la motilidad permite el movimiento rápido hacia una zona de PH más neutro de la mucosa gástrica. Esto explica por qué ambos factores son requisitos previos para la colonización de la mucosa gástrica (10, 11, 12). La morfología en espiral y la motilidad flagelar a continuación, ayudan a la penetración en la capa de moco viscoso, donde las condiciones de pH neutro permiten el crecimiento de las especies de *Helicobacter* gástricos.

Helicobacter enterohepáticos

Los *Helicobacter* enterohepáticos colonizan el tracto intestinal bajo, incluidos el ileon, el cólon y el árbol biliar de humanos y otros mamíferos. Tienen la capacidad de causar infecciones permanentes asociadas a la inflamación crónica y a la hiperproliferación de células epiteliales que, a su vez, pueden desencadenar en una enfermedad neoplásica. También están asociadas con enfermedades hepatobiliares en humanos (13,14,15).

1.1.2. Microbiología del *H. pylori*

El *H.pylori* es genéticamente heterogéneo, probablemente debido tanto a las mutaciones que el microorganismo ha de realizar para adaptarse a las condiciones del medio gástrico de su hospedador como a los diferentes patrones de respuesta inmunitaria del mismo en respuesta a la infección por *H.pylori* (16).

Las mutaciones genéticas que dan lugar a la mencionada heterogeneidad del *H.pylori* pueden acontecer de diversas formas, introduciendo o eliminando determinadas secuencias en la cadena de DNA de la bacteria (17, 18, 19).

1.1.3. Factores de virulencia del *H. pylori*

CagPAI es una región de 40 kb de ADN cromosómico que codifica aproximadamente 31 genes que forman un sistema de secreción de tipo IV, y se puede dividir en dos regiones: Cag I y Cag II, de acuerdo a una nueva secuencia de inserción (20). Este sistema de secreción forma un pilus que inserta CagA (una oncoproteína) en el citosol de las células epiteliales gástricas través de una aguja rígida cubierta por CagY (una proteína VirB10 homóloga) y CagT (una proteína-VirB7 homóloga) en la base. (21,22)

Una vez que la oncoproteína es introducida en el citosol de las células epiteliales gástricas produce la desfosforilación de las proteínas celulares del hospedador y cambios morfológicos (23, 24). El CagA

produce, asimismo, la desregulación de la señalización por β - cateninas (25, 26) y los complejos apicales de unión (27), acontecimientos ligados a una mayor motilidad de la célula y transformación oncogénica (28, 29).

Adicionalmente, algunos estudios han señalado que cagPAI parece estar involucrado en la inducción de la producción de interleucina-8 gástrica (IL-8), un potente activador de los neutrófilos. (30)

En consecuencia, la presencia del gen CagA está asociado con mayores grados de inflamación gástrica, que provocará el desarrollo de las enfermedades gastrointestinales más graves, tales como la úlcera péptica (31) y cáncer gástrico (32).

En los países occidentales, diversos estudios afirman que los individuos infectados con cepas CagA positivas tienen un mayor riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico que aquellos con cepas CagA negativas. (33,34)

1.1.3.1. *Vacuolating Cytotoxin Gene (vacA)*

VacA es una citotoxina secretada por bacterias en forma de polipéptido de 140-kDa, recortado en ambos extremos que se inserta en las células del hospedador, en donde ejerce su actividad (35). El gen que codifica VacA está presente en todas las cepas y muestra la diversidad alélica del *H. pylori* en tres regiones principales: los s (señal), el I (intermedio), y las regiones intermedias (m), y, en consecuencia, la

actividad citotóxica de la toxina varía entre las cepas (36, 37). Las diferentes combinaciones de los dos mayores alelos (s1, s2, I1, I2, M1, M2) pueden existir para cada región, lo cual resulta en diferentes toxinas VacA con distinta capacidad de inducir la vacuolización en las células epiteliales (38, 39). Mientras las cepas vacA s1 / m1 son vacuolizantes y las cepas vacA s2 / m2 son no vacuolizantes, sólo algunas cepas de vacA s1 / m2 son capaces de inducir vacuolas (40). En cuanto a la región i: las cepas s1 / m2 tienen un alelo i1 vacuolizante, mientras que las cepas s1 / m2 que tienen un alelo i2 son no vacuolizantes (41).

VacA induce múltiples actividades celulares. La mejor estudiada entre ellas es la alteración en la maduración endosomal, que en consecuencia lleva a la vacuolización epitelial celular. VacA también es capaz de inducir la formación de la membrana de canal, la liberación del citocromo c de la mitocondria y la unión a receptores de membrana que activan una respuesta proinflamatoria (42).

En los países occidentales, incluyendo América Latina, el Oriente Medio y África, muchos estudios han señalado que individuos infectados con cepas de *H. pylori* s1 o m1 ven incrementado el riesgo de sufrir úlcera péptica o carcinoma gástrico, en comparación con los infectados con cepas s2 o m2 (43).

1.1.3.2. Gen promotor de la úlcera duodenal (*dupA*)

El *H. pylori* promotor de la úlcera duodenal (DU) (*Dupa*), ha sido descrito inicialmente como marcador de riesgo para el desarrollo de la úlcera duodenal y puede estar asociado con el desarrollo del carcinoma gástrico (44). La función del gen *dupA* no es del todo conocida pudiendo actuar en combinación con otros homólogos para formar un sistema de secreción de tipo IV similar a la *cagPAI* (45). Además, se ha asociado con un aumento de la IL-8 en la mucosa gástrica antral in vivo, así como, a partir de células epiteliales gástricas in vitro. La presencia de *dupA* puede participar en la absorción de DNA de transferencia. Los experimentos in vitro eliminando el gen *dupA* demuestran que la ausencia de *dupA* se asocia con una mayor susceptibilidad a bajo pH (44).

1.1.3.3. Gen inducido por contacto con el epitelio (*iceA*)

Diversas investigaciones han demostrado que el *iceA* tiene dos principales variantes alélicas: *iceA1* y *iceA2* (46, 47).

El *iceA1* está regulado por el contacto de *H. pylori* con células epiteliales gástricas (47). Según Doorn et al, existe una relación estadísticamente significativa con la presencia del alelo y la úlcera péptica (46). El *iceA2* no tiene homología con genes conocidos y su función sigue sin estar clara, aunque algunos investigadores han

relacionado este alelo con la gastritis asintomática y la dispepsia no ulcerosa (47,48).

1.1.3.4. Ureasa

Para contrarrestar el ambiente ácido del estómago, el *H.pylori* produce una enzima, la ureasa, que hidroliza la urea en NH_3 y CO_2 . Se ha demostrado que esta enzima juega un papel muy importante en la colonización gástrica, observándose que las bacterias que no cuentan con esa capacidad de producción de ureasa no tienen tampoco la capacidad de colonizar un medio ácido como el gástrico (49). Asimismo, la ureasa produce daño directo al epitelio al descomponerse en amoníaco, subproducto que, en conjunción con los metabolitos de los neutrófilos, forma agentes carcinógenos que pueden participar en el desarrollo de tumores gástricos (50, 51). La ureasa también provoca que los neutrófilos y monocitos se establezcan en la superficie de la mucosa y produzcan citoquinas proinflamatorias (52).

1.1.3.5. Outer membrane proteines (OMPs)

Los estudios de factores de virulencia del *H.pylori* se han centrado siempre en los elementos que hemos visto anteriormente. Pero además de éstos, el *H.pylori* posee un amplio repertorio de OMPs codificadas como una familia de genes parálogos (53). El genoma del *H.pylori* posee gran plasticidad causada por una elevada tasa de mutaciones y una elevada tasa de recambio de material genético, lo que le permite

una libre recombinación de sus genes (54, 55). La micro y macro diversidad entre las diferentes cepas de *H.pylori* actúan como causas para la adecuada adaptación al ambiente hostil que posee el medio gástrico, así como a las variables condiciones de supervivencia durante los procesos inflamatorios o durante la transmisión entre individuos (56, 57). Esta heterogeneidad genética se ve claramente expresada en los genes OMPs. El *H.pylori* contiene más de 30 genes OMP, que se dividen a su vez en: HOP (*H.pylori* outer membrane porins) y HOR (grupos relacionados con HOP) (58).

1.1.3.6. Blood group antigen-binding adhesión (*BabA*)

La *BabA* es la adhesina mejor caracterizada. Han sido descubiertos tres alelos *Bab*: *babB*, *babA1*, *babA2*. Algunos investigadores han demostrado que existe una asociación significativa entre los genotipos positivos para *babA2* y la úlcera péptica (59,60,61).

1.1.3.7. Sialic acid-binding adhesión (*SabA*)

La infección por *H. pylori* induce la expresión de la inflamación asociada a estructuras de hidratos de carbono "sializadas", que están regulados como parte de gangliósidos complejos en tejido gástrico inflamado. Por tanto, la adhesión de las bacterias a la mucosa gástrica depende de la *SabA* y de los glicanos sializados afines que se encuentran en la superficie de la célula huésped.

La capacidad de unirse a las células epiteliales glicosiladas se considera esencial para que el *H. pylori* cause infecciones y enfermedades, de forma persistente (62, 63).

Se ha demostrado que el *H. pylori* también se une a los glóbulos rojos de la sangre en los vasos sanguíneos de la mucosa gástrica en los seres humanos infectados y monos rhesus. Se verificó que la SabA, es la proteína de superficie bacteriana responsable de la capacidad de unión entre *H. pylori* y los glóbulos rojos. Además, se han relacionado los diversos polimorfismos del *H. pylori* con su capacidad de unirse a diversos hidratos de carbono sializados, lo cual puede adaptar las propiedades de unión de bacterias tanto a hospedadores individuales como a los diferentes patrones de glicosilación epiteliales durante la inflamación crónica (64).

1.1.3.8. *Outer inflammatory protein (OipA)*

La *OipA*, es una OMP (*outer membrane proteine*) proinflamatoria. Inicialmente, Yamaoka et al (65) descubrieron que estaba correlacionada con niveles elevados de IL-8 en la mucosa y que la proteína se encontraba en el 97.5% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal en comparación con el 70% de las personas con gastritis crónica (66).

Otro estudio demostró que el estado *OipA* está fuertemente relacionado con genotipos *cagA*, *vacA* y *iceA* (67).

Kudo et al (68) verificaron que la OipA tenía una asociación significativa con: una alta densidad de *H. pylori*, una grave infiltración de neutrófilos y con altos niveles de IL-8 en las mucosas. Asimismo, los investigadores demostraron, que la OipA puede inducir la inflamación y la fosforilación de las múltiples vías de señalización que suelen interactuar con la cagPAI (CagA) (69,70).

1.2. Morfología

El *H. pylori* es una bacteria gram-negativa, con una longitud de 2 a 4 μm y una anchura de 0,5 a 1 μm (Fig 1).

Por lo general, la bacteria presenta forma de espiral, aunque también se puede presentar en forma de varilla. Las formas cocoides aparecen después de períodos prolongados en placa de siembra o bajo tratamiento con antibioterapia invitro. En forma cocoide no se produce crecimiento en placa, ya que se considera una forma de célula muerta (71). Se ha sugerido en la literatura, que las formas cocoides pueden representar una forma viable, pero siendo un estado que no tendrá la capacidad de producir crecimiento en en placa (72).

El organismo tiene flagelos envainados de aproximadamente 3 μm de longitud, que a menudo pueden llevar a un bulbo distintivo en el extremo. Las formas flagelares confieren al microorganismo motilidad y permiten el movimiento rápido en soluciones viscosas, tales como la capa mucosa que recubre las células epiteliales gástricas (73).

A diferencia de muchos otros agentes patógenos del tracto gastrointestinal, carece de adhesinas fimbriales.



Fig. 1: Imagen al microscopio electrónico del H.pylori.

Kenneth E.L. McColl, M.D. Helicobacter pylori Infection. N Engl J Med 2010;362:1597-604

1.3. Requisitos para su crecimiento

Una característica clave del H. pylori, es su capacidad de crecimiento en condiciones de microaerofilia, siendo el ambiente óptimo niveles de O₂ del 2% a 5% y del 5% a 10% de CO₂. Muchos laboratorios utilizan condiciones microaeróbicas estándar de 85% N₂, 10% de CO₂ y 5% O₂ para el crecimiento del H. pylori.

No hay necesidad de H₂, aunque no es perjudicial para su maduración. El desarrollo de la bacteria acontece entre 34 y 40 ° C, con una temperatura óptima de 37 ° C. Aunque su hábitat natural es la mucosa

gástrica ácida, el *H. pylori* se considera un microorganismo neutralófilo. La bacteria sobrevivirá a una breve exposición a valores de pH de menos de 4, pero el desarrollo se produce sólo en el intervalo de pH relativamente estrecho de entre 5,5 y 8,0, siendo óptimo el ambiente a pH neutro (74, 75).

El crecimiento en placa del *H. pylori* es muy exigente y requiere un medio complejo. A menudo, se complementan con sangre o suero (76). Comúnmente se utilizan medios sólidos para el aislamiento y cultivo de rutina del *H. pylori*, como Columbia o Agar Brucella. Para el aislamiento primario y de rutina se siembra con mezclas de antibióticos selectivos, aunque éstos no se requieren per se. El suplemento Dent consta de vancomicina, trimetoprim, cefsoludin, y anfotericina B (77), el suplemento Skirrow (utilizado alternativamente) consta de vancomicina, trimetoprim, la polimixina B, y anfotericina B (78).

El aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de biopsia gástrica es difícil y no siempre se puede realizar con éxito. Las siembras de *H. pylori* deben ser inspeccionadas desde el día 3 al día 14 tras su siembra. El *H. pylori* en placa aparece traslúcido, liso y pequeño (1mm) (79).

Para su subcultivo, el *H. pylori* tiende a adaptarse a las condiciones de crecimiento utilizadas en el laboratorio. Cabe señalar que una vez que la fase de siembra llega a la fase estacionaria, la tasa de crecimiento declina rápidamente. Se produce además el cambio morfológico a una forma cocoide (80). El cultivo prolongado no da lugar a un

aumento significativo de tamaño de las colonias, sino que, conduce a una transición al estado cocoide imposible de crecer en placa. El *H. pylori* se pueden almacenar a largo plazo a -80°C .

1.4. Metabolismo

El *H. pylori* tiene un estrecho abanico de huéspedes y órganos objetivo, pero la infección es habitualmente de por vida. Este hecho sugiere la enorme capacidad de adaptación que la bacteria posee a su hábitat natural: la capa de mucosa que recubre las células epiteliales gástricas. Como consecuencia, el *H. pylori* carece de varias de las vías biosintéticas se encuentran comúnmente en bacterias menos especializadas, como muchas bacterias entéricas (81, 82,83, 84, 85). El *H. pylori* es ureasa, catalasa y oxidasa positivo, características que se utilizan a menudo en identificación de *H. pylori*.

El *H. pylori* puede catabolizar la glucosa, y tanto la información genómica como la bioquímica indican que el *H. pylori* no puede catabolizar otros azúcares (86, 87, 88, 89).

1.4.1. Respiración y defensa frente al estrés oxidativo

El *H.pylori* es una bacteria microaerofílica, por lo que no tolera grandes cantidades de oxígeno, pero requiere al menos un 2% de O_2 (90). En el ser humano, el *H.pylori* está altamente expuesto al estrés oxidativo producido por la respuesta inmunitaria del hospedador. El *H.pylori*

cuenta con varios mecanismos defensivos contra el estrés oxidativo como la catalasa y el superóxido de dismutasa (91,92,93).

1.4.2. *Metabolismo del nitrógeno*

Los aminoácidos y la urea son las dos mayores fuentes de nitrógeno en el medio gástrico. El amonio es un componente clave en el metabolismo del nitrógeno y de la resistencia a los ácidos por lo que es lógico que el *H.pylori* utilice varias fuentes para obtener amonio (94-100).

La vía principal de producción de amonio es a través de la enzima ureasa, que no solo funciona en el metabolismo del nitrógeno sino que también regula la resistencia al ácido. El *H. pylori* produce grandes cantidades de ureasa, y se ha estimado que hasta el 10% del contenido total de proteínas de *H. pylori* está formado por ureasa (101).

1.4.3. *Envuelta celular, membrana externa y lipopolisacáridos (LPS)*

La composición de la envuelta celular del *H. pylori* es similar a la de otras bacterias Gram-negativas. Consiste en una membrana interna (citoplasmática), periplasma con peptidoglicano, y una membrana externa. La membrana externa se compone de fosfolípidos y LPS, contiene además glucósidos de colesterol, poco común en bacterias (69, 256, 618, 619).

1.5. Regulación genética

Los cambios genéticos motivados por las variaciones en las condiciones ambientales, son mediados a través de cambios en la transcripción de un conjunto de genes que codifican el factor implicado en hacer frente a estas tensiones.

El genoma de *H. pylori* contiene sólo 4 sistemas completos de regulación de dos componentes, lo que contrasta fuertemente con la 36 sistemas de dos componentes que se encuentran en la se encuentran, por ejemplo, en la *Escherichia coli* K-12. Como hemos visto, el único nicho conocido del *H. pylori* es la mucosa gástrica humana y se considera que ofrece unas condiciones relativamente estables y una competencia limitada con otras bacterias (106-108).

1.6. Clínica

La colonización de la mucosa gástrica por *H.pylori* no representa una enfermedad en sí misma, pero si es una condición de riesgo para el desarrollo de una serie de desórdenes clínicos del tracto digestivo superior y posiblemente también del tracto hepatobiliar.

Aunque la colonización gástrica por *H. pylori* induce un cambio histológico en la mucosa gástrica en todos los individuos infectados, sólo una minoría muestra signos clínicos aparentes consecuencia de esta colonización. Se estima que los pacientes *H. pylori*-positivos tienen entre un 10% a un 20% de riesgo de desarrollar la una úlcera gástrica y un

riesgo de entre el 1% y el 2% de desarrollar cáncer gástrico (168, 331, 338). El riesgo de desarrollo de estos trastornos depende de las características individuales del microorganismo, del hospedador y de factores ambientales que se relacionan sobre todo con el patrón y la gravedad de la gastritis (Fig2).

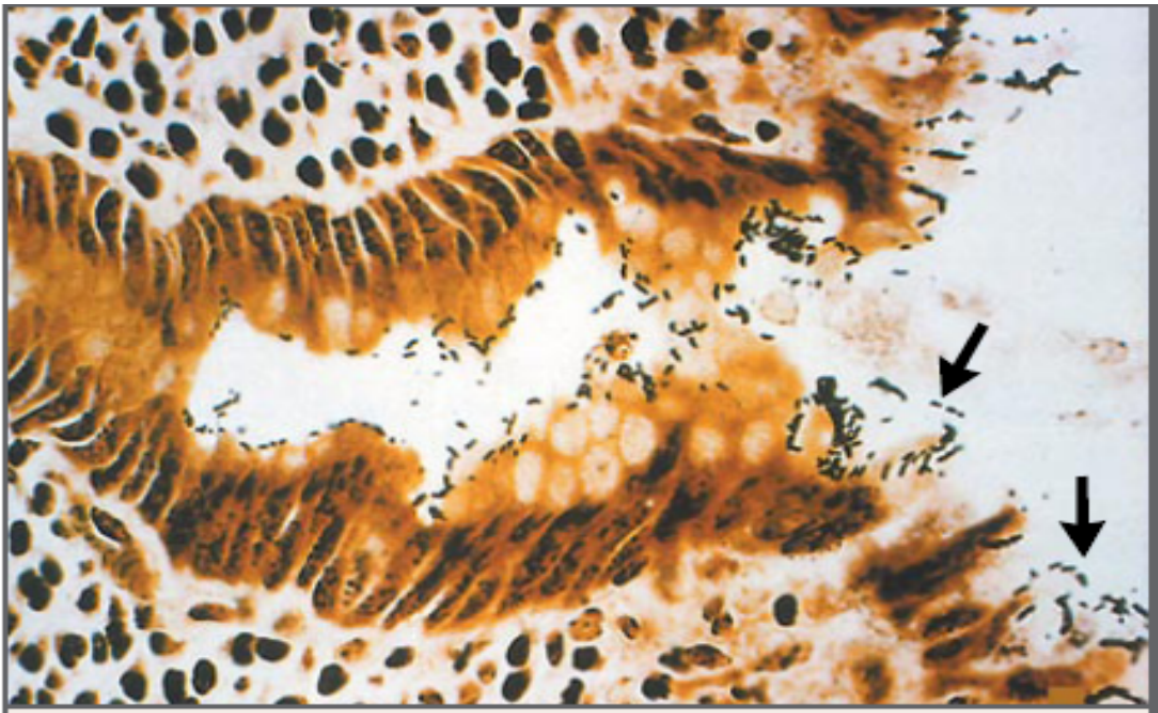


Fig. 2: Imagen de una biopsia gástrica que muestra *H.pylori* adherido al epitelio gástrico y la inflamación subyacente.

Kenneth E.L. McColl, M.D. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med 2010;362:1597-604.

1.6.1. Gastritis aguda y crónica

La fase aguda de la colonización por *H. pylori* puede estar asociada con síntomas inespecíficos transitorios de dispepsia, náuseas, vómitos y con una considerable inflamación de ambos extremos proximal y distal de la mucosa gástrica. Esta fase está a menudo asociada con hipoclorhidria, que puede durar meses. No queda claro en la literatura si esta colonización inicial puede estar seguida por una resolución

espontánea de la misma liquidación y la frecuencia con la que esto podría ocurrir ocurre. (239, 390, 501).

La gastritis crónica activa es el resultado de la colonización primaria por *H.pylori* así como del resto de desórdenes relacionados con la colonización por *H. pylori*.

Cuando la colonización se convierte en persistente, existe una estrecha correlación entre el nivel de secreción de ácido y la distribución de la gastritis. En individuos con la secreción de ácido intacta, el *H. pylori*, coloniza el antro gástrico, donde existen pocas células parietales secretoras de ácido. La evaluación histológica de especímenes del cuerpo gástrico infectado revela una inflamación crónica limitada y un bajo número de *H. pylori* en superficie.

Los individuos en los que la secreción de ácido se ve afectada, debido a cualquier mecanismo, tienen una distribución más uniforme de las bacterias en antro y corpus y las bacterias del corpus están en contacto estrecho con la mucosa dando lugar a una gastritis corpus-predominante.

La reducción en la secreción de ácido puede ser debida a una pérdida de las células parietales como resultado de la gastritis atrófica, pero también puede ocurrir cuando la capacidad de las células parietales está intacta pero la función se inhibe por los ácido-supresores, en particular, los inhibidores de la bomba de protones (IBP) (114).

La inflamación activa resultante más la hipoclorhidria, paralela a la fase aguda de la infección, así como los factores tales como las citoquinas, incluyendo la interleuquina-1 β (IL-1 β), tienen un fuerte efecto supresor sobre la función de la célula parietal.

En la gastritis, se observan tres fenómenos: en primer lugar, la gastritis se asocia con hipoclorhidria que resulta en el aumento de la secreción de ácido (115, 116). En segundo lugar, la gastritis por *H.pylori* aumenta los efectos supresores de los IBP (117). Como resultado de ello, pacientes con enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE) pueden responder algo más rápido al tratamiento con IBP, tanto con respecto a la resolución de los síntomas como en la curación de la esofagitis (118). En tercer lugar, el uso de supresores de ácido en la gastritis de corpus, se basa en un imoportante hallazgo, que muestra que los sujetos con genotipos proinflamatorios tienen un elevado riesgo de gastritis de corpus y los predispone a una gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (119).

1.6.2. Úlcera péptica

Se puede definir la úlcera péptica como un defecto en la mucosa gástrica común de un diámetro de al menos 0,5 cm que penetra a través de la muscularis-mucosae (120). La mayoría de úlceras gástricas ocurren a lo largo de la curvatura menor del estómago, en particular, en la transición de corpus y la mucosa antral. Las úlceras duodenales

generalmente se generan en el bulbo, ya que es la zona más expuesta al ácido gástrico (121).

Tanto la úlcera gástrica como la duodenal están íntimamente relacionadas con la presencia de H.pylori en la mucosa gástrica. Aproximadamente un 95% de las úlceras duodenales y un 85% de las gástricas ocurren por la presencia del H.pylori (122). Varios estudios de cohortes señalan que los sujetos H.pylori positivos tienen de 3 a 10 veces más riesgo de sufrir una úlcera que aquellos negativos por el H. pylori (123). Del 10% al 15% de los sujetos H. pylori positivos desarrollaron una úlcera durante el período de seguimiento (124). Estos datos provienen de estudios en los países de las áreas desarrolladas del mundo.

La Introducción de regímenes de erradicación completa de H.pylori demostraron la relación causal entre el H. pylori y la úlcera, al observar los investigadores que la erradicación de esta bacteria tiene como resultado una fuerte reducción en el riesgo de desarrollo de una úlcera recurrente (125).

Aproximadamente el 50% de los pacientes con úlcera péptica asociada a la presencia de H.pylori sufrieron una úlcera recurrente en el plazo de un año (126,125).

Esta recurrencia en la infección, puede ser debida a una reinfección o a una nueva infección por H.pylori. Existen nichos en donde la bacteria

no puede ser eliminada por la triple o cuádruple terapia y supone una vía de reinfección como puede ser la cavidad oral.

Las complicaciones derivadas de la úlcera péptica incluyen: sangrado, perforación y estenosis.

El sangrado es la complicación más común de la enfermedad de úlcera y se estima que ocurre entre el 15% al 20% de las úlceras. Aproximadamente el 40% de los pacientes con hemorragia digestiva alta tienen una úlcera sangrante. El tratamiento primario para la hemorragia digestiva por úlcera péptica consiste en: terapia endoscópica, destinada a establecer la causa del sangrado; tratamiento de la hemorragia persistente; y estimar y reducir el riesgo de recidiva de la hemorragia. La terapia endoscópica se puede realizar por varios métodos, incluyendo la inyección de adrenalina, la coagulación con una sonda de calor, o la cauterización del vaso sangrante. Posteriormente, está indicada la terapia con IBP (120).

La incidencia de complicaciones por úlcera péptica ha disminuido fuertemente en los últimos 25 años en relación con la prevalencia de *H. pylori* y el tratamiento. Sin embargo, la incidencia de la úlcera sangrante y perforaciones gástricas ha permanecido estable debido a la popularidad y uso indiscriminado de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y la ausencia de protección durante su utilización (127, 128).

El *H.pylori* y los AINES son dos de las mayores causas de úlcera gastroduodenal. Su potencial interacción en la inducción de la enfermedad de úlcera gastroduodenal sigue siendo un área controvertida. Un análisis exhaustivo de los datos de su interacción reveló que los efectos de la de ambos factores de riesgo son acumulativos. La erradicación de *H. pylori* en los usuarios crónicos de AINES disminuye la incidencia de la enfermedad de úlcera (129).

1.6.3. *La dispepsia no ulcerosa*

La dispepsia no ulcerosa o dispepsia funcional se define como la presencia de síntomas en el tracto gastrointestinal superior sin que exista ninguna anomalía estructural identificable. Los síntomas de la dispepsia suelen ser: reflujo gastroesofágico, ardor de estómago y regurgitación. También pueden aparecer problemas de motilidad y náuseas. Estos síntomas son muy comunes y los padecen entre el 20% y el 40% de la población adulta en el mundo occidental. Entre el 30% y el 60% de los pacientes con problemas funcionales como dispepsia pueden estar infectados con *H.pylori*, pero esta prevalencia no es muy diferente a la de la de la población no afectada por dispepsia (130).

El *H. pylori* desempeña un papel en la etiología de los síntomas de la dispepsia, por lo tanto, las estrategias de “test & treat” posteriores son eficaces para pacientes con esos síntomas. Para los pacientes con dispepsia de origen desconocido, una estrategia de “test & treat” sería una opción adecuada, aunque empíricamente el tratamiento con con

antiácidos puede ser más eficiente en poblaciones con un baja prevalencia de *H. pylori* (120).

1.6.4. Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico

Es conocido que la inflamación crónica inducida por *H. pylori* puede conducir a una pérdida de la arquitectura de la mucosa gástrica normal, con destrucción de las glándulas gástricas y fibrosis intestinal. Este proceso de metaplasia y gastritis atrófica e intestinal ocurre en aproximadamente la mitad de los colonizados por *H.pylori* (131).

Las áreas de metaplasia intestinal se extienden con el tiempo multifocalmente, y aunque no dan lugar a ningún síntoma específico, aumentan el riesgo de cáncer gástrico de 5 a 90 veces, dependiendo de la extensión y la gravedad de atrofia (132).

El hecho de que la colonización por *H.pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico vía atrofia y metaplasia, queda probada en varias publicaciones que demuestran que los infectados por *H.pylori* desarrollan este tipo de condiciones en mayor medida que los controles (133).

En base a estos hallazgos, se estimó que la colonización por *H. pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico aproximadamente en 10 veces y el *H. pylori* se designó como carcinógeno de clase I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (134).

También diversos estudios han demostrado que el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico aumenta en pacientes colonizados con cepas CagA positivas (135, 136) y también en aquellos con predisposición genética a una mayor producción de IL-1 en respuesta a la colonización (137).

El cáncer gástrico es el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo y aunque la incidencia en países occidentales ha ido disminuyendo paulatinamente junto con la tasa de infección por H.pylori, esta sigue siendo muy elevada en grandes áreas del mundo, particularmente en las regiones de Asia Oriental y América del Sur (138).

1.6.5. Linfoma gástrico (MALT)

La mucosa gástrica no contiene normalmente tejido linfoide asociado a ella (MALT), pero el MALT aparece en respuesta a la colonización por H. pylori. En algunos casos, una población de células B monoclonales pueden surgir de este tejido y proliferar para formar un linfoma MALT. Los criterios para el diagnóstico del linfoma MALT y la diferenciación con infiltrados reactivos policlonales siguen siendo controvertidas. Casi todos los pacientes con linfoma MALT son H. pylori positivo (139), y los sujetos H. pylori-positivos sufren un aumento significativo de riesgo de desarrollo de Linfoma gástrico MALT (140). Debido a las controversias diagnósticas y la relativa rareza de esta enfermedad, la incidencia exacta en sujetos H. pylori positivos se desconoce, pero los linfomas MALT pueden ocurrir en menos de 1% de los sujetos positivos para H. pylori (141).

En general, aproximadamente entre un 60% y un 80% de estos pacientes llegan a la remisión completa del MALT después de la erradicación de *H. pylori* pero un 10% siguen teniendo signos de enfermedad residual. El resto no muestran progresión de la enfermedad. La variación en la respuesta puede en parte deberse a diferentes criterios para el diagnóstico del linfoma MALT (142).

1.6.6. Reflujo gastroesofágico (ERGE)

El ERGE se ha considerado siempre independiente de la colonización por *H. pylori*. Se puede producir con la misma frecuencia y gravedad en pacientes *H. pylori* positivo y *H. pylori* negativo. Esta opinión está basada en observaciones de corte transversal que sugieren que la prevalencia de *H. pylori* entre los pacientes con ERGE fue similar a la de los controles (143).

Otros estudios incluso sugieren que el *H. pylori* podría proteger contra el desarrollo de la ERGE y por ello su presencia podría ser beneficiosa para el hospedador. Este concepto emergente ha aparecido a partir de observaciones repetidas de una baja prevalencia de *H. pylori* entre los pacientes de ERGE, particularmente cepas más virulentas (144) y también se ha observado un posible aumento de la incidencia de la ERGE después de la erradicación de *H. pylori* (145).

Aunque los datos epidemiológicos sugieren que puede haber una relación inversa entre *H. pylori* y la ERGE, el riesgo para el nuevo

desarrollo o empeoramiento de la ERGE preexistente no es un problema en la decisión para iniciar el tratamiento contra el *H. pylori*.

1.6.7. Desórdenes extragástricos

Como hemos visto en los puntos anteriores, el *H. pylori* está asociado a varias patologías gastrointestinales, pero también ha sido relacionado con patologías fuera del sistema gastrointestinal (SG).

1.7. Manifestaciones hematológicas

Los bajos niveles de hierro, supone la deficiencia nutricional más común y causa de la anemia (146). La anemia ferropénica (AF) afecta a entre el 2% y 5% de los adultos en el mundo desarrollado, siendo la hemorragia gastrointestinal la causa más probable (147). Además, la AF se observa entre el 5% y el 12% de mujeres premenopáusicas sanas (148), en relación con la pérdida de sangre menstrual y el aumento de las necesidades de hierro durante embarazo (149).

El vínculo entre *H. pylori* y la AF está bien documentada en la literatura. El primer caso fue publicado en 1991 por Blecker et al (150). Describe a una niña de 13 años con AF relacionada con gastritis crónica activa por *H. pylori* positivo. Los niveles de hemoglobina se normalizaron con la erradicación de la *H. pylori* y sin suplementación de hierro (150).

Estudios posteriores han descrito casos similares en los adultos (151, 152). Cuatro metanálisis de ensayos controlados han apoyado esta

asociación y también han sugerido que el *H. pylori* puede interferir en la absorción de hierro (153, 154).

H. pylori causa la AF por varios mecanismos. Puede ocurrir por hemorragia activa causada por gastritis, úlcera péptica o cáncer gástrico (155).

La infección por *H. pylori* ha sido bien estudiada en relación a la AF. Las directrices de la Sociedad Británica de Gastroenterología, recomienda la erradicación de *H. pylori* en pacientes con AF recurrente con colonoscopia y endoscopia gástrica normales (156). Además, las recientes Directrices de Maastricht sugieren la erradicación en todos los pacientes con AF inexplicable (157).

1.7.1. Púrpura trombocitopénica Inmune (PTI)

La Púrpura trombocitopénica inmune se define como un trastorno autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las plaquetas (158). Está demostrado que la infección por *H. pylori* es una causa de PTI secundaria. La prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes con PTI es mayor que en sujetos con la misma edad y género pero libres de infección por *H. pylori* (155).

Gasbarrini et al (158), informaron en 1998 por primera vez de esta asociación. Se observó un aumento significativo en el recuento de plaquetas en pacientes con PTI tras la erradicación del *H. pylori*. Este efecto fue confirmado en varios informes posteriores y que se resumen

en una revisión sistemática de 24 estudios observacionales y 1 estudio de control de participación de 1.555 pacientes. Stasi et al (159) encontraron que en el 50% de los pacientes hubo respuesta plaquetaria tras la erradicación de *H. pylori*, especialmente en aquellos con leve PTI.

El pronóstico a largo plazo de la PTI relacionada con *H.pylori* es excelente. En un seguimiento de 8 años tras la erradicación de *H.pylori* no se observó ninguna recurrencia (160).

No hay mecanismo probado sobre el papel de Infección por *H. pylori* en la patogénesis de PTI. La inducción de la agregación plaquetaria a través del factor de von Willebrand por ciertas cepas de *H. pylori* fue demostrada en varios estudios (161). Los anticuerpos contra *H. pylori* CagA, proteínas y antígenos plaquetarios también se han relacionado (162).

La actividad de los monocitos y los macrófagos contribuyen a la patogénesis antiplaquetaria (163).

En resumen, los estudios hasta la fecha apoyan la detección y la erradicación de *H. pylori* en la PTI. Las directrices que sugiere la Sociedad Americana de Hematología indican la erradicación del *H.pylori* en pacientes con PTI (158).

1.8. Manifestaciones cardiopulmonares

1.8.1. Enfermedad de la arteria coronaria (EAC)

Los factores de riesgo conocidos para la enfermedad arterial coronaria (EAC) tales como diabetes, hipertensión, dislipidemia, obesidad y el tabaquismo contribuyen a la aterosclerosis (164). La inflamación crónica también es un factor de riesgo para la aterosclerosis (165).

La inflamación derivada de las infecciones crónicas, incluyendo *H. pylori* han sido estudiadas, sin embargo, su papel en la EAC es conflictiva.

En 1994, Mendall et al, (166) en un estudio de casos y controles observaron una asociación entre EAC y *H. pylori* que fue apoyado por los estudios posteriores tras la realización de una angiografía (167). La erradicación de *H. pylori* atenuó la reducción de la luz de la arteria después de la angiografía (168), lo que sugiere un beneficio con el tratamiento. Rogha et al (169) identificaron el *H. pylori* como un factor de riesgo independiente de EAC para una población iraní. Además, hay evidencia de asociación *H. pylori* tanto para la aterosclerosis temprana (170) como avanzada, específicamente para las cepas CagA (171, 172).

Por el contrario, también hay publicaciones que no apoyan dicha asociación. Estudios como los de Danesh et al (173) o los de Padmavati et al (174) no encontraron una asociación entre EAC y *H. pylori*.

Una publicación alemana, no encontró asociación entre la infección por *H. pylori*, gastritis crónica atrófica y eventos cardiovasculares (175).

Existen diferentes mecanismos propuestos para vincular el *H. pylori* a EAC. El *H. pylori* se encontró en cantidades sustanciales en las placas ateroscleróticas de las carótidas, por lo tanto lo propusieron como un patógeno directo contra la pared del vaso (176).

Tamer et al (177) sugirieron que el *H. pylori* puede causar la aterogénesis a través de la actividad inflamatoria persistente.

El mimetismo molecular entre el antígeno CagA y los péptidos de la placa aterosclerótica podría significar un posible enlace patogénico (178).

Existe evidencia de la modificación del metabolismo de los lípidos por la infección por *H. pylori* (179), con los resultados de un estudio que demuestra un aumento de los niveles de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad-colesterol (LDL-C) en pacientes infectados (180).

En conclusión, aunque los resultados son controvertidos, hay evidencia de relación entre CAD y *H. pylori*. Los mecanismos propuestos son plausibles, sin embargo, los resultados globales no son concluyentes.

1.8.2. Asma (A)

Se ha producido un aumento de la prevalencia de asma y otros trastornos atópicos durante los últimos años (181). Los estudios que se

centran en la hipótesis de motivos higiénicos frente a enfermedades alérgicas, establece que la exposición a ciertos agentes infecciosos pueden ser protectores frente al desarrollo de nuevas enfermedades alérgicas (182).

Como resultado de estas hipótesis, se ha observado una asociación negativa entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de asma. Estudios realizados en niños y adultos (183, 184) han demostrado una menor prevalencia de *H. pylori* en los pacientes asmáticos. El mecanismo patogénico de este efecto protector es la capacidad del *H. pylori* para estimular el linfocito tipo T-helper 1 (Th1) en la respuesta inmune. Esto promueve la infección persistente pero confiere protección contra el asma.

Por el contrario, existen otros estudios que han informado de una neutralidad en la asociación e incluso asociaciones positivas entre la infección por *H. pylori* y el asma (186, 187).

Se han realizado diversos metanálisis recientes para aclarar estos resultados controvertidos. Wang et al (188) revisó 19 estudios y encontró una débil asociación inversa entre el asma y la infección por *H. pylori*. Del mismo modo, Zhou et al (189) encontraron una tasa significativamente menor de infección por *H. pylori* en los asmáticos en una revisión de 14 estudios.

Esta relación inversa esta bien apoyada en la literatura científica, especialmente en el asma infantil. Sin embargo, se necesitan estudios con muestras de mayor tamaño a fin de aclarar esta asociación.

1.9. Manifestaciones metabólicas

1.9.1. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico

El síndrome metabólico (MS) incluye varios factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2, tales como hiperglucemia, dislipidemia, la obesidad e hipertensión (190).

La Resistencia a la insulina (IR) es un factor patogénico clave en MS (191). El papel de la infección por *H. pylori* en la patogénesis de la MS e IR se ha estudiado, pero sigue siendo controvertido.

Los estudios epidemiológicos han apoyado un vínculo entre MS, IR e infección por *H. pylori* (192-195). Los hipotéticos mecanismos fisiopatológicos, incluyen: la activación de sustancias proinflamatorias y sustancias vasoactivas (196).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se ha propuesto que el tratamiento de la infección por *H. pylori* podría prevenir contra la enfermedad de arteria coronaria y MS (197). Una revisión sistemática de 9 estudios realizado por Polyzos et al (196) sugiere una tendencia hacia una asociación positiva entre la infección por *H. pylori* y II IR. Es destacable la gran heterogeneidad de resultados existente entre los estudios revisados.

Por el contrario, otros estudios no han encontrado relación entre la infección por H.pylori con IR o EM (70-72).

Un metaanálisis de 18 estudios en el que incluyeron a 10.000 pacientes no encontró relación significativa entre H. pylori y las cifras de colesterol total y triglicéridos. Naja et al (201) estudiaron la asociación entre la infección por H. pylori e IR y MS en una población libanesa. No encontraron ninguna asociación entre ellas y llegaron a la conclusión de que la terapia de erradicación del H. pylori para prevenir IR y MS no estaba justificada. Además, Lu et al (202) no encontraron ningún cambio en los niveles de glucemia en ayunas o de los lípidos después de la erradicación de H. pylori, en un estudio prospectivo que incluyó a 48 pacientes.

Es evidente que hasta el momento los estudios disponibles arrojan resultados contradictorios. Serían necesarias más investigaciones acerca de dicha asociación.

1.9.2. Diabetes Mellitus Tipo 2

Está documentado que los marcadores de la inflamación se asocian con la diabetes tipo 2 (DT2) (203-205). Las infecciones crónicas con diversos patógenos han sido señaladas como los factores que contribuyen a este estado inflamatorio. Los estudios iniciales, utilizando análisis transversales, no apoyaron esta asociación (206-208). Específicamente, en infecciones con Chlamydia pneumonia, H. pylori,

citomegalovirus, herpes simples virus y / o hepatitis A no se pudo comprobar que estuviesen asociadas con la resistencia a la insulina o diabetes (207, 208).

Por el contrario, existen publicaciones que apoyan esta asociación (209). Un meta-análisis de 41 estudios observacionales con 14.080 pacientes encontró una alta prevalencia de H. pylori en pacientes con diabetes, especialmente tipo 2 (210). Un estudio prospectivo reciente de 768 pacientes sometidos a seguimiento durante 10 años, encontró que la seropositividad por H. pylori se asociaba con una mayor tasa de incidencia de diabetes (211).

El H. pylori también se ha relacionado con microalbuminuria, que es un fuerte predictor del desarrollo de la diabetes (212). Chung et al (213) llevaron a cabo un estudio transversal en 2.716 pacientes coreanos y encontraron que la seropositividad a H.pylori estaba asociada con la microalbuminuria.

Actualmente a la vista de los resultados, se necesitan estudios prospectivos de mayor entidad para aclarar los hallazgos recientes. Si la infección por H. pylori es un factor etiológico para la diabetes, la terapia de erradicación de H.pylori estará justificada para evitar el devastador resultado del mal control glucémico.

1.10. Manifestaciones neurológicas

Accidente cerebrovascular isquémico (ACV). El accidente cerebrovascular isquémico representa aproximadamente el 50% de todos los tipos de accidentes cerebrovasculares. Las patologías inflamatorias e infecciones crónicas han sido consideradas factores de riesgo en el de ictus (214).

El *H. pylori* ha sido considerado como un factor de riesgo, sin embargo los resultados son controvertidos.

Whincup et al (215) publicaron en 1996, la posible asociación, sin embargo, la relación se debilitó considerablemente después del ajuste de varios factores de riesgo importantes.

Markus et al (216) publicaron la existencia de la asociación entre ACV y *H. pylori*, debido a la reducción de la luz de las arterias de pequeño calibre.

Por el contrario, Ashtari et al (217) no observaron asociación entre la seropositividad y ACV en un estudio de casos y controles. Por su parte, Ridker et al (218) tampoco encontraron asociación entre la presencia de *H.pylori* y la concurrencia de eventos cardiovasculares.

En aquellos estudios donde se han hallado relación positiva entre ACV y *H. pylori*, se demostró una mayor prevalencia de la cepa CagA (219, 220).

A la vista de los estudios analizados, la relación entre *H. pylori* y ACV, es controvertida pero se ha encontrado suficiente evidencia científica para certificar su existencia.

1.10.1. *Parkinson*

Antes del descubrimiento del *H. pylori*, se habían observado un exceso de úlceras pépticas en pacientes con enfermedad de Parkinson (221). Altschuler (222) fue el primero en sugerir una posible relación causal en 1996.

En publicaciones recientes se ha propuesto que el daño neuronal provocado por la enfermedad de Parkinson puede ser una respuesta a la infección crónica por *H. pylori* (223).

En un estudio controlado, aleatorio a doble ciego, Bjarnason et al (224) encontraron que la erradicación de *H. pylori* había cambiado el curso de la enfermedad. Pierantozzi et al (225) encontraron que el éxito en la terapia de erradicación del *H. pylori* mejoraba la farmacocinética y la respuesta clínica a la L-dopa mediante el aumento de la absorción de la misma. Esto podría ser debido a la resolución de gastroduodenitis causada por *H. pylori*.

La aparición anticuerpos CagA en suero del paciente puede ser predictivo de la enfermedad de Parkinson y se asocia con un mal pronóstico (226).

1.10.2. Enfermedad de Alzheimer

Las infecciones se han propuesto como un factor de riesgo para las enfermedades con deterioro cognitivo como la demencia y la enfermedad de Alzheimer (AD). La infección por *H. pylori*, junto con el virus del Herpes simple, Picornavirus, virus de Borna, Chlamydia, neumonía e infecciones por Espiroquetas han sido propuestas en la literatura como factores de riesgo (227).

Kountouras et al (228) informaron de una mayor prevalencia de la infección por *H. pylori* en la población griega con AD. Esto fue apoyado por una mayor prevalencia de antígenos contra *H.pylori* en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con AD (229). Después de 2 años de seguimiento, los parámetros cognitivos y funcionales mejoraron en los pacientes donde *H. pylori* se llevó a cabo la terapida de erradicación con éxito (230).

De momento son pocos los experimentos que han demostrado la mejoría en los síntomas en los pacientes en los que el *H.pylori* ha sido erradicado con éxito por lo que, se necesitan más estudios para certificar esta asociación.

1.10.3. Migrañas

Las migrañas son un trastorno neurológico común caracterizado por episodios recurrentes de dolor de cabeza intenso y asociados síntomas como sensibilidad a la luz o al sonido.

Un cuarto de los pacientes sufren migraña acompañada auras (231), un fenómeno, por tanto, neurológico que incluye alteraciones sensoriales y motoras.

Las teorías contemporáneas de la fisiopatología de la migraña apuntan hacia una disfunción neuronal primaria, en lugar del modelo tradicional de la vasoconstricción y vasodilatación (232, 233). Aunque la etiología exacta continúa siendo desconocida, los factores genéticos y ambientales se han asociado con las migrañas crónicas (234). Entre ellos, infecciones crónicas, como *H. pylori* se ha relacionado sobre todo en aquellos pacientes con migrañas sin aura (235).

Entre los pacientes con migrañas, diferentes estudios han demostrado una mayor prevalencia de infección por *H. pylori*.

Un estudio encontró una mayor prevalencia de la migraña en pacientes infectados con *H. pylori*, diagnosticadas por prueba de aliento. Del mismo modo, usando la serología como método diagnóstico, se encontró que los pacientes con IgG positiva para *H. pylori* mostraron un mayor índice de migrañas que los controles (237).

Varios estudios demostraron que tras la terapia de erradicación de *H. pylori*, una proporción significativa de los pacientes con migraña refirieron no haber padecido más dolores de cabeza o la reducción en la gravedad de los síntomas (236-238).

Gasbarrini et al (236) en su publicación reportaron la completa resolución de los dolores de cabeza en el 17% de los pacientes y que todos los pacientes mejoraban sus síntomas tras la terapia de erradicación de H. pylori.

Una vez confirmada la erradicación del H.pylori, utilizando la prueba de antígenos en heces, otro estudio encontró una mejoría significativa en severidad de la clínica de la migraña en el 84% de los pacientes (238).

Por contra, otros estudios no han mostrado un aumento significativo de la infección por H. pylori en los pacientes con migrañas.

Un primer estudio de casos y controles italiano comparó la tasa de infección por H. pylori mediante la prueba de serología y aliento y no encontró una diferencia significativa en la prevalencia de la infección entre los que sufren de migraña y los controles (239).

Dos estudios de migrañas en niños tampoco encontraron un aumento significativo de la infección por H. pylori en las pruebas de aliento (240) o por muestras de biopsia (241).

En resumen, la presencia de infección por H. pylori parece estar asociado con la severidad de los ataques de migraña como han demostrado múltiples estudio. Sin embargo, la asociación en términos de prevalencia arroja datos conflictivos. Se requieren más estudios para establecer un vínculo firme, con mayores estudios epidemiológicos, así como ensayos aleatorios a doble ciego.

1.11. Manifestaciones dermatológicas

1.11.1. Urticaria espontánea crónica

Urticaria espontánea crónica (CSU) se define como la aparición de forma espontánea de una pápula y/o angioedema con duración de más de 6 semanas (242). CSU afecta hasta el 1% de la población general (243, 244). Existe otro tipo de urticaria cuya etiología permanece indeterminada en el 80% -90% de los pacientes y se denomina urticaria idiopática crónica (CIU) (128).

Se ha reportado la asociación entre *H. pylori* y la CSU pero su relación es controvertida.

Fukuda et al (246) encontraron que entre un grupo de pacientes *H. pylori* positivos con CSU, existió una mejora significativa tras el tratamiento de erradicación de *H. pylori*. Esto fue apoyado por un revisión sistemática de 10 estudios de Federman et al (247).

Por el contrario, Daudén et al (248) no mostraron asociación en un estudio de casos y controles de 25 pacientes. Moreira et al (249) tampoco lograron demostrar la asociación. Sin embargo, se encontró que aquellos pacientes con clínica de la CSU tenían mayores concentraciones de *H. pylori* en la prueba de la urea, lo que sugiere que la cantidad de *H. pylori* en la colonización influye en la patogénesis de CSU.

Un reciente estudio prospectivo realizado por Chiu et al (250) está a favor de una asociación global entre *H. pylori* y CSU. Curiosamente, ninguna asociación significativa fue encontrada con genotipos virulentos de *H. pylori* (CagA, VacA).

En resumen, los estudios son controvertidos sin embargo, los estudios más recientes demuestran que existe relación entre *H.pylori* y CSU. Los genotipos y las cepas virulentas de *H. pylori* no parecen ser tener influencia en esta asociación.

1.11.2. Rosácea

La rosácea es una condición dermatológica crónica caracterizada por eritema facial central persistente con presencia de telangiectasias. También pueden darse otras lesiones similares al acné así como síntomas oculares asociados en la rosácea ocular (251).

A partir de estudios epidemiológicos, los países del norte de Europa y los de orígenes celtas parecen estar en mayor riesgo de rosácea. Se estima que la prevalencia de la rosácea es del 1% al 10% en poblaciones de piel clara (252).

Los estudios sugieren una relación entre *H. pylori* y la rosácea por el aumento de la seroprevalencia en pacientes con rosácea (253, 254).

Muchos estudios han reportado resultados contradictorios con el grado de correlación entre *H. pylori* y la rosácea. Mientras que algunos

estudios han demostrado una mayor prevalencia de *H. pylori* en la rosácea, algunos estudios no lo han conseguido (255,256, 257).

Estudios más recientes demuestran una mejora significativa en la gravedad de la rosácea en pacientes *H. pylori* positivos tras el tratamiento de erradicación recibido (258-260).

La rosácea como manifestación extraintestinal de *H. pylori* requiere más estudios de investigación, sin embargo, a pesar de conflicto datos de prevalencia, el tratamiento de erradicación en los que tienen tanto rosácea y *H. pylori* parece ser beneficioso en la reducción gravedad de la enfermedad de la piel.

1.12. Otras manifestaciones

1.12.1. Fibromialgia

La fibromialgia (FM) es un trastorno de dolor común caracterizada por mialgias crónicas y artralgias sin evidencia clínica de inflamación del tejido. La etiología del dolor se desconoce; sin embargo, estudios fisiopatológicos actuales se han centrado en el papel de una alteración del sistema nervioso central en el procesamiento del dolor (261, 262).

Las infecciones se han relacionado con la patogénesis de FM y han sido encontradas asociaciones temporales con la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, y la enfermedad de Lyme (263).

La infección por *H. pylori* parece estar asociada con la FM. Un estudio casos y controles en Egipto encontró elevadas tasas de IgG por *H. pylori*

en mujeres con FM en comparación con los controles (264) Además, entre los Pacientes con FM, aquellos con serología positiva tienen peores síntomas medidos por el Cuestionario de Impacto de Fibromialgia (264).

Otro estudio de casos y controles también encontró un aumento significativo en la prevalencia serológica en las mujeres con FM comparación con los controles (265).

Por contra, un estudio de casos-contrales reciente no encontró diferencia en la prevalencia serológica entre los pacientes de fibromialgia y los controles (266).

Debido a los resultados contradictorios, se requieren más estudios antes de poder afirmar que existe un vínculo ente FM y H.pylori.

1.13. Diagnóstico y tratamiento

1.13.1. Diagnóstico

Un gran número de métodos están disponibles para la detección de H. pylori. Existen métodos invasivos, como la endoscopia digestiva que obtiene tejido gástrico para histología o métodos no invasivos como la prueba rápida de la ureasa, la prueba de antígenos presentes en heces, la PCR o el crecimiento en placa. Vamos a ver de forma detallada cada uno de ellos.

1.13.2. Los métodos no invasivos

La prueba rápida de la ureasa o la prueba de antígenos fecales son los métodos preferidos para la detección de la infección activa (267).

El prueba del aliento o prueba rápida de la ureasa (UBT), consiste en una bebida que contiene urea marcada con carbono-13 o carbono-14. El radiomarcador ingerido de carbono es convertido en dióxido de carbono y amoníaco por la ureasa del *H. pylori*. El dióxido de carbono es absorbido en el torrente sanguíneo y se espira por la respiración. Se toma una muestra de aire espirado y se analiza la presencia del carbono marcado. La prueba también tiene la ventaja de identificar la infección activa. La sensibilidad y la especificidad de la prueba de UBT es del 99% y 98%, respectivamente (268).

En las heces también se puede detectar la presencia de *H. pylori* mediante la detección de antígenos, utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales. La prueba utilizaba inicialmente un proceso de ELISA, pero se ha modificado en un ImmunoCard, que es útil para clínicas de pequeño tamaño y pruebas de campo en los países del tercer mundo. La sensibilidad y especificidad para la prueba es del 94,1% y 91,8%, respectivamente. La prueba de heces también es más económica que la endoscopia para la confirmación de la erradicación. La recogida de la muestra puede ser una limitación de para algunos pacientes, pero es adecuado para los pacientes infantiles (269, 270).

Los inhibidores de la bomba de protones y antagonistas de los receptores H2 deben ser retirados varios días antes de la prueba UBT o heces, debido a la posible generación de falsos negativos. De igual modo, los antibióticos tomados durante las cuatro semanas antes de la prueba pueden producir falsos negativos. Algunos estudios sugieren esperar hasta 8 semanas post-tratamiento para mejorar la exactitud de la prueba (269).

Las pruebas serológicas para la detección del *H. pylori* son ampliamente accesibles y son relativamente económicas. Las placas microtiter recubiertas con antígenos para *H. pylori*, en combinación con un anticuerpo secundario, se utilizan para detectar la IgG específica del *H. pylori*.

Los resultados de la serología no se ven afectados por la terapia de supresión ácida o el reciente uso de antibióticos, sin embargo, la seropositividad no es una confirmación de infección actual *H. pylori*. Del mismo modo, la serología no puede ser utilizada para confirmar curación tras una terapia de erradicación ya que los anticuerpos permanecen durante un período de hasta 6 meses postinfección. La sensibilidad y la especificidad de la serología para la detección de la infección inicial comparada con el estándar de oro de la histología tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 79% (271).

1.13.3. Los métodos invasivos

Se requiere la realización de una endoscopia para obtener una muestra de tejido gástrico y así evaluar en grado de patología en el tejido gástrico.

Las tinciones de Giemsa, Warthin-Starry, y Diff-Quik, además de hematoxilina y eosina se utilizan para identificar *H. pylori*. Las tinciones de Giemsa proporcionan la identificación de las bacterias, evalúan la inflamación, y también proporcionan evidencia de metaplasia intestinal. Ninguna otra prueba permite la identificación de la metaplasia intestinal.

Es necesario tomar muestras gástricas de al menos tres zonas para obtener el mejor diagnóstico. Ha de incluir, angularis, la curvatura mayor del corpus y la curvatura del antro.

El alto costo de la infraestructura, la variabilidad de opinión del patólogo y la necesaria alta capacitación del personal son las limitaciones que impiden a este método de ser considerado como estándar para el diagnóstico (272, 273).

La siembra en placa ofrece una alta especificidad para el diagnóstico de *H. pylori*, sin embargo, a menudo carece de la sensibilidad de otros métodos invasivos. Desde un punto de vista práctico, las técnicas de siembra son técnicamente difíciles y costosas. El *H. pylori* es un organismo extremadamente delicado, que requiere, para su

crecimiento, un ambiente microaerofílico y de 7 a 10 días para formar colonias visibles en medios sólidos. El personal del laboratorio debe sembrar las muestras a la mayor brevedad posible y evitar la exposición prolongada a niveles de oxígeno del ambiente para maximizar la supervivencia del organismo. La siembra en placa es interesante para realizar antibiograma, aunque como posteriormente veremos las técnicas moleculares poco a poco irán sustituyendo a estas como estándar oro.

Las técnicas de PCR son utilizadas para detectar el ADN de *H. pylori*, siendo la técnica más fiable en muestras de biopsia. Puede obtenerse una sensibilidad y especificidad del 100% (274). Las contaminaciones en los endoscopios inadecuadamente higienizados pueden crear falsos positivos. Los falsos negativos pueden ocurrir debido a los inhibidores de la PCR dentro del tejido gástrico, heces o saliva.

1.13.4. Conclusiones

La elección de la prueba diagnóstica óptima para determinar el estado de la infección por *H.pylori*, depende de la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, coste, disponibilidad y rapidez en la obtención de los resultados (275).

Exista la evidente necesidad de contar con un método de referencia que será utilizado como "estándar oro" para encontrar dónde reside de forma indudable la infección. Desafortunadamente, ninguno de los

métodos utilizados en la actualidad es capaz de ofrecer un 100% de efectividad. La solución se encuentra en combinar varios resultados de dos o más técnicas y comparar los resultados de cada método.

Los resultados con la técnica de PCR pueden ser ligeramente superiores en comparación con otros métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *H. pylori*, especialmente, para verificar la erradicación de *H. pylori* después del tratamiento (275, 276).

La técnica de PCR se considera como un método altamente sensible para detectar el ADN de *H. pylori* partir de diferentes muestras clínicas (277,278,279) y proporciona una información muy útil relativa a la presencia de genes que codifican factores de virulencia específicos y resistencia a los antibióticos (280). Tanto la sensibilidad y especificidad de la PCR se encuentran cerca del 100% (281).

La PCR también puede generar problemas como los falsos positivos por contaminaciones cruzadas y la detección de ADN de bacterias muertas (275).

La baja tasa de positividad de la siembra en placa (69%) puede ser debido a: las exigentes condiciones del *H.pylori* para crecer en medios sólidos, a la presencia de formas cocoides no cultivables, la ausencia de microorganismos en las muestras de biopsia gástrica, la pérdida de viabilidad de la bacteria durante el transporte, por la contaminación con otros microorganismos o por tratamiento con antibióticos (282, 283).

A pesar de que la técnica de PCR puede ser utilizada como estándar de oro, el método que se propuesto dependerá de los métodos diagnósticos disponibles. Si no existen instalaciones para la realización de endoscopia, el kit de detección de anticuerpos monoclonales en muestras de heces es un método correcto, tan correcto como la UBT o la serología, que aunque no es útil para diferenciar la infección activa, puede ser la mejor opción en niños.

Podemos ver en la *tabla 1* un cuadro resumen de las diferentes técnicas con sus ventajas y desventajas.

Test	Ventajas	Desventajas
<i>No invasivos</i>		
Serología	Fácilmente accesible, barato	El resultado positivo puede ser de una infección pasada. No recomendado para confirmar la erradicación
Prueba de aliento (UBT)	Altos valores predictivos positivos y negativos. Útil antes y después del tratamiento.	En pacientes tratados con inhibidores de la bomba de protones (IBP), antibióticos o bismuto puede dar falsos negativos. Muchos recursos y personal para poder realizar el test.
Test de antígenos en heces	Altos valores predictivos positivos y negativos, con el test de anticuerpos monoclonales. Útil antes y después del tratamiento.	Proceso de toma de muestra desagradable para algunos pacientes. Pueden darse falsos negativos si el paciente ha sido tratado con IBP, antibióticos o preparados de bismuto.
<i>Invasivas</i>		
Tests basados en la ureasa	Rápida, barata y precisa en pacientes seleccionados.	En pacientes tratados con inhibidores de la bomba de protones (IBP), antibióticos o preparados de bismuto

		puede dar falsos negativos
Histología	Buena sensibilidad y especificidad.	Requiere de personal capacitado.
Siembra en placa	Excelente especificidad; ofrece la posibilidad de realizar el test de sensibilidad a los antibióticos.	Sensibilidad variable. Requiere personal capacitado e instalaciones debidamente equipadas.
PCR (biopsia gástrica)	Alto valor predictivo positivo y negativo. Útil antes del tratamiento. Rápida y económica.	No distingue entre bacterias vivas y muertas. Requiere equipamiento y personal entrenado. Inhibiciones en heces.

Tabla 1. Cuadro resumen de los diferentes tipos de pruebas diagnósticas y sus principales ventajas y desventajas.

Elaboración propia en base al cuadro del artículo, Kenneth E.L. McColl, M.D. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med 2010;362:1597-604.

1.14. Tratamiento

Existen en la actualidad, varias opciones para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, sin embargo, no se ha definido un único tratamiento óptimo.

Históricamente, las combinaciones de varios antibióticos han sido utilizadas para erradicar la infección. Los antibióticos utilizados incluyen claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, fluoroquinolonas, tinidazol, y otros. Estos antibióticos se utilizan habitualmente en combinación con agentes antiácidos, como los IBP o las sales de bismuto.

La eficacia de las terapias más comúnmente utilizadas se ha visto comprometida por la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos y por la mala adherencia al tratamiento de los pacientes.

Estos factores combinados han reducido la eficacia del tratamiento a niveles menores o iguales al 80% en muchas áreas geográficas (284)

En consecuencia, han sido aprobadas nuevas estrategias de tratamiento para sustituir a la triple terapia estándar. Estas nuevas combinaciones, han sido utilizadas en áreas con una alta prevalencia de cepas resistentes a la claritromicina, que es el factor de riesgo más importante para el fracaso de los regímenes de tratamiento (285).

La resistencia a amoxicilina se ha mantenido relativamente estable, mientras que la resistencia a metronidazol y claritromicina ha ido en constante aumento. La prevalencia de la resistencia a los antibióticos varía considerablemente según la región de estudio y se relaciona con el uso de antibióticos, tales como claritromicina y metronidazol, para las infecciones respiratorias o gastrointestinales (284).

Una de las primeras estrategias desarrolladas para el tratamiento de la infección por *H. pylori* fue la estrategia "test-and-treat".

Esta terapia está indicada para pacientes menores de 45 años de edad con dispepsia persistente, úlcera péptica, MALT de bajo grado, y gastritis atrófica. La estrategia test-and-treat se basa en la determinación de la existencia de *H. pylori* y su erradicación cuando se detecta.

Actualmente se recomienda dividir el tratamiento empírico de primera línea en dos grandes grupos: las poblaciones con baja y con altas tasas

de resistencia a la claritromicina. Para estos grupos, los niveles de resistencia aceptables se establecen en porcentajes del 15% al 20% (291).

1.14.1. Tratamientos de primera línea en áreas con baja resistencia a la claritromicina

La estrategia de erradicación más utilizada es la terapia triple. Esta terapia se compone de un inhibidor de la bomba de protones (PPI) (lansoprazol 30 mg / 12 h, omeprazol 20 mg / 12 h, pantoprazol 40 mg / 12 h, rabeprazol 20 mg / 12 h, o esomeprazol 40 mg / 24 h), más antibioterapia, claritromicina (500 mg / 12 h) y amoxicilina (1 g / 12 h), tomada de 7 a 14 días. El tiempo de duración de la terapia es controvertido. Un reciente meta-análisis sugiere que, terapias de 14 días de duración proporcionan tasas de erradicación un 5% más altas que las de 7 días. En casos de alergia a la penicilina, el metronidazol es una opción para sustituir la amoxicilina, ya que es igualmente eficaz se consideran equivalentes (292).

Una pobre adherencia por parte del paciente, la acidez gástrica, la concentración de cepas bacterianas, las mutaciones bacterianas y la resistencia a la Claritromicina, son las razones más habituales del fracaso en el tratamiento de primera línea (293).

Se demostró en la literatura científica, que la tasa de eficacia de la triple terapia depende del PPI. Es por lo que diversas estrategias, como

el aumento la dosis de PPI o el aumento de la duración del tratamiento, se llevaron a cabo con el fin de obtener una mejora en del mismo. Un metaanálisis demostró un aumento en la dosificación de PPI resultó en una mejora en la tasa de erradicación del 6% al 10% en comparación con el estándar de PPI.

Además del tratamiento estándar para la infección por *H. pylori* también se han utilizado terapias coadyuvantes como por ejemplo la administración de lactoferrina o el *Sacchomyces boulardii* (294-296).

1.14.2. Terapia de primera línea en zonas con alta tasa de resistencia a la claritromicina

La cuádruple terapia es la recomendada en áreas que tienen una alta resistencia a la claritromicina. Esta terapia incluye una combinación de un PPI, bismuto sub-salicilato (525 mg, 4 × día), y 2 antibióticos, metronidazol (250 mg × 4 al día) y tetraciclina (500 mg, 4 × al día), entre 10 y 14 días. Este tratamiento es bien tolerado y los pacientes tienden a adherirse a ella. Sin embargo, esta la terapia no está disponible en todas las áreas geográficas. Es por ello que se recomienda que los facultativos tengan otras terapias previstas, como la terapia secuencial o terapia cuádruple sin bismuto (293).

1.14.2.1. La terapia secuencial

Se trata de la combinación de un PPI más amoxicilina (1 g, × 2 al día) durante 5 días, seguido por un PPI más tinidazol, claritromicina /

metronidazol (500 mg, 2 × día) durante 5 días. La mayoría de los estudios consultados, han demostrado que la terapia secuencial y cuádruple terapia basada en bismuto tienen un éxito equivalente en terapia de primera línea (297).

Un meta-análisis reciente evaluó la erradicación de *H. pylori* en niños después de la terapia secuencial en comparación con la terapia triple. Los autores concluyeron que la terapia secuencial es superior a 7 días de terapia triple estándar, pero no es significativamente mejor que el tratamiento de 10 o 14 días de triple terapia. Además, no encontraron diferencias significativas en el riesgo de efectos adversos entre los grupos que recibieron diferentes tratamientos (298)

1.14.2.2. La terapia concomitante

La terapia concomitante se utiliza en sustitución de la terapia secuencial, en áreas donde la resistencia a la claritromicina es mayor del 20% y siempre que la terapia cuádruple a base de bismuto no está disponible. La terapia concomitante implica la administración simultánea de 3 antibióticos (metronidazol, claritromicina y amoxicilina) y un PPI durante 10 días. Esta terapia es eficaz y bien tolerada en comparación con la triple terapia convencional (297).

Un estudio comparó la terapia concomitante con la triple terapia en Grecia, donde hay una alta resistencia a la claritromicina (25%) y metronidazol (40%). La terapia concomitante tenía una tasa de

erradicación del 90%, mientras que la triple terapia sólo tenía una tasa de erradicación del 73,8% (299). Los pacientes reportaron efectos adversos pero de carácter leve lo que les permitió completar el experimento (90).

Otro estudio analizó un tratamiento concomitante con PPI, amoxicilina, rifabutina y ciprofloxacino. Observaron la erradicación del *H. pylori* en tasas del 95,2%. En los pacientes con alergia a la penicilina, la amoxicilina fue sustituida por bismuto sin excesivo efecto sobre la tasa de erradicación (94,2%) (301).

Un ensayo clínico realizado en España, comparó específicamente la terapia concomitante con la terapia secuencial y no encontró diferencias en las tasas de erradicación de *H. pylori* después del tratamiento. Este ensayo clínico incluyó a pacientes con infección por *H. pylori* de 11 hospitales españoles. Los pacientes fueron seleccionados de forma aleatoria para recibir la terapia secuencial o la terapia concomitante. La terapia secuencial incluyó omeprazol (20 mg / 12 h) y amoxicilina (1 g / 12 h) durante 5 días, seguido de 5 días de tratamiento con omeprazol (20 mg / 12 h), claritromicina (500 mg / 12 h) y metronidazol (500 mg / 12 h). El tratamiento concomitante incluyó los mismos fármacos, pero los medicamentos se tomaron de forma concomitante durante 10 días. Cuatro semanas después de finalizar el tratamiento, la erradicación de *H. pylori* se confirmó con ¹³C-UBT o histología. Los autores llegaron a la conclusión de que no había ninguna

ventaja significativa entre la terapia concomitante o el tratamiento secuencial (302).

Un segundo estudio que comparó la terapia secuencial y concomitante, incluyó a 164 pacientes infectados con *H. pylori*. Los pacientes recibieron tratamiento durante 14 días de terapia secuencial ($n = 86$) o concomitante ($n = 78$). Los pacientes en el grupo de terapia secuencial recibió rabeprazol (20 mg) y amoxicilina (1 g) en la primera semana, seguido por rabeprazol (20 mg), claritromicina (500 mg), y metronidazol (500 mg) en la segunda semana. Los pacientes en el grupo de terapia concomitante recibieron rabeprazol (20 mg), amoxicilina (1 g), claritromicina (500 mg), y metronidazol (500 mg) durante 2 semanas. Cuatro semanas después de la finalización del tratamiento, la erradicación de *H. pylori* fue confirmada por UBT.

Los investigadores concluyeron que ambas terapias muestran una eficacia óptima y que no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos tanto en términos de erradicación de la bacteria como de efectos secundarios indeseables.

1.14.2.3. Terapia híbrida

La terapia híbrida consta de 2 pasos: (1) el tratamiento con un PPI y amoxicilina (1 g / 12 h) durante 7 días, seguido por (2) un IBP y 3 antibióticos, amoxicilina (1 g / 12 h), metronidazol (500 mg / 12 h) y claritromicina (500 mg / 12 h), de 7 días. En un estudio comparativo de

terapias secuenciales frente a la terapia híbrida, las tasas de erradicación fueron 89,5% y 76,7% respectivamente. No se observaron efectos adversos graves en pacientes de ambos grupos de tratamiento. Específicamente, 2,4% de los pacientes del grupo de terapia híbrida y el 3,8% de los pacientes en el grupo de terapia secuencial refirieron efectos adversos (303).

Un estudio reciente incluyó a pacientes con dispepsia no ulcerosa que estaban infectados con *H. pylori* y se compararon las tres terapias, la concomitante, híbrida y la terapia secuencial (304). Los pacientes fueron asignados al azar para recibir uno de los siguientes 3 tratamientos: (1) terapia concomitante con omeprazol (20 mg), amoxicilina (1 g), claritromicina (500 mg), y tinidazol (500 mg) durante 5 días, (2) la terapia secuencial con omeprazol (20 mg) y amoxicilina (1 g) durante 5 d, seguido de omeprazol (20 mg), claritromicina (500 mg), y tinidazol (500 mg) durante 5 días y ,por último, (3) terapia híbrida con omeprazol (20 mg) y amoxicilina (1 g) durante 7 d, seguido de omeprazol (20 mg), amoxicilina (1 g), claritromicina (500 mg), y tinidazol (500 mg) durante 7 días. Se utilizó UBT tras 6 semanas de tratamiento. En este estudio, las tasas de erradicación fueron del 85,5% y 91,6%, respectivamente, con la terapia concomitante; 91,1% y 92,1%, respectivamente, con la terapia secuencial; y 80% y 85,7%, respectivamente, con el régimen de terapia híbrida.

1.14.3. El tratamiento de segunda línea en áreas con bajas tasas de resistencia a la claritromicina

Las opciones disponibles en áreas con una baja resistencia a la claritromicina son la terapia cuádruple basada en bismuto o las terapias con un PPI y levofloxacino y amoxicilina (296, 305).

Sin embargo, el uso de levofloxacino ha sido cuestionado, en base en un aumento de los mecanismos de resistencia (306), deben realizarse estudios de sensibilidad antes de comenzar la terapia.

1.14.4. El tratamiento de segunda línea en áreas que tienen altas tasas de resistencia a claritromicina

Los casos en los que la cuádruple terapia basada en bismuto falla, se recomienda una triple terapia que contiene un PPI, levofloxacino y amoxicilina. Una vez más, el incremento de la resistencia al levofloxacino debe ser tenida en cuenta (293).

1.14.5. Tratamiento de tercera línea

Después de 2 tratamientos fallidos en zonas con baja o alta resistencia a la claritromicina, no es aconsejable prescribir otros tratamientos con antibióticos sin analizar las resistencias de las cepas. Siempre que sea posible, se deben obtener muestras de biopsia gástrica y mandarlas al laboratorio para siembra y posterior antibiograma (307).

Las denominadas "terapias de rescate" han obtenido buenos resultados en estos casos. Una "terapia de rescate" se basa en la administración de rifabutina (150 mg, 2 × día), amoxicilina (1 g, x 2 al día) y ciprofloxacino (500 mg, 2 × día) durante 14 días. Aunque esta terapia logra una excelente respuesta, se han observado efectos adversos graves (308).

Otras terapias de rescate incluyen una dosis doble de PPI más azitromicina (500 mg / d durante 3 días), seguido de una dosis doble de PPI más furazolidona (200 mg, 3 × día) durante 10 días. Además de una terapia de base de furazolidona (200 mg, 2 × día), subcitrato de bismuto (120 mg, 4 × día), y tetraciclina (500 mg, × 4 al día) en combinación con un PPI en las dosis descritas. Para este tratamiento, la tasa de recurrencia de infección por *H. pylori* después de una erradicación exitosa es del 11,5% (300).

1.14.6. *Uso de probióticos en el tratamiento*

Se ha sugerido en la literatura que los probióticos compiten directamente con el *H. pylori* al interferir en la adherencia del *H. pylori* o por la capacidad de producción de moléculas antimicrobianas.

Se han realizado estudios sobre la eficacia de *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) en el tratamiento de erradicación del *H. pylori*. En este estudio, la infección por *H. pylori* fue identificada por histopatología gástrica y UBT.

La intervención consistió en la administración de 108 unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. reuteri* (DSM 17938), más pantoprazol (20 mg, × 2 al día) durante 8 semanas. Los pacientes fueron examinados de 4 a 6 semanas después de la terapia para la erradicación de *H. pylori* por UBT. Se encontró que *L. reuteri* más pantoprazol dos veces al día podría tener un papel importante en la terapia de erradicación de *H. pylori*, si la tasa de erradicación se puede mejorar por cambios en la dosis, intervalo de administración, o duración de la terapia (293).

Un reciente meta-análisis analizó si una preparación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* podría mejorar las tasas de erradicación de *H. pylori* y reducir los efectos secundarios (309). El estudio incluyó 10 ensayos clínicos y 1469 pacientes. Los investigadores llegaron a la conclusión de que la combinación de una *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con la terapia inicial de erradicación del *H. pylori* en adultos puede tener efectos beneficiosos sobre la tasa de erradicación e incidencia de efectos secundarios totales. Otro objetivo del estudio fue determinar si la adición de probióticos podría minimizar la prevalencia de efectos secundarios gastrointestinales y mejorar la tasa de erradicación. En un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo a 66 pacientes *H. pylori*-positivo en niños, diagnosticado por UBT o histología, fueron tratados con un protocolo de tratamiento de triple fármaco (omeprazol, amoxicilina y furazolidona) y asignados al azar para

recibir, un probiótico o un placebo (Todos los pacientes fueron sometidos a endoscopia).

La tasa de erradicación del *H. pylori* fue significativamente mayor en el grupo que recibió los probióticos, además, durante el tratamiento, hubo una menor tasa de náuseas, vómitos y diarrea.

Los autores concluyeron que los probióticos pueden tener un efecto positivo en la erradicación de la infección por *H. pylori* y sobre los efectos secundarios del tratamiento contra la infección por *H. pylori*.

1.15. Vacuna frente al *H. pylori*

En las últimas décadas, se han llevado a cabo multitud de técnicas experimentales contra la infección por *H. pylori*. Han sido testadas diferentes formulaciones de vacunas con distintos antígenos, adyuvantes y vías de aplicación.

La reacción inmunitaria inducida por una vacuna más prometedora parece lograda mediante la inoculación de la mucosa (311).

1.15.1. Los estudios en ratones

En los diferentes protocolos de inmunización, se utilizaron proteínas con diferentes combinaciones, que mostraron un cierto nivel de protección. Antígenos como la ureasa, catalasa, VacA, CagA, Napa, HPAA, Alpa y Baba. Estos protocolos siguieron rutas diferentes tales como la oral, intranasal, rectal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y la

participación de diferentes adyuvantes, como la toxina del cólera (CT), oligonucleótidos-CpG, enterotoxina lábil al calor (LT), alumbre o adyuvantes de Freund. Combinaciones de más de un antígeno mostraron una mayor protección (312, 313).

En los últimos años, se han introducido nuevos enfoques de vacunas. Estos se componen de nuevos antígenos, nuevas combinaciones de antígeno o nuevos adyuvantes.

Una nueva vacuna candidata es la 20 kDa, compuesta por la membrana externa lipoproteína Lpp20 (314). Se ha demostrado que protege, en ratones, ante la infección por *H. pylori* por el anticuerpo Lpp20 (315).

La AhpC (alquil hidroperóxido reductasa) fue recientemente probada como una nueva vacuna. Se describe como una proteína antioxidante esencial, inmunogénica contra *H. pylori* que protege a las bacterias del estrés oxidativo. Este estudio investigó la eficacia profiláctica de AhpC con aplicación a través de la mucosa oral y subcutánea. La administración a través de la mucosa oral redujo significativamente la colonización bacteriana. La eficacia terapéutica de la administración sistémica de AhpC consiguió en animales más del 60% de protección. Estos datos se mostraron muy prometedores en cuanto a eficacia de la misma (316).

Como hemos visto, la colonización del estómago por el *H. pylori* da como resultado la inducción de una respuesta inflamatoria no protectora, polarizada principalmente por las células Th1. Actualmente se considera que la vacunación efectiva depende de la inducción de una respuesta humoral y celular Th2 inmunológico (317).

Las toxinas presentes en la mucosa tales como la toxina del cólera (toxina AB5, CT), la toxina lábil al calor de *Escherichia coli*, o adyuvantes de Freund, que hemos visto anteriormente, inducen una respuesta Th2, que previene o es capaz de erradicar una infección por *Helicobacter* spp. La respuesta Th1-aumentan la inflamación en lugar de eliminarla. Los primeros indicios de que estas vacunas contra *Helicobacter* pueden inducir una respuesta Th2 fueron vistos en estudios de saliva en la inmunoglobulina A secretora (IgA) e anticuerpos IgG1 en suero después de la inmunización oral de ratones (318, 319).

Estudios posteriores indicaron que la inmunización de la mucosa con ureasa tuvo una respuesta celular T del tipo Th2 CD4⁺ eliminando una infección por *Helicobacter felis* en curso en ratones BALB/c (320). Aparentemente, si una vacuna contra *H. pylori* conduce hacia la estimulación inmunitaria Th2 puede prevenir y erradicar la infección por *H. pylori*.

Otras indicaciones para el uso de vacunas contra el *H. pylori* provienen de experimentos con animales infectados de manera crónica, en los que o bien una proporción significativa podría ser curado de la

infección por H.pylori y la eficacia del tratamiento antibiótico puede ser mucho mayor (3321, 322, 323, 324, 325).

Por lo tanto, incluso en ausencia de erradicación completa, la vacunación terapéutica puede ser beneficiosa, ya que reduce el número de bacterias expuestas a los antibióticos y por lo tanto disminuye la posibilidad de inducir organismos resistentes a los antibióticos de H. pylori. Aún siendo conscientes de las limitaciones de los modelos animales, ya han sido realizados ensayos preliminares de vacunas en humanos y nos encontramos a la espera de resultados fiables (326, 327, 328, 329, 330).

En conclusión, las terapias triples y cuádruples con antimicrobianos siguen siendo el pilar principal para la terapia de las infecciones de H. pylori, con buena eficacia pero con casos de fracaso de la terapia en una minoría de pacientes. Las terapias de "rescate" con combinaciones de antimicrobianos alternativos también están disponibles, incluyendo el uso de probióticos, que han demostrado ser efectivos en casos de fracaso en tratamientos de primera y segunda línea.

1.16. Epidemiología

Prevalencia y distribución geográfica. La prevalencia del H. pylori muestra una gran variabilidad geográfica. Por lo general, en países en vías de desarrollo más del 80% de la población está infectada por H.pylori (331). La prevalencia del H. pylori en los países industrializados en

general, sigue siendo inferior al 40% y es considerablemente menor en los niños y adolescentes que en adultos y personas de edad avanzada (332).

Dentro de las áreas geográficas, la prevalencia de *H. pylori* está inversamente relacionada con el nivel socioeconómico, en particular, con las condiciones de vida en la infancia (333).

Si bien la prevalencia de infección por *H. pylori* en los países en desarrollo sigue siendo relativamente constante, está disminuyendo rápidamente en el mundo industrializado (334). Se cree que este descenso está causado por la mejora de la higiene y el saneamiento y por la eliminación de la bacteria en el portador por el tratamiento antimicrobiano.

En los países en desarrollo, las tasas de infección por *H. pylori* se elevan rápidamente en los primeros 5 años de vida y se mantiene alta a partir de entonces, lo que indica que la primoinfección por *H. pylori* se adquiere en la infancia (335).

Sin embargo, en los países industrializados la prevalencia de *H. pylori* es baja en la infancia y se eleva lentamente al aumentar la edad, lo que indica que la infección se adquiere en la edad adulta (336, 448).

Los test de detección se realizan serología, UBT, biopsia, siembra e inmunología. En un estudio importante, Gong et al. (338) compararon la precisión de las pruebas serológicas para el diagnóstico histológico en

un cáncer gástrico en un estudio de campo basado en el norte de China. Ellos encontraron que las pruebas serológicas, utilizando un kit disponible en el mercado y la utilización del nivel de corte recomendado subestimó la prevalencia de *H. pylori* en casi un 30% y destacó la necesidad de una validación local con pruebas serológicas.

Li et al. (339) llevaron a cabo un estudio en Shanghai como parte de una revisión sistemática de las enfermedades gastrointestinales en China. Utilizaron un método de muestreo polietápico, estratificado y registraron una prevalencia de *H. pylori* del 73,3% (2310/3151) mediante pruebas serológicas para todos los sujetos y el 71,7% (733/1022) mediante una endoscopia para los sujetos que aceptaron el procedimiento. En grandes estudios basados en la endoscopia de Corea (340) Vietnam (341) y Turquía (342), el *H. pylori* se detectó 50-70% de la población estudiada. Tsukanov et al. (343) en uno de los pocos estudios realizados en el este de Siberia registró una tasa muy elevada de infección por *H. pylori*, superior al 90% para ambos "Europoid" (descendientes de europeos) y poblaciones mongoloides (de ascendencia asiática). Entre las subpoblaciones seleccionadas, Ullah et al. (344) reportaron una alta prevalencia de *H. pylori* del 77,3% entre un grupo de manipuladores de pescado de Bangladesh, mientras Rahim et al. (345) en un estudio de aborígenes en la parte noreste de Malasia informaron de una tasa de prevalencia del 19%.

Pandeya et al. (346) en un estudio australiano a nivel nacional sobre cáncer de esófago registraron una tasa de prevalencia de *H. pylori* del 15,5%. Fraser et al. (347) mostraron diferencias significativas entre las tasas de prevalencia de *H. pylori* entre las islas del Pacífico (49,0%) frente a los maoríes (26,7%) y Asia (24,7%) frente a adolescentes europeos (13,7%). Varios estudios sobre los niños y los adolescentes en Asia mostraron que las tasas de prevalencia que van desde 20% a 84% (349-352).

En general, como se esperaba, las tasas de prevalencia de la región Asia-Pacífico fueron altas, excepto entre la población blanca de Australia y Nueva Zelanda. La prevalencia de la infección por *H. pylori* fue generalmente más baja entre los niños, excepto para el estudio de la India (350) y otro en niños refugiados en Australia Occidental (351).

Se analizaron cuatro estudios sobre el continente africano (353-356). Todos registraron una alta tasa de prevalencia de *H. pylori* que va desde 41,3% al 91,3% (353-356).

Se analizaron siete estudios de prevalencia de *H.pylori* en América del Sur (357-363). Cuatro de estos estudios fueron en niños (357-360). El estudio realizado por Dattoli et al. (357), una continuación de los estudios anteriores sobre enfermedades diarreicas en una ciudad en el noreste de Brasil, informó una prevalencia de *H. pylori* de 28,7%. Los otros tres estudios sobre los niños (358-360) informaron de tasas de prevalencia de *H. pylori* que van desde 24,3% a 61,0%.

Existen pocos estudios de prevalencia de H.pylori en Europa (364, 365) y América del Norte (366-369). En un estudio en EE.UU. Epplein et al. (366) reportaron una tasa de prevalencia de H. pylori del 79,0% entre una subpoblación de los estadounidenses pobres (predominantemente negros) con una alta correlación entre la prevalencia de H.pylori y a la baja, moderada y alta ascendencia africana.

En otro artículo, Sonnenberg et al. (367) en una revisión de una enorme base de datos de todas las biopsias recogidas en un laboratorio central en los EE.UU. reportó una prevalencia de H. pylori de sólo el 7,5%.

Dos estudios analizaron las diferencias en la tendencia de la prevalencia de H. pylori (370, 371). Nakajima et al. (371) realizaron una revisión en los casos de su área sanitaria e informaron de una caída de la prevalencia de H. pylori del 70% al 50% durante un período de 17 años (1988 a 2005) y unido a esa tendencia, una disminución de la prevalencia de la enfermedad de úlcera péptica (PUD) y cáncer gástrico.

En un estudio de muestras tomadas mediante endoscopia en los EE.UU. con un número relativamente pequeño, McJunkin et al. (370) informaron también de una dramática caída en la prevalencia de H. pylori (de 65,8% a 6,8%) y el PUD (de 38,8% a 5,6%) durante un período de 11 años.

1.16.1. Incidencia

Sólo existe un estudio sobre la incidencia de la infección por H. pylori. En este estudio por Muhsen et al. (372), se hace un test para H. pylori a una

cohorte de niños israelíes en edad preescolar usando SAT. La misma prueba se repitió en la edad escolar. La prevalencia de *H. pylori* fue de 49.7% y 58.9% en la edad preescolar y escolar, respectivamente. Entre setenta niños previamente no infectados, había catorce nuevas infecciones por *H. pylori* en un período de 4 años (20%), resultando una incidencia del 5%.

1.16.2. Rutas de transmisión

Los mecanismos exactos mediante los cuales una persona se infecta de *H. pylori* son en gran parte desconocidos. El *H. pylori* tiene un rango estrecho de hospedadores y se encuentra casi exclusivamente en los seres humanos y algunos primates. El *H. pylori* se ha aislado excepcionalmente en animales de compañía, por lo tanto, la presencia de animales domésticos puede ser un factor de riesgo para la infección por *H. pylori* (373-376).

A la vista de los estudios analizados, la transmisión, se cree que se produce como consecuencia del contacto directo persona a persona, ya sea a través de una exposición oral-oral o fecal-oral o ambos. El *H. pylori* se ha detectado en la saliva, vómito, reflujo gástrico, heces y placa dental pero no existen resultados concluyentes de que exista una vía predominante de transmisión (377-381).

En general se cree que la adquisición de la infección por *H. pylori* se produce en su mayoría en la primera infancia, muy probablemente

entre los miembros de la familia más cercana y de modo directo persona a persona.

1.17. Presencia de *H.pylori* en la cavidad oral y sus implicaciones en el tratamiento

La infección por *H. pylori*, como antes hemos visto, se trata, principalmente, con terapia antibiótica sistémica.

En algunos pacientes, sin embargo, la infección bacteriana persiste después del tratamiento (382, 383).

Surgen entonces, dos cuestiones de gran importancia, ¿cómo se transmite esta infección bacteriana persistente? y ¿cómo se produce el proceso de reinfección?

Algunos investigadores han sugerido que la cavidad oral podría ser la vía principal de transmisión y reinfección de *H. pylori*. Tanto la placa dental como la saliva podrían actuar como reservorio de la bacteria y tener implicaciones en la reinfección una vez que la bacteria esté erradicada del tracto gástrico, sobre todo en pacientes con enfermedad periodontal (384). Zou et al (385) consideran que la cavidad oral puede ser una fuente de reinfección ya que la erradicación de la bacteria en la cavidad oral es más compleja que la erradicación gastrointestinal ya que los antimicrobianos no afectan a la bacteria embebida en placa dental o en forma cocoide.

Los estudios realizados hasta la fecha para la identificación del *H. pylori* en placa dental, saliva, enfermedad periodontal, aftas, cáncer, ardor en la boca y la halitosis han obtenido resultados muy variables debido a los diferentes métodos diagnósticos y diseños de investigación utilizados.

1.17.1. H. pylori en placa dental y saliva

La placa bacteriana o biofilm oral es una película translúcida, mezcla una gran variedad de bacterias y hongos y matriz extracelular (compuestos orgánicos y minerales), que se adhiere a la superficie dental, gingival y bucal epitelio, prótesis y restauraciones y no se puede eliminar con un simple enjuague. Tiene una composición variable dependiendo de la ubicación y el tiempo de maduración.

La presencia de *H.pylori* en placa dental se estudió por primera vez en Canadá en 1989 por Krajdén et al (386), realizaron el aislamiento de *H. pylori* mediante siembra en placa en pacientes con patología gástrica y *H. pylori* positivo. En este estudio el *H. pylori* se aisló a partir de muestras gástricas en 29 de 71 pacientes y sólo un 3% de los positivos presentó *H.pylori* en placa dental. Ese mismo año, el mismo grupo, también en Canadá, estudiaron las cepas de *H. pylori* gástricas y las de placa dental de pacientes para determinar si estaban vinculados epidemiológicamente. El equipo de Krajdén describió por primera vez la placa dental como fuente nicho de infección por *H. pylori* encontrando similitudes genéticas entre las cepas gástricas y orales (387).

Desai et al (388) publicaron un estudio en el que observaban que aplicando la triple terapia a 24 pacientes con gastritis, H. pylori positivo y la placa dental, la bacteria en la región gástrica había sido erradicada en el 100% de los pacientes, pero persistió, en todos ellos, en la placa dental. Por lo tanto, consideraron que la triple terapia no era suficiente para la erradicación de H. pylori y que debía ser abordado, de manera simultánea con un tratamiento local.

Desde 1989 hasta la fecha, muchos investigadores en todo el mundo han identificado H. pylori en placa y la saliva con diferentes los resultados.

Pustorino et al (389), publicaron un estudio en el que los resultados observados tenían una frecuencia relativamente baja de crecimiento en placa dental en 83 pacientes dispépticos pero se encontró en cada paciente un perfil de proteínas idénticas en las bacterias, tanto en la placa como en el estómago.

Pytko-Polonczyk et al (390), publicaron que después de la administración de la triple terapia, las bacterias persistían en la placa dental de todos los pacientes.

También en el estudio de Suk et al (35), después de la administración de la triple de terapia, informaron de una erradicación del 84% en el estómago pero sólo un 7% en la placa dental.

Wang et al (392) realizaron un estudio comparativo de los genotipos de *H. pylori* en el estómago y la saliva. Se analizó CagA, vacAm1 y se analizaron los genotipos vacAm2 y vacAs1 en 31 pacientes. La secuenciación del ADN en 3 individuos mostró una homología del 78%, 64% y 67%, respectivamente. Sugirieron que más de uno la misma cepa de *H. pylori* podía coexistir en la saliva y el estómago.

Berroteran et al (393) investigaron la presencia de *H. pylori* en la placa dental en 32 pacientes dispépticos y su relación con la patología gástrica. Encontraron que el 24/32 (75%) de los pacientes que presentaban *H. pylori* positivo a nivel gástrico y 12/32 (38%) también presentaban *H. pylori* en la placa dental, suponiendo que este organismo en la placa dental podría ser un factor de riesgo para la re-infección gastrointestinal.

La placa dental se ha identificado como el segundo reservorio de *H. pylori*, y el primer reservorio extra-gástrico. Sin embargo, algunos estudios no encontraron *H. pylori* ni en la placa, ni en la saliva, lo que puede ser debido a las diferentes metodologías utilizadas (394-398).

1.17.2. Identificación

Se ha demostrado que la técnica RUT no es útil para la detección de *H. pylori* en la placa dental ya que no cuenta con la sensibilidad suficiente (399).

Tampoco las técnicas de siembra que, siendo útiles para muestras gástricas, no lo son para muestras orales debido a las formas que puede adoptar la bacteria. Cuatro estudios con microscopio electrónico demostraron que el H.pylori puede presentarse de 3 formas diferentes: espiral, formas cocoides y formas degeneradas. La forma de espiral es viable, cultivable, y virulenta. Las formas cocoides también puede ser viables, pero son no cultivables y son menos virulentas. Las formas degenerativas son formas no cultivables, cuya membrana celular se ha desintegrado, representando una forma de bacteria no viable.

La literatura ha demostrado que la técnica más exitosa para la detección de H.pylori en placa dental y saliva es la PCR ya que es capaz de detectar la bacteria en bajas concentraciones sin necesidad de que este sea viable.

La evidencia científica disponible que arroja unos porcentajes muy variables, con un espectro que va desde el 100% de detección al 0%. A pesar de algunos resultados adversos, la placa dental representa el primer reservorio extragástrico de H. pylori.

Es por ello que jugará un papel clave en la reinfección de la patología gástrica H. pylori positivo.

Existen estudios recientes que recomiendan para una terapia completa de erradicación añadir a los tratamientos conocidos la higiene bucodental y terapia periodontal (400).

1.17.3. Enfermedad periodontal y *H. pylori*

La placa dental es la responsable de la caries y de la enfermedad periodontal cuando se encuentra a nivel subgingival. La placa dental alberga diferentes tipos de microbiota y en ausencia de una buena higiene oral, se desarrolla rápidamente y se adherirá a la superficie de los dientes tanto a nivel supra como subgingival.

En las lesiones periodontales, el número de bacterias aumenta con el desarrollo de la periodontitis, y existen una serie de microorganismos patognómicos de la enfermedad como la *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium periodonticum*, *Actinomyces actinomicetemcomitans* y en muchos casos también alberga cepas de *H. pylori*.

En la revisión de la literatura científica encontramos trabajos desde el año 1994 hasta el año 2014.

Asikainen et al (401), en 1994, llevaron a cabo la primera búsqueda de *H. pylori* en la placa subgingival de pacientes con periodontitis en Finlandia. Llegaron a la conclusión de que las bolsas periodontales no son un reservorio natural de *H. pylori*.

En Gran Bretaña, Riggio et al (402), en 1999, demostraron la presencia de *H. pylori* en 11/29 (38%) las placas subgingivales de los pacientes con periodontitis crónica. Sugirieron que, en este grupo de pacientes, al

menos, la placa subgingival puede ser un reservorio para la infección por *H. pylori*.

Ninguno de estos estudios evaluó la condición gástrica. Se determinó que se requería que una correcta higiene bucal para eliminar *H. pylori* de la placa dental. Sugirieron además que el presencia de *H. pylori* en la placa dental debe ser controlado a fin de evitar su reinfección (403).

Las bolsas periodontales ≥ 5 mm de profundidad se asociaron con mayores probabilidades de seropositividad por *H. pylori* (404).

La bacteria se detectó en la saliva y en la placa supra y subgingival, lo que sugiere que estos sitios pueden ser considerados reservorios para *H. pylori* en pacientes con ureasa positiva.

La bacteria no se ha encontrado en el dorso de la lengua de ningún paciente (405).

La erradicación de *H. pylori* tras el tratamiento es más eficaz es el estómago que en la cavidad oral.

Bouziane et al (410) llevaron a cabo una revisión sistemática y meta-análisis en el que evaluaron el efecto de control de la placa dental, la terapia periodontal y el tratamiento de erradicación bacteriana en ambos sitios vs terapia de erradicación solo a nivel gástrico. Se demostró que la erradicación de *H.pylori* sólo en el estómago no era eficaz para evitar la reinfección.

1.18. Detección de *H. pylori* en heces

Las heces están compuestas de diferentes compuestos así como microorganismos diversos, compuestos inorgánicos (calcio y fosfatos), sales biliares, polisacáridos, fibra, numerosas enzimas degradadas, mucosidad y productos insolubles del trayecto digestivo (411, 412).

Debido a su disponibilidad y a su facilidad para tomar la muestra, las heces representan una muestra idónea para detectar el *H.pylori*. Las muestras fecales, son especialmente adecuadas para niños, ya que pueden ser obtenidas sin su colaboración directa, comparada con UBT o endoscopia.

La detección de *H. pylori* en heces, puede realizarse por siembra, PCR y por inmunocromatografía.

1.18.1. Siembra en placa

La siembra de heces, es el método más específico, pero en muy pocos estudios ha conseguido aislar *H.pylori* en las heces (413, 414).

Se sospecha que la ruta de transmisión más común es la fecal-oral, lo que demuestra que la bacteria es excretada con las heces.

Sin embargo, como antes se ha señalado, es muy complicado aislar *H. pylori* a partir de muestras de heces. Las explicaciones encontradas a este pobre aislamiento se basan en que el *H. pylori* es muy susceptible a las sales biliares y hay una gran competencia con otros numerosos

bacterias presentes en las heces. También es posible que la bacteria se encuentre en estado viable pero sin posibilidad de crecimiento en placa (415).

El primer aislamiento en placa de *H. pylori* en muestra de heces fue reportado por Thomas et al (416) a partir de niños desnutridos de países subdesarrollados. Dore et al (417) obtuvieron el aislamiento en placa con éxito, después de tratar con colestiramina, un agente para placas de siembra que elimina la bilis de las heces. Sin embargo, las colonias que han crecido en las placas, de aspecto similar *H.pylori*, deben ser comprobadas por métodos moleculares para confirmar que son realmente *H. pylori* o sembradas en medios selectivos.

1.18.2. PCR

Debido a su gran sensibilidad, la PCR es la técnica más adecuada para detecciones de microorganismos cuando el número de ellos es bajo, son de crecimiento lento o son difíciles de identificar. Sin embargo, aunque la técnica es adecuada para la mayoría de muestras clínicas, para las heces nos encontramos con problemas de inhibición de señal debido a los contaminantes que abundan en las heces, dando como resultado muchos falsos negativos.

Las heces humanas contienen muchos inhibidores de la PCR, que han de ser eliminados previamente si queremos obtener buenos resultados (418).

Se han desarrollado muchos sistemas para purificar las muestras de heces como el filtrado de la muestra con membrana de polipropileno para eliminar los inhibidores (419).

Podemos encontrar en la literatura el uso de partículas paramagnéticas para separar la bacteria de las heces (420). La separación inmunomagnética (IMS) permite separar la bacteria de contaminantes e inhibidores. Se han utilizados IMS con anticuerpos monoclonales para separar *H.pylori* en heces de pacientes japoneses con dispepsia (421).

Se ha demostrado que la existencia de polisacáridos complejos en las heces, actúan como inhibidores de señal en la PCR (422). Estos polisacáridos, probablemente, se generan por la ingesta de vegetales en la dieta, observando la no existencia de polisacáridos complejos en individuos que no consumen vegetales (423).

Con el objetivo de eliminar los polisacáridos que producen la inhibición de la PCR, se ha reportado en la literatura la utilización de Bromuro de Cetimetril de Amonio (CTAB) con resultados dispares en dos artículos. (424, 425).



2. OBJETIVOS





2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- 1- Diseño y optimización de un sistema en la plataforma BD Max ® (Becton Dickinson) rápido y fiable para la detección de H.pylori y su resistencia a claritromicina en muestras gástricas.
- 2- Detección de H.pylori en cavidad oral y su relación en los mecanismos de reinfección.
- 3- Diseño de sistema de detección de H. pylori en muestras gástricas parafinadas.
- 4- Estudio del coste y tiempos de varios sistemas de referencia para la detección de microorganismos.



3. MÉTODOS





3. MÉTODOS

3.1. Pacientes

Para la evaluación de la técnica de detección de *H.pylori* en la plataforma BD Max® (Becton Dickinson and CO), se utilizaron 500 muestras de heces, 201 muestras de biopsia gástrica, 100 muestras orales, 100 muestras de biopsia gástrica parafinadas.

Las biopsias fueron recibidas en el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), procedentes del servicio de gastroenterología, de pacientes con molestias abdominales, dispepsia o reflujo gastroesofágico. Estos pacientes fueron citados para la realización de la correspondiente biopsia gástrica tomada por endoscopia gastrointestinal (con el consentimiento informado).

Las muestras de heces fueron recibidas en el servicio de microbiología del CHUS procedentes de toda el área sanitaria, procedentes de pacientes con sospecha de infección por *H.pylori*. Se reciben en bote de orina estéril y, previamente al procesado, se congelan durante 24 H.

Las muestras orales se tomaron con hisopo y se procesaron en menos de 12 h tras la toma. Se introduce el hisopo directamente en el SPC del BD MAX™ para su análisis.

Ninguno de los pacientes había sido tratado por una infección por *H. pylori* en el pasado. Los pacientes fueron excluidos del estudio, si habían tomado antibióticos o medicamentos supresores de ácido (inhibidores

de la bomba de protones, antagonistas de los receptores H₂, antiácidos o preparaciones de bismuto) 4 semanas antes de la prueba o si el estado de la infección por *H. pylori* no estaba claramente definido.

Los pacientes tenían un rango de edad de 18 a 77 años siendo un 53% mujeres y el resto hombres.

3.2. **BD Max™**

BD MAX™ (Becton Dickinson and CO) es un sistema molecular que permite la completa automatización y estandarización de la extracción de ácidos nucleicos y posterior amplificación (PCR microfluidica) para algunas dianas definidas y esta aprobado por la FDA y también permite la realización de protocolos definidos por el usuario (sistema abierto), desde la muestra clínica hasta la obtención del resultado por PCR.

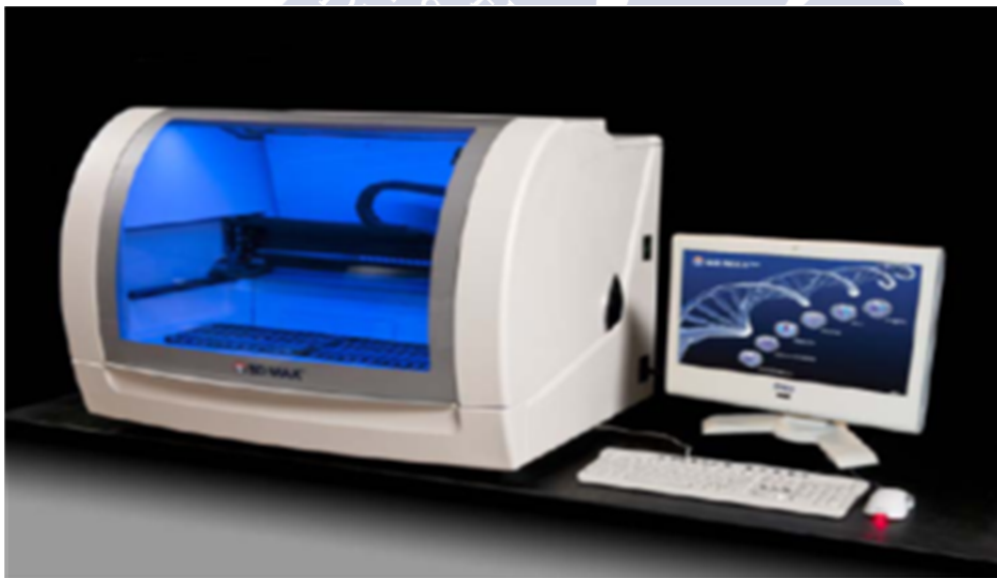


Fig. 3: La plataforma BD MAX™. Fotografía oportada por el fabricante.

El sistema BD MAX contiene todo el hardware y software necesario para llevar a cabo la detección de microorganismos así como calcular,

comunicar y almacenar los resultados. El sistema consta de un cabezal desde donde se manipulan los líquidos montados en un pórtico robótico y los conjuntos asociados, que permiten la extracción de ácidos nucleicos y purificación de diversos tipos de muestras. El sistema también realiza la amplificación en tiempo real y la detección basada en la tecnología de microfluidos para la detección de secuencias de ácido nucleico diana.

El módulo-calentador proporciona la energía térmica necesaria para activar los diversos componentes microfluidicos de los cartuchos desechables, y el termociclador para la PCR.

Los sensores de temperatura permiten la monitorización en tiempo real de los calentadores a través de un mecanismo basado en la retroalimentación, lo que permite el control de temperatura.

La detección de la fluorescencia, está basado en LEDs y fotodiodos con enfoque y de filtrado de longitudes de onda adecuadas para el seguimiento de la fluorescencia de las reacciones bioquímicas, y permite la detección multi-color.

Hay 24 canales de ciclos térmicos únicos al sistema (2 a bordo de los lectores).

Se puede introducir la información del paciente / muestra, ya sea de forma manual o mediante un lector de código de barras externo.



Fig. 4: El interior del BD MAX™ donde podemos ver la disposición de las tiras de extracción, el brazo robótico y las tarjetas de microfluidos donde se llevara a cabo la PCR a tiempo real. Fotografía aportada por el fabricante.

La principal ventaja de este sistema es que permite una detección de ADN de forma totalmente integrada y automatizada lo que nos permite que en menos de 1 minuto de "hands-on" por muestra sin tratamiento previo podamos tener el test en funcionamiento.

Produce resultados altamente sensibles y específicos a través de la tecnología de PCR en tiempo real y también que estos sean consistentes a través de flujo de trabajo y protocolos estandarizados. Es un sistema de fácil manejo y ofrece la posibilidad de crear sistemas totalmente abiertos al usuario para que pueda crear sus propios tests en base a sus necesidades específicas.

Puede realizar el análisis de 24 muestras en un mismo experimento con un coste contenido y en 30 min cada cuatro muestras.

En general el BD Max® y sus kits están aprobados por la FDA™ y tienen marca CE™.

El BD MAX™ cuenta con 5 canales de detección con estas longitudes de onda y colores, 475/520 (FAM), 530/565 (TET, VIC), 585/630 (TEXAS RED / ROX), 630/665 (Cy5) y el canal de control interno 680/715 (Cy5.5).

Color	Dye example	Longitud de onda	Rango de excitación	Rango de emisión
Verde	FAM	475/520	464-490	510-530
Amarillo	TET, VIC	530/565	520-540	559-571
Naranja	Texas Red, ROX	585/630	555-598	618-638
Rojo	Cy5	630/665	622-636	657-670
Carmesí	Cy5.5	680/715	673-683	710-790

Tabla 2 : Cuadro resumen de canales de lectura disponibles en el BD Max™.

Los kits de extracción de ADN disponibles para experimentos definidos por el usuario (UDP) en la plataforma BD MAX™ son: EXK ADN-1 (Orina/plasma /Suero), EXK ADN-2 (Swab y CSF), EXK ADN-3 (hisopos en medio de transporte / UTM) EXK ADN-4 (heces). En el test diseñado en esta Tesis se utilizará en EXK ADN-1 para las biopias y muestras orales y EXK ADN-4 para heces.

3.3. Reactivos de PCR incluidos en las tiras de extracción del BDMaX

El sistema BD MAX™ ADN MMK (SPC) es una mezcla de reactivos de PCR liofilizada que contiene dNTPs, MgCl₂, DNA polimerasa Hot Start, tampones, así como primers forward y reverse y una sonda TaqMan® (excitación: 690 nm; emisión: 705 nm) que se utilizan para el control interno de la muestra (SPC).

El BD MAX™ ADN MMK (SPC) contiene secuencias de cebador y sonda de *Drosophila melanogaster* (GenBank: AC246436; los nucleótidos 35.779 a 35.978) clonado en un derivado de pUC119 (GenBank: U07650.1).

Forward Primer: 5'-GGATCTAGCCGTGTGCCCCGCT-3'

Reverse primer: 5'GGCATGGAGGTTGTCCCATTTGTG-3'

Sonda TaqMan®: 5'-TTGATGCCTCTTCACATTGCTCCACCTTTCCT-3'

3.4. Fases de trabajo del BDMaX

En este punto se resumen las etapas, los componentes involucrados en un test modelo en el BDMAX

- Las muestras se introducen en los tubos de muestra de acuerdo con las instrucciones de cada kit específico.
- Los tubos de muestra se colocan en la posición establecida en la gradilla con el código de barras hacia el exterior donde son leídos por el lector de código de barras

- La información de la muestra se introduce a través del teclado o por el lector de código de barras externo.
- Se colocan el número de tiras necesarias en el lugar establecido comprobando que queden seguras. Los tubos de extracción y PCR se encajan en las posiciones establecidas (señalado por colores) en las tiras de extracción.
- Las tarjetas microfluídicas donde se va a realizar la PCR se sitúan en el lugar establecido (ver Fig 4)
- Una vez que se inicia la ejecución, se verifican las muestras, las tiras y los reactivos y comienza el proceso de extracción y purificación.
- Después de la extracción, el ADN purificado se mezcla con la mix principal, incluyendo sondas y primers. El instrumento transfiere la muestra y la pipetea en los pocillos de las tarjetas microfluídicas para la realización de la PCR.

3.5. Diseño de la PCR en BDMax

Comenzamos diseñando la PCR para *H.pylori* en el BD MAX™. Para ello hemos de diseñar unos primers y sondas para la detección del *H.pylori*. Para la detección de la bacteria diseñamos el siguiente juego de primers y sondas: UREASA 23-S TaqMan® MGB-FAM con la secuencia de primers; UREIForward: 5'-AAGCACTGCGGTGATGAACT-3' y UREIreverse: 5'-CAGTCGCTGGCCCATAGAAA-3' (posición de nucleótido 61 a 241) resultando un producto de 161 pb. La sonda de hibridación es 5'-

CCCCTGTAGAAGGTGCAGAA-3' (posición de nucleótido 121 a 181)
(Applied Biosystems UK. Life Technologies).

El mecanismo de resistencia a la Cla que desarrolla el H.pylori, reduce unión del antibiótico al ribosoma bacteriano y debido a mutaciones puntuales en el 23S rRNA (426). Existen tres mutaciones en dos posiciones adyacentes en el 23 SrRNA que son las responsables de la resistencia a la Cla en el H.pylori. Una adenina es reemplazada por una guanina o citosina en dos posiciones diferentes: A2143G, A2142G y A2142C (426, 427,428). Las mutaciones A2143G y A2142G son las más frecuentemente reportadas.

Hemos utilizado los siguientes primers y sondas para las dos mutaciones más habituales (429) (Applied Biosystems UK. Life Technologies):

FP-1: 5'-TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'

RP-1: 5` GACTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTAC-3'

RP2142G: 5´ - AGTAAAGGTCCACGGGGTATTCC-3´;

FP2143G: 5´ - CCGCGGCAAGACAGAGA-3´

Con las siguientes sondas de hibridación:

S1: CLARITAQMAN FAM MGB 5´ - GGG TGT CTC AAC CAG AG – 3´

S2: TAMRA TET 5´ - TAA TGG GAA TAT CAT GCG CA – 3´

Nombre Primer	Secuencia del primer
UREI F	5'-AAGCACTGCGGTGATGAACT-3'
UREI R	5'- CAGTCGCTGGCCCATAGAAA-3'
FP-1	5'TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'
RP-1	5` GACTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTAC-3'
RP2142G	5'- AGTAAAGGTCCACGGGGTATTCC-3'
FP2143G	5'- CCGCGGCAAGACAGAGA-3'

Tabla 3: Los oligonucleotidos usados en esta técnica. Los oligonucleotidos FP-1 RP-1 RP 2142G y FP 2143 G están extraídos del artículo, Furuta, T., Soya, Y. et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 1810-1815.

Nombre sonda	Secuencia sonda
UREASE (URE)	5'- CCCCTGTAGAGGTGCAGAA-3'
Cla R MGB (S1)	5'- GGG TGT CTC AAC CAG AG – 3'
Cla R TAMRA (S2)	5'- TAA TGG GAA TAT CAT GCG CA – 3

Tabla 4: Las sondas de hibridación utilizadas en esta técnica

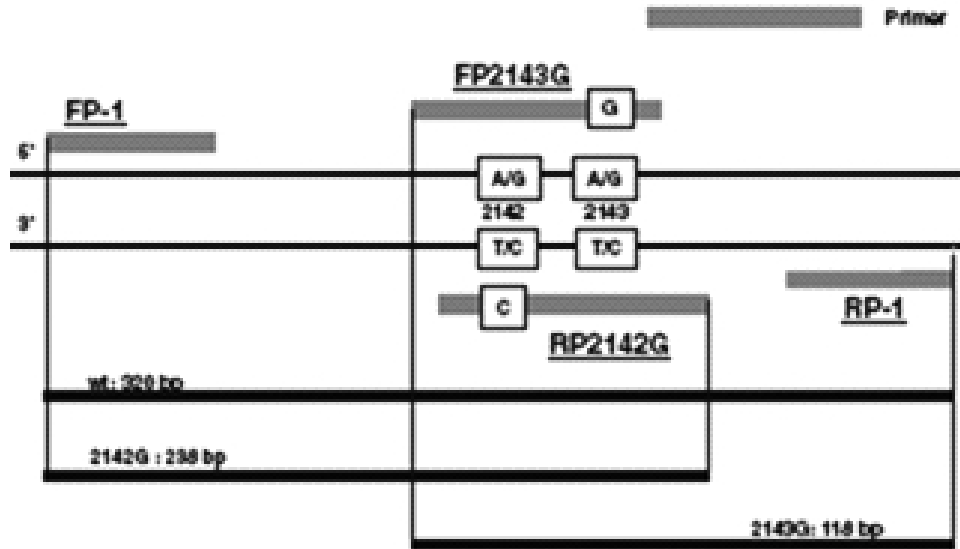


Fig. 5: Posición de los primers y tamaño de los amplicones. Grafico obtenido del artículo Furuta, T., Soya, Y. et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 1810-1815.

Una vez recibidos los primers y sondas se resuspenden para lograr una concentración 100 μM . Para ello se resuspenden en agua grado PCR y se generan alícuotas en tubos de 20 μl y se conservan a -20 grados centígrados para que los procesos de descongelación sean limitados.

Se comienza con una dilución 0,5 McFarland y extracción de ADN en sistema MagnaPure™ de Roche Diagnostics™. El protocolo utilizado para la extracción en MagnaPure™ es el siguiente: resuspendemos *H.pylori* procedente de placa en una solución hipotónica hasta conseguir una suspensión 0,2 Mc Farland. Se introducen en los tubos de muestra del MagnaPure™ 420 μl de muestra y lo introducimos directamente en el tubo evitando el paso por el MagnaLyser™ ya que dañaría en exceso el DNA de la bacteria por lisis mecánica.

Una vez finalizado el proceso con el MagnaPure™ se lleva a cabo la primera PCR de H.pylori probando distintas concentraciones de primers y sondas para saber cuál es la óptima. Se selecciona la concentración de primers 0,4 μM y de sonda 0,2 μM .

Se realizan diluciones seriadas para comprobar los límites de detección y la sensibilidad de la técnica. La mix para el sistema sólo PCR es la siguiente:

Componente	Volumen para 1 muestra (μl)
<i>Forward Primer</i>	0,5
<i>Reverse Primer</i>	0,5
<i>Sonda</i>	0,25
<i>DNA</i>	2,5
<i>BD Primer and Probe diluent</i>	1
<i>Release Buffer</i>	6,25
<i>Agua grado PCR</i>	1,5
Volumen final	12,5 μl

Las tarjetas se cargan manualmente.

Las condiciones iniciales para la PCR son:

Proceso	Temperatura(grados C)	Tiempo (segundos)
Activación	98	600
Amplificación 45 ciclos	98	10
Detección	60	46,9

Detección únicamente, en esta fase, de los canales FAM (475/520) y el canal del control interno (680/715).

3.6. Optimización de tiempos en la PCR de *H. pylori*

Se comienza con la PCR que viene programada de fábrica cuya duración es de unos 60 minutos, como vimos en el punto 3.8 y recordamos:

Proceso	Temperatura(grados C)	Tiempo (segundos)
Activación	98	600
Amplificación 45 ciclos	98	10
Detección	60	46,9

Tabla 6: Configuración inicial de la PCR de *H. pylori* en el BDMAX™.

Se realizó una optimización de la PCR en tiempos y temperaturas para conseguir acortar al máximo la duración de la misma.

Se probaron múltiples combinaciones de tiempos:

Nombre del test	Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo(s)	Temp.(°C)
H pylori PCR -10s	New Step	Mantener	1	600	98
	New Step	2 - Temperatura	45	10	98
H pylori PCR -20s	New Step	Mantener	1	600	98
	New Step	2 - Temperatura	45	7	98
H pylori PCR-450-40C	New Step	Mantener	1	450	98
	New Step	2 - Temperatura	40	7	98
H pylori PCR-500-40S	New Step	Mantener	1	500	98
	New Step	2 - Temperatura	40	7	98
H pylori PCR-550-40S	New Step	Mantener	1	550	98
	New Step	2 - Temperatura	40	7	98

Fig. 6: Combinaciones de tiempos testadas en el BDMAX.

La combinación final que nos permite pasar de los 60 minutos por PCR iniciales a los 36 minutos por PCR actuales lo que supone bajar 24 minutos por cada test sin perder sensibilidad.

Nombre del test	Detalles del test				
	Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo(s)	Temp.(°C)
H pylori complete2	New Step	Mantener	1	600	98
	New Step	2 - Temperatura	45	10	98

Fig 7: Configuración inicial de PCR. 60 minutos por PCR.

H pylori Complete 4

Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo(s)	Temp.(°C)
New Step	Mantener	1	500	98
Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo(s)	Temp.(°C)
New Step	2 - Temperatura	45	7	98
			9.9	60

Fig. 8: Configuración utilizada actualmente que rebaja 24 minutos cada test. 36 minutos PCR.

3.7. Extracción y PCR en BDMaX™

La lisis de las muestras y la extracción de ADN se llevan a cabo en cada una de las tiras de extracción. Los pasos en el proceso de lisis y extracción se presentan esquemáticamente en la Figura 1-2.

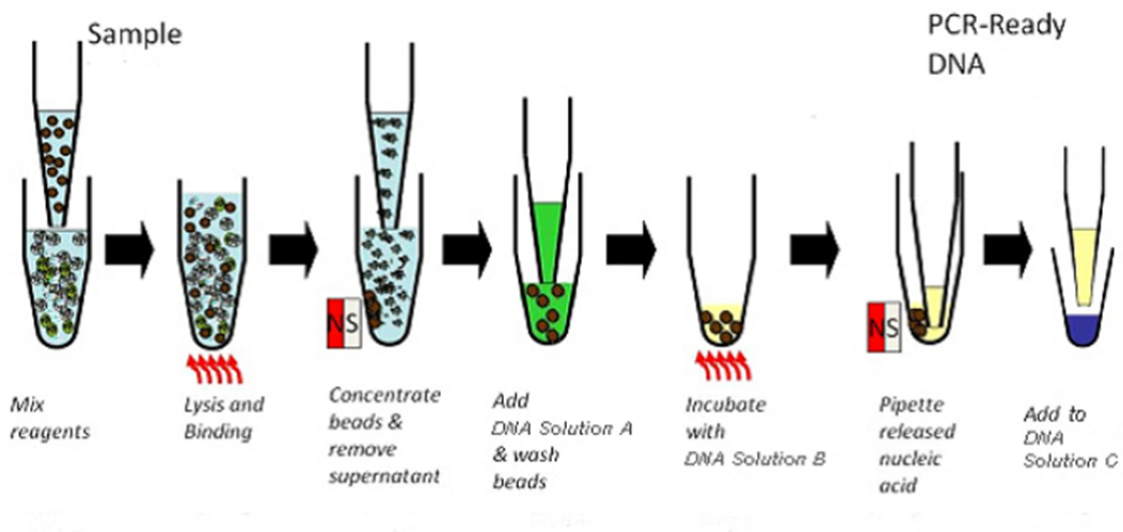


Fig. 9: Esquema del sistema de extracción. Aportado por el fabricante

Las flechas rojas representan el calor que se aplica al tubo de reacción por el módulo calentador. El cuadro gris y el rojo representan un imán de barra que se sube y baja para entrar en contacto con el tubo de

reacción de cada tira de extracción, cargado dentro de la gradilla de muestras.

Para iniciar el proceso, el instrumento transfiere un volumen fijo de la muestra preparada para el tubo de extracción para rehidratar los reactivos de extracción. Después de la rehidratación, la mezcla se transfiere al tubo de reacción. A continuación, se aplica calor al tubo de reacción y las células de la muestra se lisan, liberando el ADN.

El ADN presente en la muestra se une a las partículas magnéticas que han sido recubiertas con una matriz de afinidad de ADN. La barra magnética se eleva e inmoviliza el ADN vinculado a las partículas magnéticas. El sobrenadante se aspira del tubo.

El imán se aleja y provoca la liberación de las partículas magnéticas. El imán se eleva, con las partículas magnéticas y el DNA unidas a ellas. El sobrenadante se retira del tubo y el imán reduce su potencia.

El ADN liberado se transfiere desde el tubo de extracción al tubo cónico de las tiras de reacción, donde se llevará a cabo el análisis PCR.

El sistema de extracción viene con los parámetros básicos configurados de fábrica con lo que el usuario solo puede seleccionar, por ejemplo, la altura de la pipeta de toma de muestra o la cantidad de muestra que recogen las pipetas. Comprobar

La configuración inicial del proceso de extracción del BDMAX® sería la siguiente:

Tiempo calent. lisis	Temperatura lisis
Altura punta pipeta	Volumen muestra
Volumen lavado	Volumen neutralizac
	DNase Heat Time
	10
	1600
	500

Fig. 10: Configuración del proceso de extracción del BD MAX

La mix que se utiliza para el procedimiento completo varía con respecto a la de solo PCR que vimos anteriormente ya que los propios cartuchos de extracción incluyen los reactivos.

La mix utilizada para la detección de H.pylori en, por ejemplo, 12 muestras de biopsia gástrica es:

Componente	Volumen para 12 muestras (μ l)
Agua grado PCR	100
BD Primer and Probe diluent	25
Forward Primer	12,5
Reverse Primer	12,5
Sonda	6,25

En nuestro caso al detectar al mismo tiempo tanto el H.pylori como la Resistencia a Cla, la combinación de primers y sondas para, por ejemplo 12 muestras de biopsia gástrica sería:

Componente	µl
H2O GRADO PCR	99,6
Primers and probes diluent (P/P dil)	24,96
Primer Forward URE	6,24
Primer Reverse URE	6,24
Forward primer ClaRes FP2143G	6,24
Reverse primer ClaRes RP1	6,24
Sonda URE	3,12
Sonda S2	3,12

Hemos utilizado para la detección de *H.pylori* y la resistencia a la Cla los canales, FAM 475/520 con rango de excitación 464-490 y rango de emisión 510-530 para el *H pylori* y para la resistencia a Cla, el canal TET 530/565 con rango de excitación 520-540 y rango de emisión 559-571.

Hemos centrado el trabajo en el canal TET para la resistencia, con los primers FP2143G y RP1 y la sonda S2 ya que es la más habitual en nuestra área sanitaria y es más eficiente tanto en señal como en coste.

3.8. Procesamiento de muestras en Maldi Tof

Se procesan 92 muestras en placa positivas de *H.pylori* en el sistema Maldi Tof de Bruker Corporation® para realizar un estudio taxonomico y cluster.

Se sigue el protocolo del fabricante, depositando una pequeña cantidad de la cepa en la placa aportada por el sistema y 1µl de solución matriz (α -Cyano-4-hydroxyciamin acid). Se deja secar y se introduce la placa en el sistema.

Antes del test se realiza la calibración del sistema con el patrón estándar, Bruker Bacterial Test (BTS). Se añade 1µl de BTS en la posición 1 de la placa y se deja secar a temperatura ambiente. Se añade 1µl de matriz sobre el BTS.

3.9. Endoscopia digestiva alta

Los 201 pacientes fueron sometidos a endoscopia digestiva superior. La muestra de biopsia fue colocada directamente en un medio de transporte estéril con 1 ml de solución salina para evitar su desecación. Se envían de forma inmediata al laboratorio de microbiología para el crecimiento en placa de *H. pylori*, donde es sembrada como máximo a la hora siguiente de su recepción en el servicio.

3.10. Procesamiento de biopsias gástricas

Las muestras de biopsia se homogeneizaron en un mortero de vidrio esterilizado y sumergidos en suero. Para la siembra de *H. pylori*, las biopsias fueron extendidas sobre las superficies de las placas de agar sangre, Columbia, Muller Hinton, Schadler y Agar Pylori suplementado con 5% de eritrocitos de oveja (Becton Dickinson, Heidelberg,

Alemania). Por lo menos 100 μ l de la muestra se conservan en un bote de 1 ml estéril a -80 grados centígrados.

Las placas, se introducen en una jarra de anaerobiosis en un entorno microaerofílico (concentración de oxígeno 7 a 10%; concentración de CO₂, 20%) creado por un sistema controlado por microprocesador (Advanced® Anoxomat®, Advanced Instruments Inc) y se incubaron durante 5 a 10 días en estufa a 37 grados centígrados.

Microorganismos *H. pylori* se identificaron por morfología de las colonias; aspecto típico en la tinción de Gram, naranja de acridina y ureasa, oxidasa, catalasa positivos.

Se descongelan las muestras conservadas a -80 grados y se introducen en el tubo de muestra 11 μ l del suero que rodea a la muestra directamente con una pipeta estéril en campana.

3.11. Las pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se estudió la sensibilidad a amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, claritromicina, rifampicina y ciprofloxacino. En el caso de los dos primeros se utilizó la difusión en disco y para el resto E-test® (E-Test®, Biomerieux). Se realizan en placas de Agar sangre, una para los discos de amoxicilina y tetraciclina y una para cada E-test. Las placas fueron inoculadas con torunda por toda la placa y posteriormente se depositaron los discos o el E-test®. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5-10% de CO₂ y 95% de humedad. A los tres días de

incubación se realizó una primera lectura y a los cinco días la lectura definitiva.

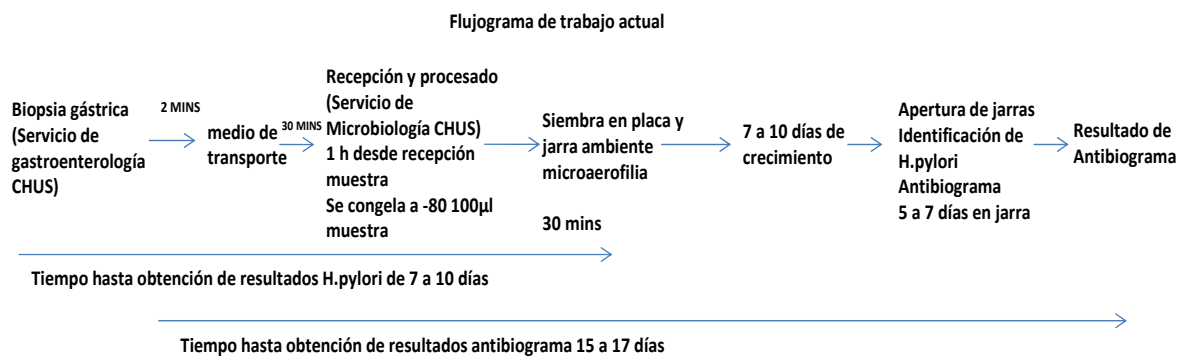
Para las pruebas de sensibilidad claritromicina se realiza por E-test®, las colonias homogenizadas se inoculan con una torunda en placas de Columbia, Schadler, Muller Hinton y Agar Pylori. Antes de que se apliquen las tiras de E-test® sobre la superficie de agar con unas pinzas esterilizadas, se deja que durante 5 min el inóculo se sea absorbido. Las placas inoculadas se incubaron en microaerofilia en estufa a 37 ° C durante 5 días.

Se usaron los puntos de corte establecidos por la CLSI (CLSI 2009) y otras publicaciones previas. Las cepas fueron consideradas resistentes si tenía una CMI >2mg/L para amoxicilina; CMI>4mg/L para tetraciclina; CMI>8mg/L para metronidazol; CMI>1mg/L para claritromicina; CMI>4mg/L para ciprofloxacino y CMI>32mg/L para rifampicina. Las cepas fueron consideradas de sensibilidad intermedia a claritromicina y ciprofloxacino sí tenían una CMI=0.5mg/L y CMI=2mg/L, respectivamente (Procedimientos SEIMC).

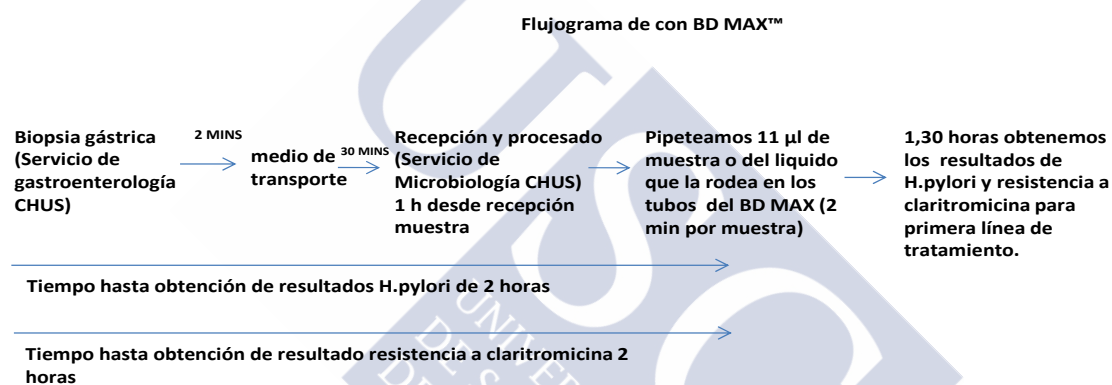
3.12. Flujo de trabajo biopsias gástricas

Vamos a señalar de forma esquemática el flujo de trabajo desde que se obtiene la biopsia hasta que obtenemos los resultados:

Flujo de trabajo actual en el laboratorio se puede analizar de forma esquemática en el gráfico inferior:



El flujo de trabajo con el BD MAX™ es el siguiente:



3.13. Muestras de heces

Se reciben en el laboratorio muestras de heces de toda el área sanitaria de Santiago y se han analizado 500 muestras. Las muestras de heces se reciben en un bote de orina, estéril, sin conservantes ni medios de transporte, en un máximo de 24 horas desde su toma de muestra. En muchos casos debido a la imposibilidad de procesar el gran volumen de muestras que se reciben en el laboratorio, las muestras se mantienen en nevera a 4-5 grados centígrados durante un máximo de 2 días para su posterior análisis.

Una vez la muestra es recibida, se procesa parte de la muestra por antígenos presentes en heces, mediante el test rápido de detección *H.pylori Card*® (Materlab, Ref: M306PG) que representa un método no invasivo basado en la inmunocromatografía para la detección cualitativa de antígenos en heces.

Se toman unos 2 gr o ml de heces (según estado de la muestra clínica) y se procesa según marca el fabricante, se retira la *H.pylori card* de su envase estéril y se agita el vial con la muestra para asegurar su correcta dispersión. Se rompe la parte superior del vial. Se dispersan 5 gotas del vial en el pocillo de muestra y se deja durante 10 minutos para obtener el resultado.

Una vez pasados 10 minutos, tendremos disponible el resultado (positivo, dos líneas rojas en la consola de resultados).

Una vez obtenemos el resultado positivo procesamos una muestra de heces en el BD MAX™.

Se testan tanto heces positivas por inmunocromatografía, como negativas, a las que añadimos *H.pylori* en dilución.

El estudio de detección de *H.pylori* en el BD MAX™ en heces, se lleva a cabo de 4 formas diferentes:

- 10 µl de muestra con un asa de siembra directamente en tubo de muestra (SPC),

- dilución de la muestra de heces en agua grado PCR e introduciendo 10 µl con una pipeta con puntas estériles,
- muestra directa más spike de una dilución 0.5 McF de H. pylori
- En una 0.5 McF se diluye muestra de heces.

El protocolo para la dilución de heces ha seguido el siguiente: diluimos 40 µl de la muestra en 3 ml de agua estéril, lo centrifugamos 10 minutos a 12,9 rpm y tomamos 10 µl con una pipeta para introducir en el tubo de muestra.

El kit de utilizado para el análisis en heces es el DNA-4, que es el recomendado por la fábrica para las detecciones de microorganismos en heces.

3.14. Muestras orales

Las muestras orales se toman en la clínica dental del centro de salud JR Meilán de La Coruña durante los meses de septiembre a diciembre de 2015 a 100 pacientes. Se toman las muestras a todos los pacientes que acuden a la consulta excepto a aquellos con menos de 10 piezas dentarias en boca, con tratamiento antibiótico o con inhibidor de bomba de protones 2 meses antes de la toma de muestra. Se dividen en sanos, con enfermedad periodontal y con dispepsia.

Se toman en 3 localizaciones:

- Dorso lingual

- Primer molar inferior, límite amelocementario
- Saliva

En caso que el paciente carezca de molares inferiores se tomará la muestra en la pieza sana más cercana.

Las muestras de saliva, lingual, y supragingival se toman con un hisopo estéril sin medio de transporte (Eurotubo® Collection swab) y con una cureta estéril para obtener muestra de placa (Hu-Fredy®) y se introducen en nevera para su procesamiento en un máximo de 12 horas.

Se siembran en tres placas Muller Hinton, Columbia y Sabouraud por duplicado y se dejan en estufa de a 5 a 7 días tanto en aerobiosis como anaerobiosis.

Se introducen las muestras en el tubo de muestra del BD MAX de forma directa. En campana estéril se retiran de la nevera los tubos de muestra se atemperan durante 30 minutos y se introducen en el tubo de muestra, se vortea durante 20 segundos y se cierran los tubos. Se dejan tanto la torunda estéril en el interior del tubo. No es necesario retirar los hisopos.

3.15. Muestras parafinadas

Se reciben 100 muestras parafinadas del servicio de microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña (CHUAC) (Dr. Angel Concha, Jefe de Servicio).

Se llevan a cabo diferentes sistemas de desparafinización y extracción de ADN.

En el primer sistema utilizado se realiza el siguiente proceso de desparafinización:

- 1- Se deposita una sección seleccionada de 5 micras de tejido en un tubo eppendorf rotulado con 500 μ l de xileno. Mezclar por vórtex durante 10 segundos.
- 2- Se incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3- Se añaden 500 μ l de etanol absoluto, y se mezcla por vórtex durante 10 segundos.
- 4- Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5- Se centrifuga a 16.000-20.000 g durante 2 minutos, se descarta el sobrenadante sin tocar el pellet.
- 6- Se añade 1 ml de etanol absoluto y se mezclan por vórtex durante 10 segundos.
- 7- Se centrifuga a 16.000-20.000 g durante 2 minutos y se descarta el sobrenadante sin tocar el pellet.
- 8- Se seca el pellet en un termobloque (Biometra® TB2) a 56°C durante al menos 10 minutos, con los tubos abiertos, hasta que se evapore el etanol.
- 9- Se resuspenden en 180 μ l de DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) y 70 μ l de PK.

Una vez las muestras son desparafinadas se resuspenden en agua grado PCR y se introducen en el SPC, tanto el agua grado PCR como directamente la muestra desparafinada.

Así mismo, se procesan 20 muestras parafinadas para su desparafinización y extracción de ácidos nucleicos en el sistema Mag Core® Hf 16 plus de la compañía RCBioscience®. Se utiliza el programa de 16h de duración para la extracción de ADN en muestras parafinadas en el servicio de Microbiología (Hospital Alvaro Cunqueiro) del Complejo Universitario de Vigo.

Las muestras se conservan en nevera y se introducen en el sistema BD MAX del Complejo Universitario de Santiago al día siguiente en modo PCR.

3.16. Medición de tiempos y costes de detección con BDMaX™

Se realiza una comparativa de tiempo y coste con los sistemas de biología molecular disponibles en nuestro laboratorio. Se compara con Microscan™ (Siemens España SA) y con MagNapure™ (Roche™ Diagnostics™). De forma paralela a los experimentos, se lleva a cabo, una medición de tiempos de trabajo de los técnicos y del BDMaX™ y de las otras plataformas, para conocer el coste operativo del sistema y de los costes asociados en personal y material.

Se utiliza un cronómetro, técnica observacional y un estudio del coste de materiales.

4. RESULTADOS





4. RESULTADOS

4.1. Dendograma y cluster de muestras

Se analizan en el sistema Maldi Tof ® (Bruker Corporation) una muestra representativa de cultivos positivos de las muestras analizadas siguiendo el protocolo del fabricante.

Se analizan las muestras positivas con crecimiento en placa con el objetivo de realizar un análisis taxonómico de las diferentes cepas de H.pylori.

Una vez obtenemos los resultados del análisis procedemos a realizar el dendrograma con el programa aportado por el fabricante Maldi Biotyper 3.

Seleccionamos aquellos resultados deseados y obtenemos el análisis taxonómico de las muestras y la existencia de clusters destacables.

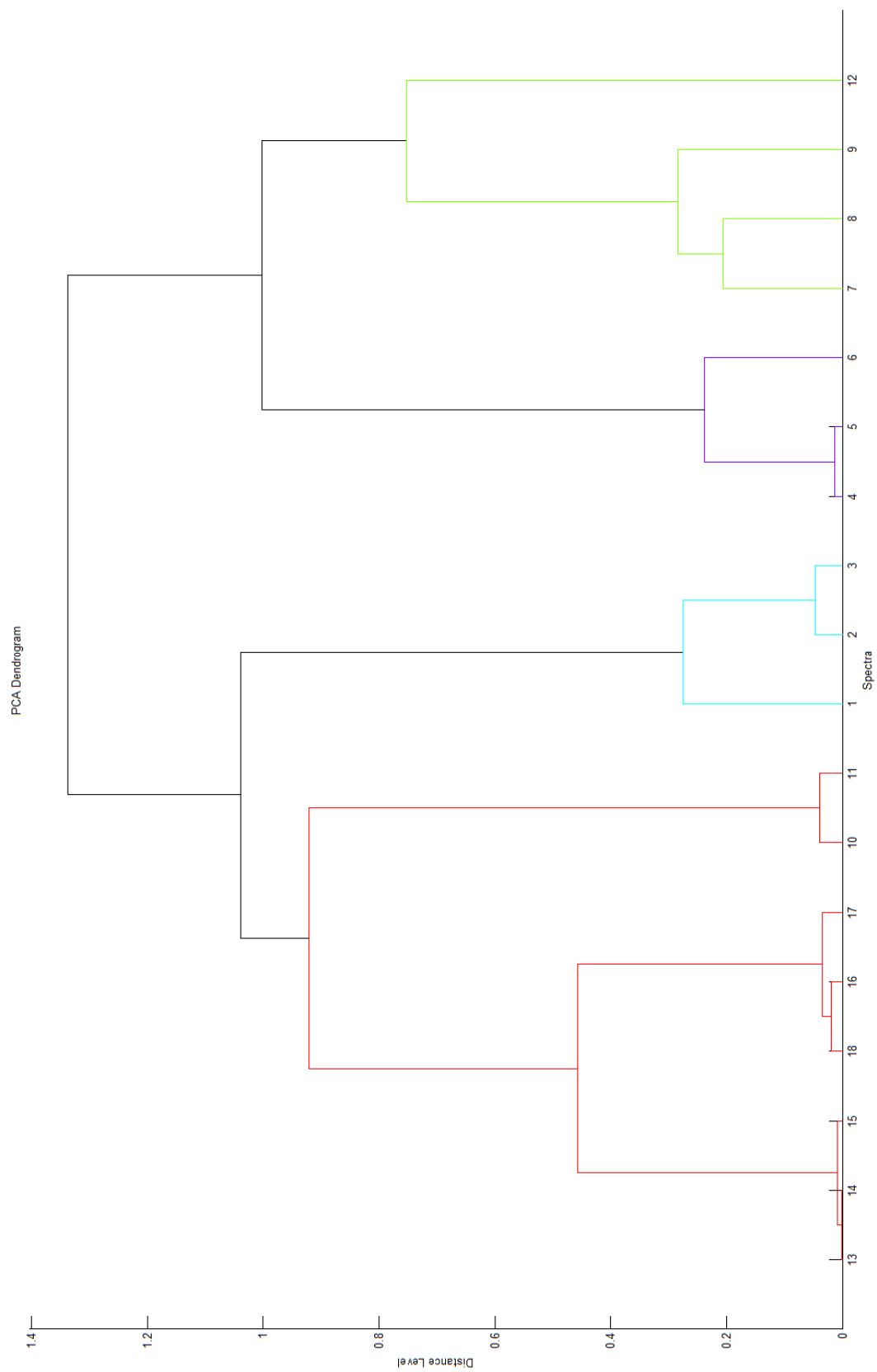


Fig. 11: Resultado obtenido en el MALDI-TOF dendrograma. Hospital Clinico Universitario de Santiago

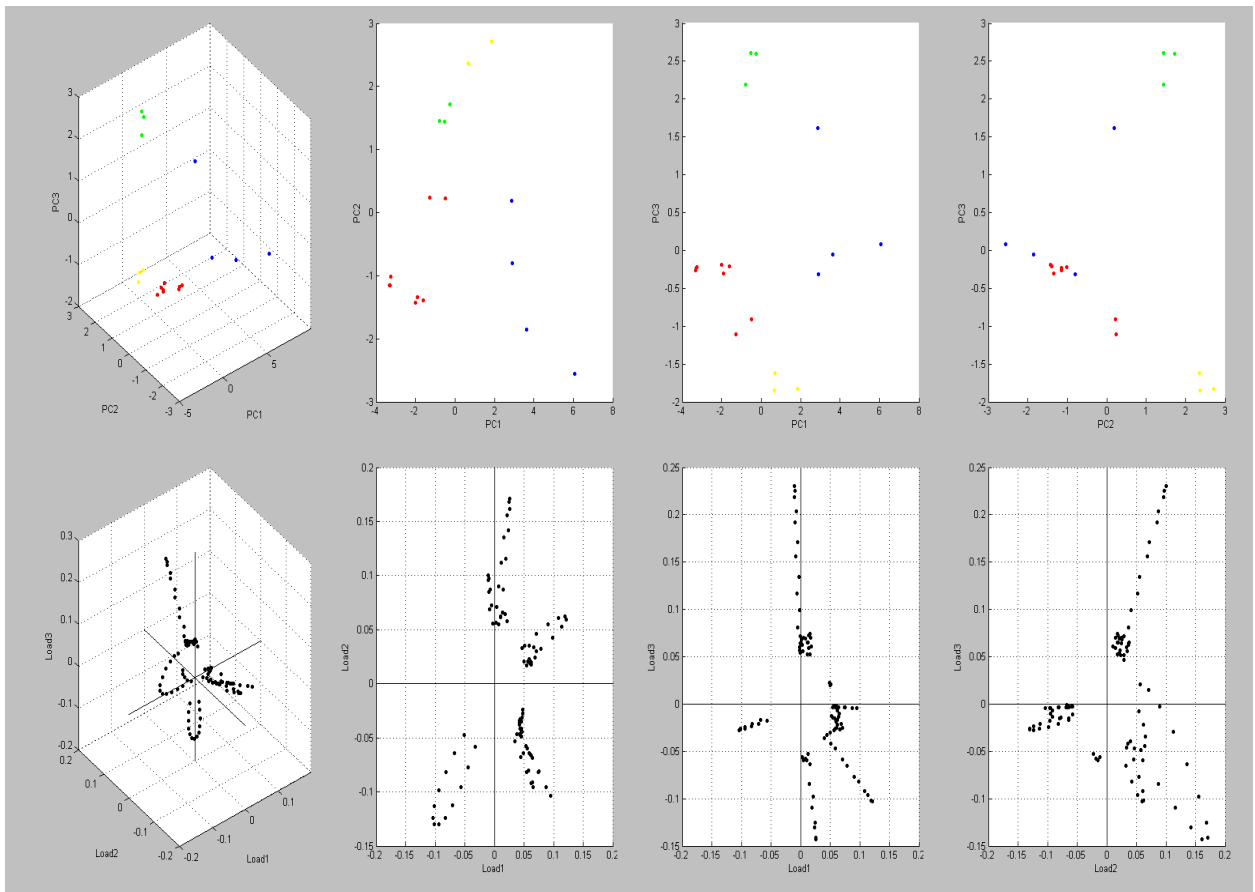


Fig. 12: Resultado obtenido en el MALDI-TOF dendrograma. Hospital Clinico Universitario de Santiago

4.2. Biopsias gástricas

Se estudiaron 201 muestras de biopsia gástrica obtenidas de pacientes con sintomatología gástrica del servicio de gastroenterología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS). Se llevó a cabo la extracción y PCR en tiempo real (RT-PCR) con el sistema BDMax™ con el fin de detectar la presencia de *H. pylori* y sus mecanismos de resistencia, en particular, la resistencia a claritromicina. Un total de 105 muestras (52,23%) de las 201 biopsias incluidas en este estudio fueron positivas para *H. pylori* en pruebas fenotípicas. Un total de 95 (47,26%) muestras de las 201 recibidas fueron negativas para *H. pylori* en pruebas fenotípicas. El análisis para estas muestras con el sistema BDMax™ de estas 201 muestras arrojó datos discordantes en la detección de *H. pylori* en 6 casos (2,98%) siendo 3 falsos positivos (1,49%) y 3 falsos negativos (1,49%) para la detección de *H. pylori*.

TOTAL MUESTRAS	FALSOS +	FALSOS -
201	3	3
	13-99485	13-065146
	13-065146	14-149900
	14-105168	15-72202

Tabla 7: Cuadro resumen del total de muestras y los resultados discrepantes

Para el estudio de la resistencia a Cla obtenemos 8 resultados discrepantes entre las pruebas fenotípicas y las pruebas moleculares, lo que corresponde a un 3,98% del total de muestras.

En total hemos obtenido unas 14 muestras discrepantes entre ambas técnicas, 6 correspondientes a la detección de H.pylori y 8 correspondientes a la detección de la resistencia a Cla.

Sobre el total de muestras existen un 26% de muestras resistentes a Cla y un 73 % sensibles a claritromicina.

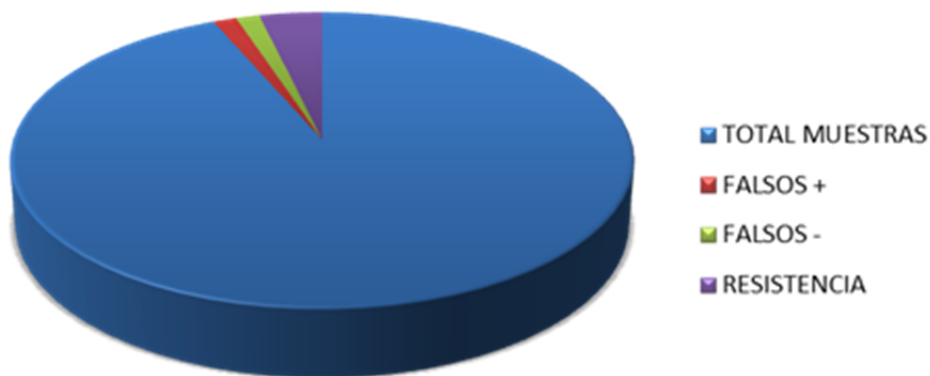


Gráfico 1: Representación gráfica de la distribución de resultados

En cuanto al estudio de la sensibilidad y especificidad de la técnica para la detección de H.pylori en biopsia gástrica se divide en dos. Por una parte el estudio de especificidad y sensibilidad para la detección de H.pylori y por otra la especificidad y sensibilidad para la detección de la resistencia a Cla.

La sensibilidad de la técnica para la detección de H.pylori en muestras clínicas de biopsia gástrica, se obtienen 100 verdaderos positivos y 23 falsos negativos lo que resulta en una sensibilidad del 97%. La especificidad de la técnica para la detección de H.pylori, con 95 verdaderos negativos y 3 falsos positivos, resulta una especificidad del 97%.

El estudio de la sensibilidad y especificidad, para la técnica de detección de la resistencia a Cla, obtenemos 48 verdaderos positivos y 5 falsos negativos para un total del 91% de sensibilidad. Con 145 verdaderos negativos y 3 falsos positivos obtenemos una especificidad del 98%.

UREASA		RESISTENCIA	
<i>SENSIBILIDAD</i>		<i>SENSIBILIDAD</i>	
VP	100	VP	48
FN	3	FN	5
TOTAL	97%	TOTAL	91%
<i>ESPECIFICIDAD</i>		<i>ESPECIFICIDAD</i>	
VN	95	VN	145
FP	3	FP	3
TOTAL	97%	TOTAL	98%
	201		201

En cuanto al estudio de los valores predictivos, para ambas detecciones observamos unos resultados sólidos para la técnica. Para la detección del H.pylori obtenemos un valor predictivo positivo (VPP) del 97% y un

valor predictivo negativo (VPN) de, también, 97%. Para la detección de la resistencia a Cla, obtenemos un VPP del 94% y un VPN del 97%.

VPP H.pylori	97%
VPN H.pylori	97%
VPP ClaRes	94%
VPN ClaRes	97%

Tabla 9: Cuadro resumen de los valores predictivos de la técnica.

Ejemplo de resultados en la pantalla del sistema BDMaX®:

Posición	Nombre del test	Código de barras	ID del paciente	Resultado	CT 475/520	CT 530/565	CT 585/630	CT 630/665	CT 680/715	Conc.
Estatus de SP		Estatus de PCR	Nº acceso		Desnaturaliz 475/520	Desnaturaliz 530/565	Desnaturaliz 585/630	Desnaturaliz 630/665	Desnaturaliz 680/715	Unidades de conc.
Código de barras del lote										
A1	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215BH33		NA	-1	-1	-1	-1	29.04	
Success		Success	1		-	-	-	-	-	
A2	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215CB58		NA	-1	-1	-1	-1	29.8	
Success		Success	2		-	-	-	-	-	
A3	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215EC82		NA	27.66	-1	-1	-1	27.76	
Success		Success	3		-	-	-	-	-	
A4	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215BJ52		NA	18.29	16.5	-1	-1	23.02	
Success		Success	4		-	-	-	-	-	
A5	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215ED95		NA	17.56	-1	-1	-1	29.2	
Success		Success	5		-	-	-	-	-	
A6	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215BF24		NA	12.66	27.13	-1	-1	29	
Success		Success	6		-	-	-	-	-	
A7	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215ED93		NA	15.5	27.45	-1	-1	28.91	
Success		Success	7		-	-	-	-	-	
A8	HpyloriCompIRESIDNA1	SP2409901620141215BG91		NA	16.77	29.78	-1	-1	29.2	
Success		Success	8		-	-	-	-	-	
Nombre del test	Versión	Tipo de extracción	Formato Master Mix						Tiempo calent. lisis	Temperatura lisis
Notas		Configuración de los canales	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715	Altura punta pipeta	Volumen muestra	
								Volumen lavado	Volumen neutralizac.	
									DNase Heat Time	
HpyloriCompIRESIDNA1	1	ExK DNA-1 (Plasma/Serum)	Type 2: BD MMK or MMK(SPC) and Liquid Primers and Prot						10	37
		Ganancia	40	50	0	0	50	1600	935	
		Umbral	0	0	0	0	0	500	-	
		Ct Min	0	0	0	0	0	-	-	
		Ct Max	0	0	0	0	0	-	-	
		Alias								

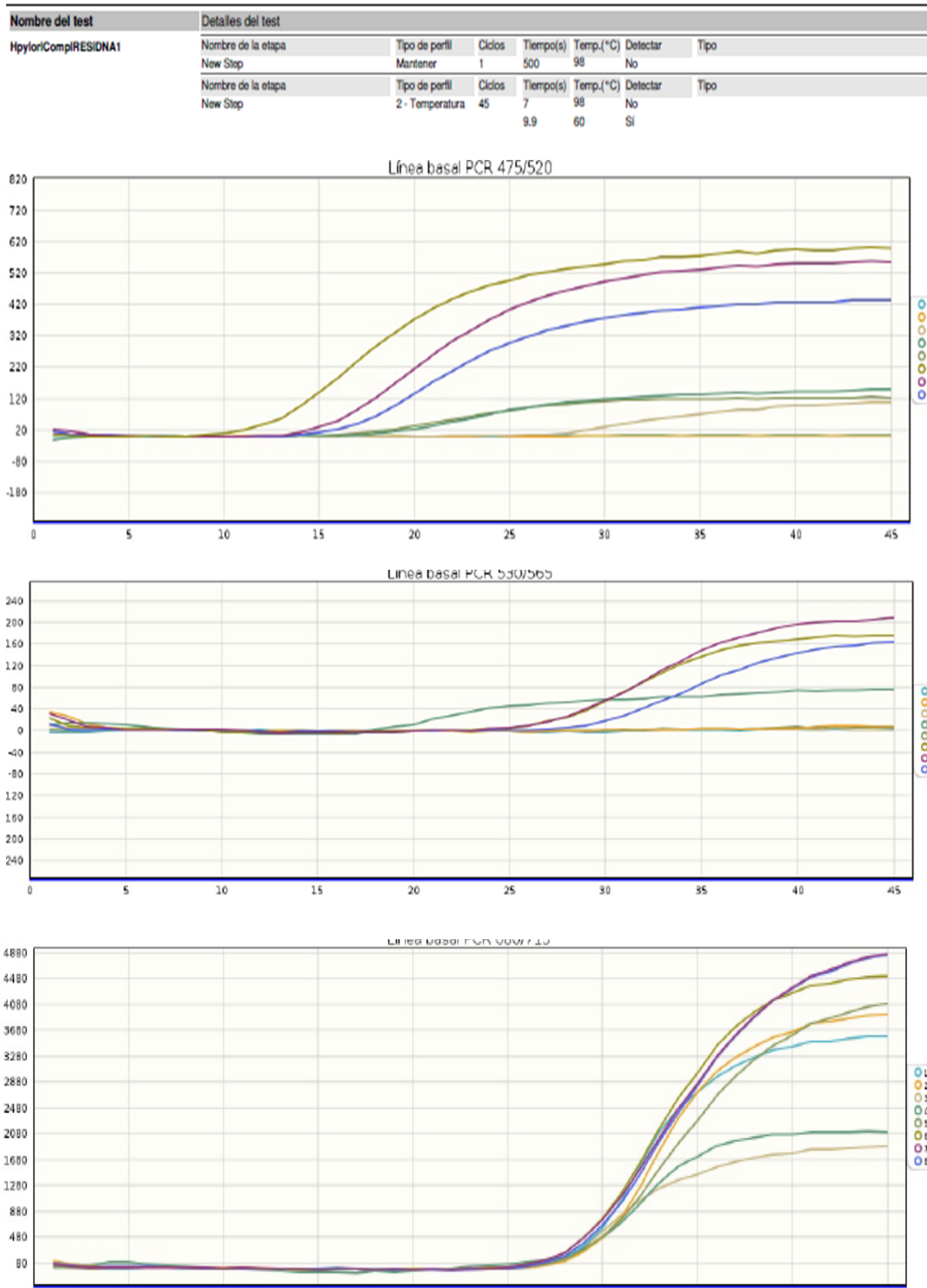


Fig. 12: Ejemplo de pantalla de resultados de un experimento. En la primera pantalla observamos las muestras, el programa que hemos seleccionado, los datos del test, los puntos de corte de las CT's, y las curvas de PCR.

4.2.1. Límite de detección de la técnica

Se diseña un experimento para analizar el límite de detección de la técnica desarrollada (LOD). Se realiza una dilución 0,4 McF de una cepa resistente a Cla crecida en placa y comprobada mediante pruebas fenotípicas con el siguiente protocolo:

- 1- Apertura de placa en crecimiento en estufa comprobada anteriormente por pruebas fenotípicas. (Nº Hº: 136173 positiva, resistente a Cla)
- 2- Se realiza un dilución 0,4 McF en agua grado PCR.
- 3- Se hacen diluciones 1/10 con la secuencia 90 µl de H₂O por 10 µl de la dilución anterior.
- 4- Se siembra en placa Müller Hinton (BD diagnostics™) cada dilución.
- 5- Se introduce en jarra en ambiente microaerofílico (Anoxomat®) a 37° durante un mínimo de 7 días.
- 6- Una vez cumplido el plazo de crecimiento de la bacteria, se procede a la apertura de las jarras de crecimiento y se realiza un conteo manual de unidades formadoras de colonias (UFC).

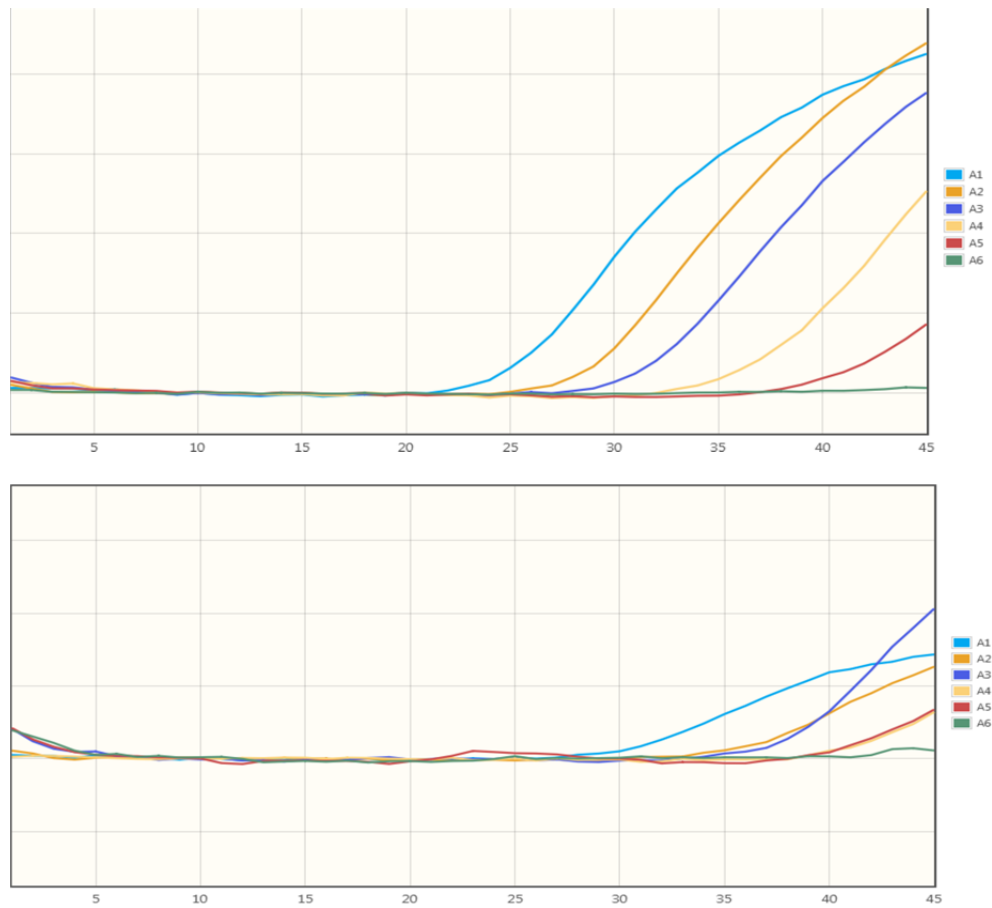


Fig 13: Curvas de PCR del LOD con diluciones 1/10

Dilución NHC: 136137 +,+ 0,4 McF	Colonias
A1	Inc
A2	250
A3	24
A4	2
A5	1
A6	0

Tabla 9: LOD con conteo de colonias. Muestra en placa de H.pylori y resistente a Cla.El conteo de colonias se realiza de forma manual.

En los resultados se observa que obtendríamos señal hasta 2 UFC tanto para la detección de H.pylori como para la resistencia a Cla.

Se lleva a cabo el análisis del límite de detección mediante diluciones seriadas 1/10 de DNA de H.pylori (Amplirun® Helicobacter pylori DNA control, Vircell® Lot. 14MBCO49001) en modo PCR.

Se analizan 30 muestras (10 muestras, 3 replicas por muestra) obteniendo señal hasta la tercera dilución 1/10.

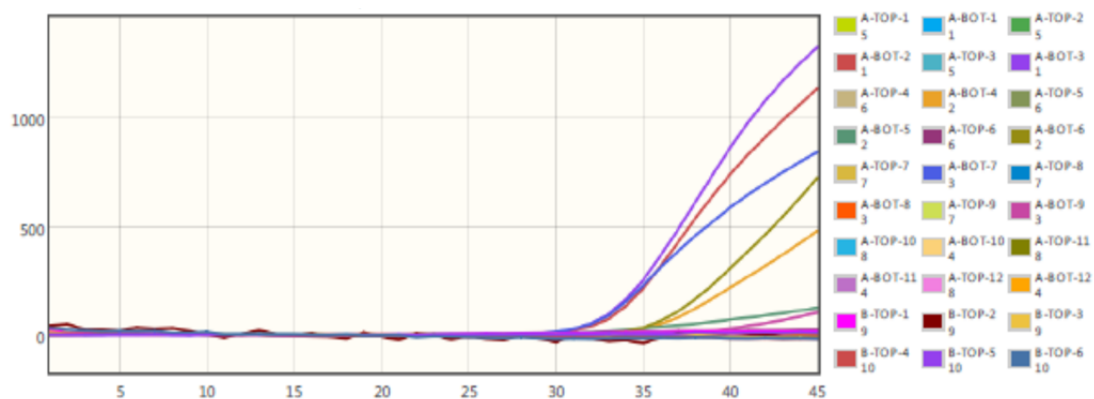


Fig. 14: LOD modo PCR del DNA Vircell®

Llevamos a cabo un tercer test LOD basado en la publicación de Wilrich&Wilrich(431) denominado POD-LOD test.

Realizamos 95 tests en diluciones seriadas, partiendo de una concentración 0,4 McF, configurando el siguiente cuadro de muestras:

Dilution NHC: 136137 +, + 0,4 McF	Colonies UFC/ML	
A2	2500	15 tests
A3	240	15 tests
A4	20	15 tests
A5	10	22 tests
A6	1	20 tests
A7	0,1	8 tests

Tabla 10: Muestras y número de réplicas para el LOD-POD test. El número de repeticiones aumenta a medida que disminuye la concentración.

Existe una aplicación, creada y facilitada por los autores del artículo, donde se introducen los datos del experimento.

Name of experiment:	H pylori POD	
Date of experiment:	25/09/2015	
Sample size A_0 in g or ml:	10	
Total no. of matrices:	1	
Max. no. of contamination levels:	6	
No. of matrix:	1	
Name of matrix/sample reference:	Helicobacter LOD	
Level of inoculum in cfu/g or cfu/ml	No. of inoculated tubes	No. of positive tubes
d	n	y
2500,0	15	15
240,0	15	15
20,0	15	14
10,0	22	19
1,0	20	5
0,1	8	0

Tabla 11: Aplicación creada y facilitada por los autores del artículo. Imagen tomada de la aplicación original. Wilrich & Wilrich: Estimation of the POD Function and de LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J of AOAC International* Vol. 92 No 6, 2009.

Se introduce en la pantalla, las CFUs por ml, el número de tubos o muestras que analizamos y el número de positivos. Lógicamente, habrá un mayor número de positivos en aquellas muestras de más concentración. Aumentamos el número de repeticiones en aquellas muestras de menor concentración para probar la sensibilidad del experimento.

Los resultados del LOD-POD son los siguientes:

Results of the POD-LOD calculation
 For details see: Wilrich & Wilrich, Journal of AOAC International, Vol. 92, No. 6, 2009, 1763-1772.
¹ LOD_{50%} = 50% Limit of detection, ² LOD_{95%} = 95% Limit of detection

No. of matrix	Name of matrix	Matrix effect	SD of log matrix effect	LOD _{50%} ¹			LOD _{95%} ²			Test statistic matrix effect
				Detection limit	conf. limit	conf. limit	Detection limit	conf. limit	conf. limit	
<i>i</i>	<i>matrix_i</i>	<i>F_i</i>	<i>s_F</i>	<i>d_{0.5,i}</i>	<i>d_{0.5,iL}</i>	<i>d_{0.5,iU}</i>	<i>d_{0.95,i}</i>	<i>d_{0.95,iL}</i>	<i>d_{0.95,iU}</i>	<i> z_i </i>
1	Helicobacter LOI	0,019	0,210	3,708	2,436	5,644	16,026	10,530	24,392	8,670
Combined data		0,019	0,210	3,708	2,436	5,644	16,026	10,530	24,392	8,670

Tabla 12: Aplicación creada y facilitada por los autores del artículo. Imagen tomada de la aplicación original. Wilrich & Wilrich: Estimation of the POD Function and de LOD of a qualitative microbiological measurement method. J of AOAC International Vol. 92 No 6, 2009.

Los resultados indican que con un 50% de confianza los límites en los cuales obtendremos resultados serán, entre 5,64 y 2,46 CFUs con una media de 3,70 CFU/ml. Con un 95% de confianza los límites superior e inferior en los que obtendremos señal serán 10,530 y 24,392 CFUs con una media de 16,026 CFU/ml.

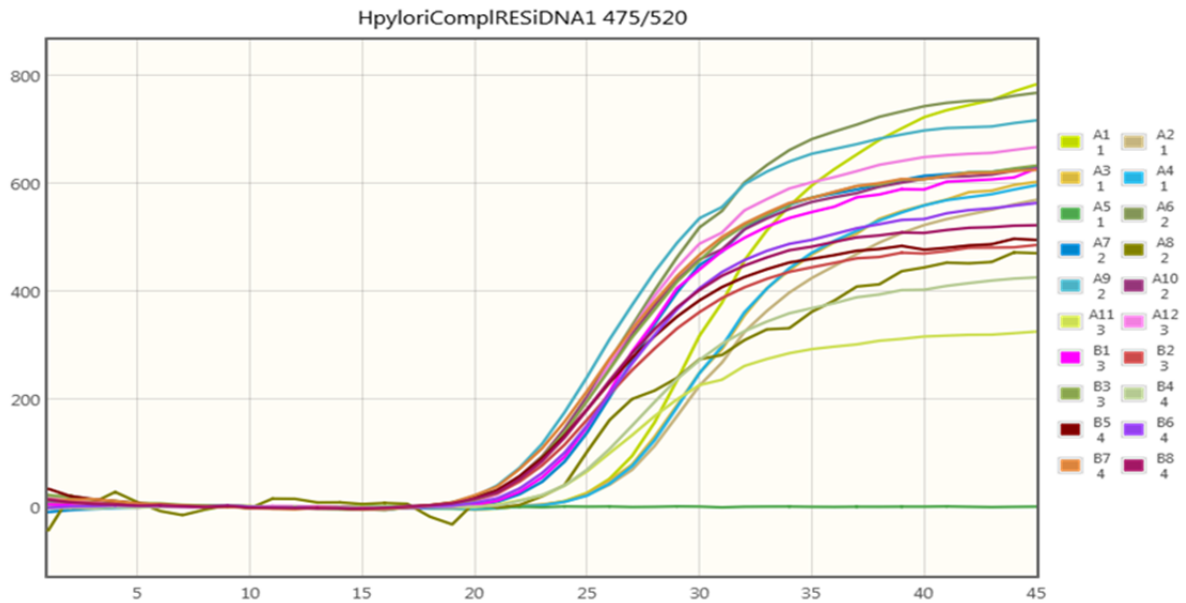


Fig 15: Curvas del experimento POD-LOD

4.3. Analisis en heces

Las muestras de heces representan para el clínico una muestra no invasiva y su obtención, aunque en algunos pacientes es desagradable, ha demostrado ser sencilla y económica.

Se recibieron y analizaron 500 muestras de heces.

Se comienza con un análisis de 12 muestras donde se combina una dilución 0,2 a 0,4 McF de H.pylori con heces positivas por Inmunocard® diluidas en agua grado PCR y una dilución de heces positivas en una dilución de 0,2 McF de H.pylori para asegurarnos la presencia de bacteria. Se continúa con heces positivas introducidas en el tubo con una asa de 10 µl y diferentes cantidades tanto en el asa como en la cantidad introducida en el tubo de muestra (SPC). En todos los casos en que la muestra contenía heces, sean diluidas o introducidas con el asa

de siembra en el SPC, hemos encontrado una ausencia de resultados e inhibición de los controles internos. Se prueban también varios sistemas para purificar la muestra, suspensión, filtrado o purificaciones de DNA. Comenzamos con el siguiente protocolo obteniendo una ligera pero insuficiente mejoría:

- Dilución de heces (4 asas de 10 μ l) positivas en 950 ml de agua grado PCR.
- Vortex de 1 minuto
- Centrifugado de 10 minutos a 12,9 RPM

Con este protocolo obtenemos una señal de detección débil pero eliminamos la inhibición del control interno. Se prueba también con sistema de extracción MagnaPure® y PCR en BDMAX® pero tampoco se obtiene señal.

Probamos otro protocolo, utilizando el Kit de extracción de DNA de Qiagen® (QIAamp® DNA Stool mini kit) como paso previo para la purificación de las muestras y la extracción de DNA pero tampoco se obtiene señal. Se utiliza el mismo kit de extracción pero adaptando el protocolo, con el objetivo de eliminar las inhibiciones que provocan las heces, y por una parte añadimos a nuestra muestra las pastillas incluidas en el kit INHIBIT EX® y en por otra parte añadimos el buffer de Proteinase K®. En ambos casos el resultado fue el mismo.

Con el fin de comprobar el efecto que la cantidad introducida en el tubo SPC de heces produce en la señal resultante, diseñamos un experimento en el que, realizamos diluciones seriadas de heces con una cantidad fija de McF de H.pylori. El resultado del experimento muestra claramente que a medida que las heces van desapareciendo de la muestra, va aumentando la señal y se elimina la inhibición de la señal de los controles internos.

Diseñamos un experimento para comparar el funcionamiento del kit DNA-4 específico para heces con el DNA-1 para plasma o suero, para muestras de heces, demostrando los resultados que el comportamiento del kit de DNA-1 es superior al del DNA-4, a pesar de no ser el específico para las heces.

El protocolo final para heces, cambiando el del fabricante, queda como sigue:

- 1- Kit para heces: DNA-1.
- 2- Se utilizará para introducir las heces directamente en el SPC el asa de 1µl.
- 3- Se podrá diluir previamente las heces en agua, que se hará en 1ml de agua.

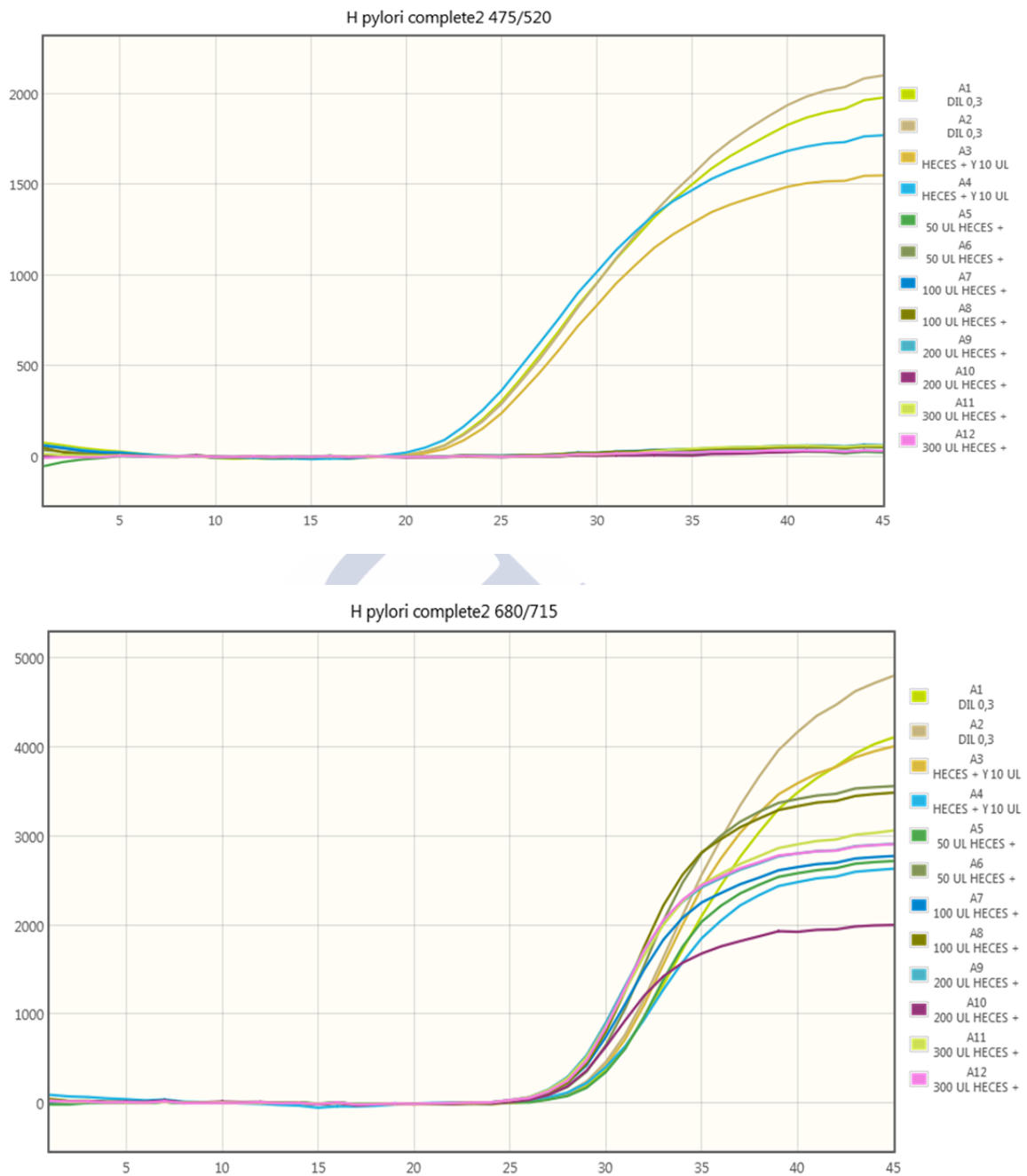


Fig 15: Ejemplo de los resultados obtenidos en las muestras heces.

Con todos los cambios introducidos en el protocolo de heces en el BDMax™, hemos logrado eliminar la inhibición de los controles internos (a pesar de introducir grandes cantidades) y obtener señal en las heces diluidas en una McF de H. pylori.

4.4. Muestras orales

De los 100 pacientes analizados, siguiendo el protocolo descrito, no hemos obtenido señal que podamos dar como positiva. Si se ha observado un ligero aumento en la curva en las muestras de los molares inferiores al nivel del límite amelocementario, pero no se puede afirmar que sean positivos claros.

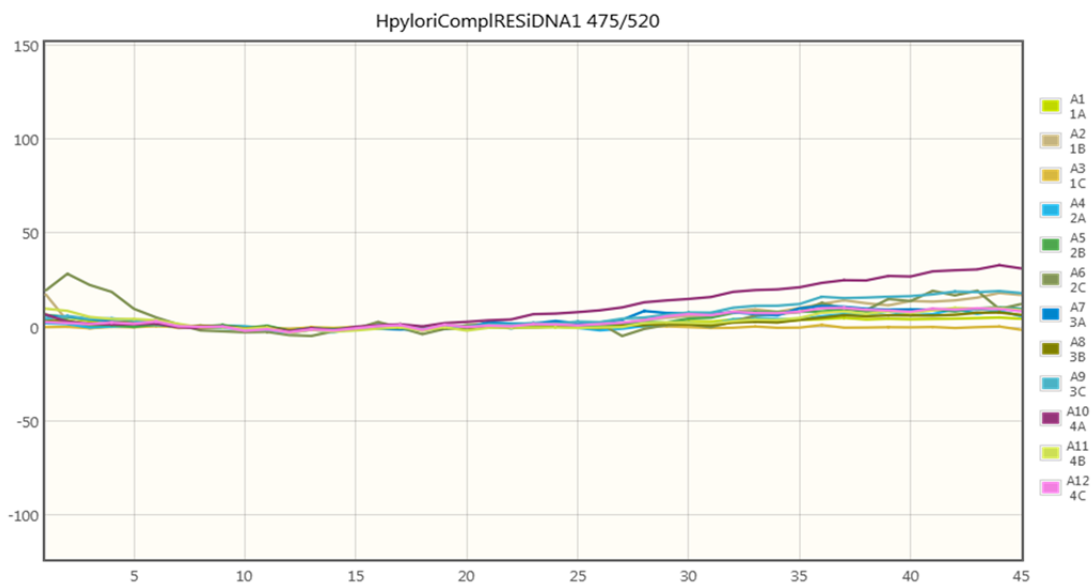


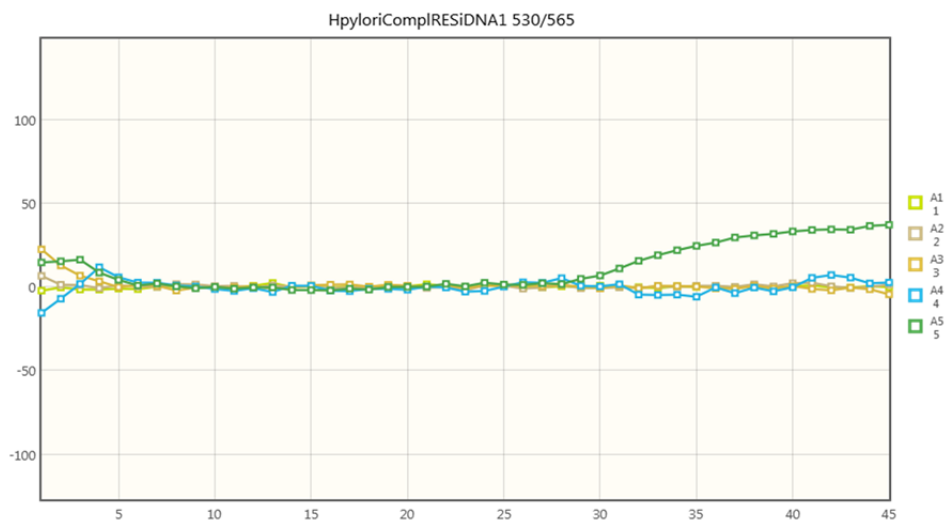
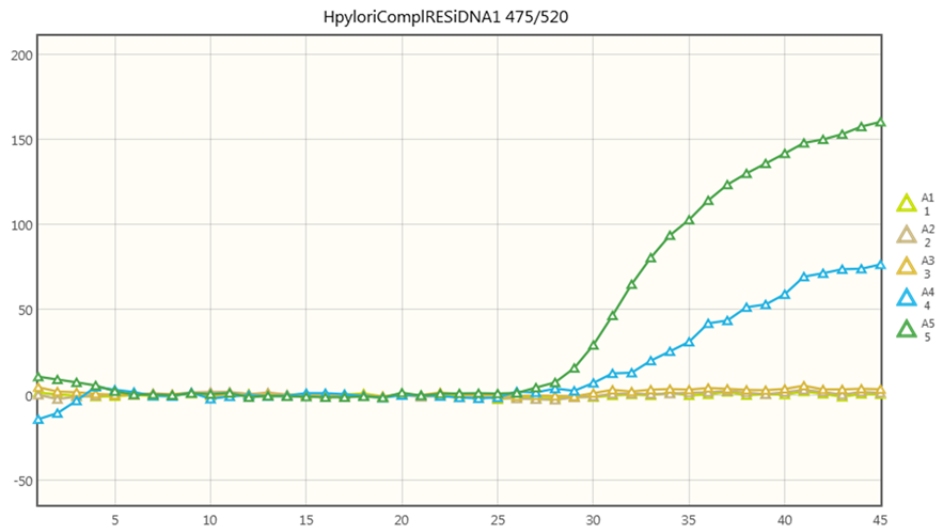
Fig. 16: Ejemplo de los resultados obtenidos en las muestras orales.

4.5. Muestras parafinadas y desparafinadas

Analizamos muestras desparafinadas por diferentes sistemas:

En el primer sistema, se observa que al introducir el DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB Qiagen™ ATL) y 70 µl de LPK (punto 9 del protocolo descrito), además de que los resultados son falsos negativos, inhiben los controles internos. Por ello, eliminamos el último paso del protocolo y lo sustituimos por:

- 1- Rehidratamos la muestra con suero fisiológico.
- 2- Utilizamos lisis mecánica con MagnaLyser™ (Roche Diagnostics™) y las rehidratamos con suero fisiológico.



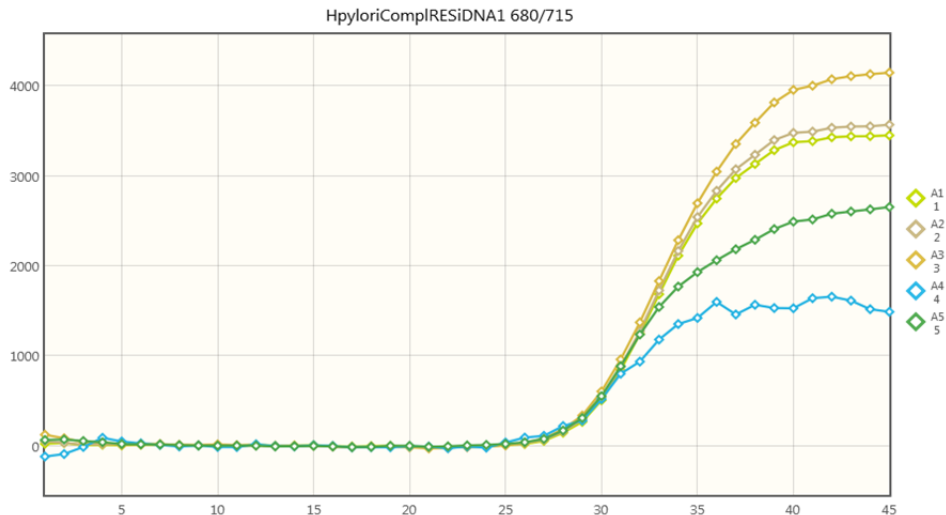


Fig. 17: Ejemplo de los resultados obtenidos en las muestras desparafinadas.

En los resultados se observa como las muestras A1, A2 y A3 que son las desparafinadas y, a pesar del nuevo protocolo, no tienen señal y las A4 y A5 que son muestras que de biopsia normal, si obtienen señal. Lo que si se ha evitado es la inhibición de los controles internos.

En el segundo sistema de desparafinización y extracción, se utiliza el sistema automatizado Mag Core Hf 16 plus®. Se realiza en el Complejo Universitario de Vigo. Se utiliza el sistema de extracción para muestras de tejido parafinadas de 16 horas de duración.

Se introduce el ADN obtenido en el sistema BDMAX en modo PCR.

Los resultados son positivos, obtenemos señal en las muestras positivas.

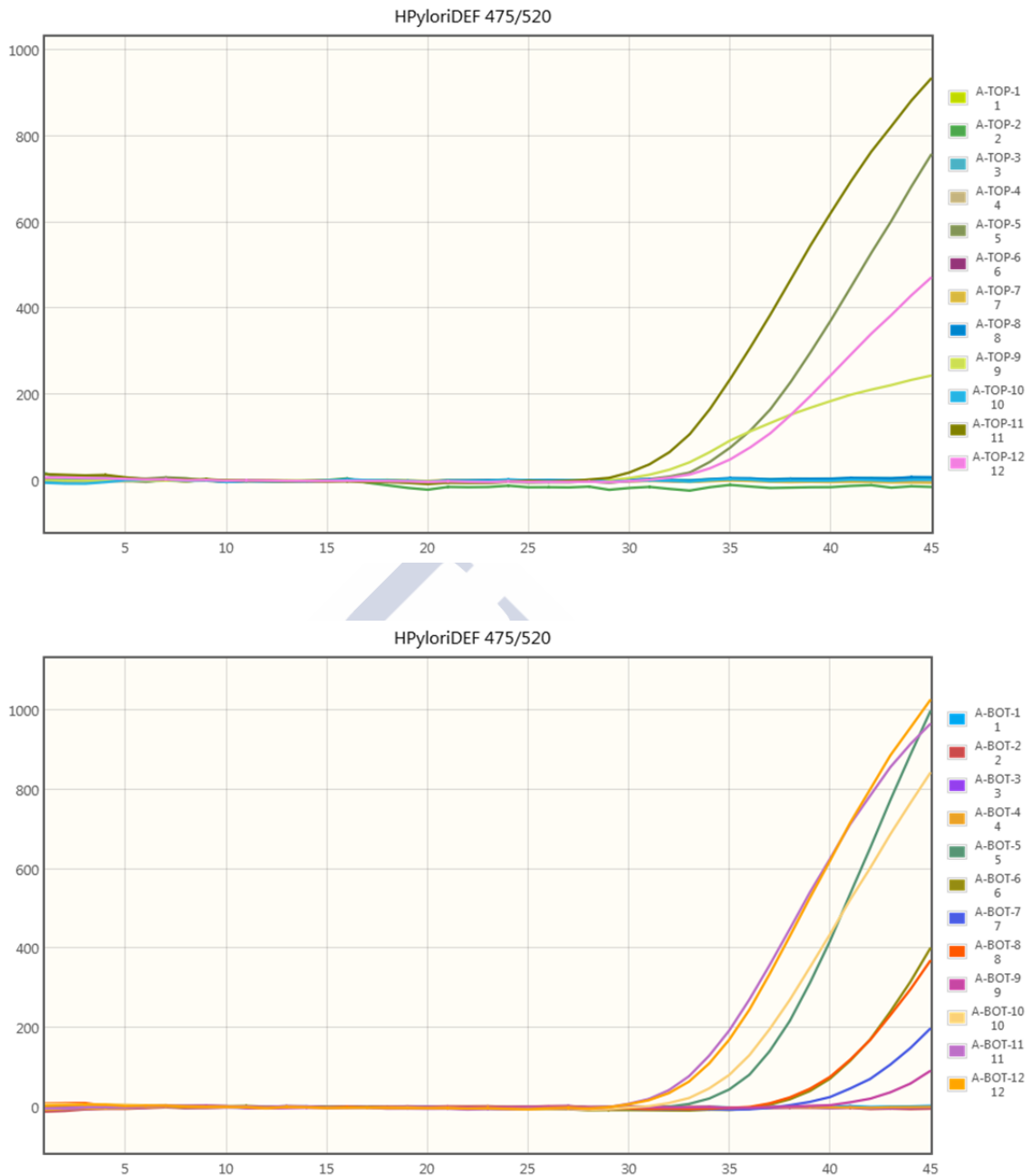


Fig. 18: Extracción en MagnaCore® y PCR en BDMAX®.

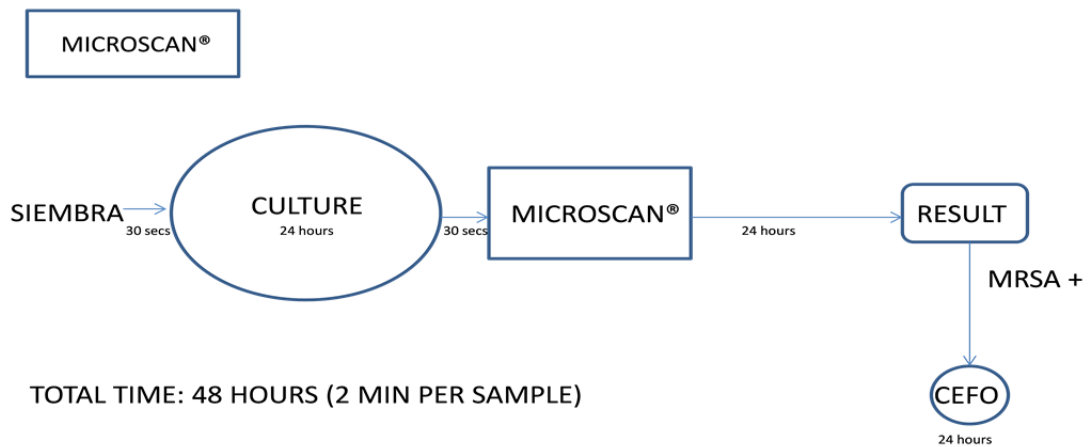
4.6. Medición de tiempos y costes de detección con BDMaX™

Se lleva a cabo de forma paralela un estudio de tiempos de trabajo y coste de los principales sistemas de detección presentes en el laboratorio de microbiología de CHUS, para un test estándar de MRSA.

Se analiza en Microscan™ de Siemens AG™, el LightCycler™ de Roche Diagnostics™ y el BD MAX™ de Becton Dickinson Diagnostics™.

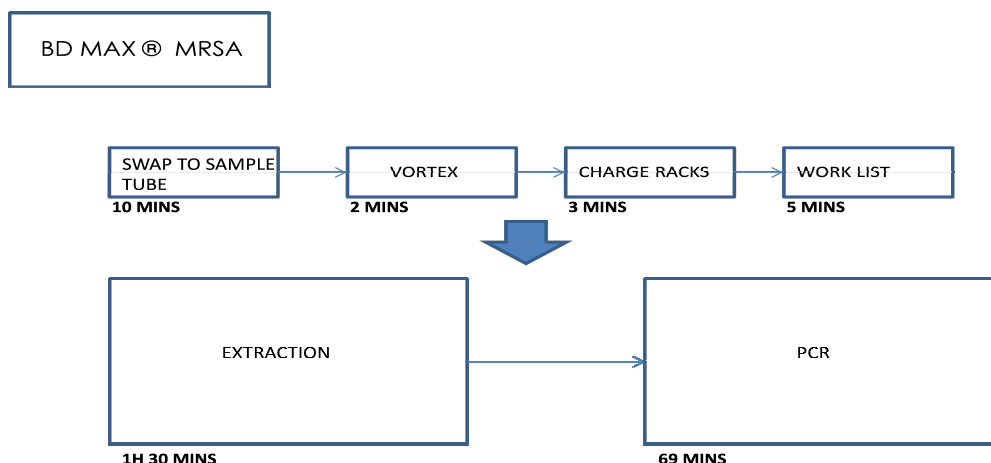
4.6.1. Analisis comparativo protocolos de detección

Microscan™ Siemens™



Lightcycler™ de Roche Diagnostics™





TOTAL TIME (24 SAMPLES): 3H (8 MINS PER SAMPLE)
HANDS ON TIME: 20 MINS

4.6.2. Analisis de coste de las técnicas de detección

Para hacer un análisis riguroso comparativo de las tres técnicas, hemos analizado independientemente, los costes directos de material empleados y los costes de mano de obra, no se añaden los costes indirectos ya que varían según las condiciones del usuario.

DIRECT COSTS			
	COST PER UNIT/RUN	PER SAMPLE	
TIPS	0,003 €		
SWABS	0,08 €		
COST PER KIT MRSA BD MAX (24 DET)	480,00 €	20,00 €	
COST PER KIT MRSA ROCHE (30 DET)	600,00 €	20,00 €	
COST PER PANEL MICROS (96 DET)	7,60 €	0,08 €	
	Units per run		Total Cost
	Tips	Swabs	BDM-Roche
BD Max	0	24	1,92 €
Roche	45	30	2,535 €
Total Direct Cost			
BD Max			481,92 €
Roche			602,535 €
Microscan			7,60 €

LABOUR COSTS					
TOTAL COST	COST PER MONTH	COST PER DAY	COSTE PER HOUR	COST PER MINUTE	
€			22	8	60
LABORATORY TECHNICIAN	1800		81,8	10,23	0,17
ADMINISTRATION (5%)	90		4,1	0,51	0,01
	TIME PER RUN (HOURS)	HANDS ON TIME (MINUTES)	HANDS ON TIME PER SAMPLE (mins)	Hon Cost per sample	
BD MAX (24 samples max)	3	20	0,83	0,14	
ROCHE LC (30 samples max)	2,11	35	1,16	0,20	
MICROSCAN (96 samples max)	48	480	5	0,85	
					Total cost HO per RUN
Percentajes	Hands on per sample COST dif(%)	Hands on time per sample (%)	Total cost Ho per run (%)		3,4
BD Max-Roche	-40%	-40%	-75%		5,9
BD Max-Microscan	-502%	-502%	-2310%		81,8

Tabla 13: Estudio de costes laborales basados en el tiempo de "hands on" que requiere cada técnica. Para obtener el coste hora de cda profesional, tomamos como base los salarios oficiales para los empleados del Servicio de Salud de Galicia (SERGAS), publicado en Diario ficial de Galicia con fecha 19 de Enero de 2012. http://www.xunta.es/dog/Publicados/2012/20120119/AnuncioCA01-130112-11021_es.html

Por tanto, los costes totales de cada técnica, a máxima capacidad, son:

Total Costs	PER RUN (MAX CAP)
DC	
Bd Max	481,92 €
Roche	602,54 €
Microscan	7,60 €
LC	
Bd Max	3,40
Roche	5,9
Microscan	81,8
TOTAL COST	€
BD MAX (24 def)	485,32
ROCHE (30 def)	608,5
MICROSCAN (96 def)	89,4

Estos resultados reflejan que los costes laborales y, específicamente, los referidos al tiempo que los profesionales técnicos invierten en poner en funcionamiento (hands-on) los son los más determinantes a la hora de estudiar el coste comparativo de una técnica de PCR en tiempo real, ya que los costes directos son similares.

Como es lógico, en técnicas que agrupan la extracción de ADN y PCR-RT de forma integrada en un mismo sistema, como es el caso del BDMAX™, el coste de mano de obra del técnico va a ser menor, no necesita cultivo previo de las muestras, con lo que los resultados estarán disponibles en un plazo de tiempo menor.





5. DISCUSIÓN





5. Discusión

La infección por H.pylori es una de las más frecuentes en el mundo y ha revolucionado la patología gástrica en los últimos años.

La alta prevalencia de la infección por H.pylori, así como el incremento de las cepas resistentes a antibióticos, obligan a contar con un método fiable, rápido y eficiente para detectar la presencia de la bacteria y de sus mecanismos de resistencia. El clínico necesita un sistema que le permita establecer un tratamiento de primario eficaz que reduzca la tasa de fracaso de los tratamientos de primera línea y que minimice la tasa de resistencia a antibiotiocos.

5.1. Muestras de biopsias gástricas

La endoscopia digestiva alta posibilita la inspección de la mucosa gástrica y la visualización de las lesiones responsables de los síntomas dispépticos.

Las lesiones que se puedan observar en la mucosa gástrica no son patognomicas e incluso el tejido con apariencia sana puede estar infectado.

La muestra obtenida por biopsia gástrica es una de las más habituales en los servicios de gastroenterología para la detección de H.pylori y otras patologías ya que permite además de sembrar la muestra para la detección de la bacteria, permite, en caso que no existan

contaminaciones o crecimiento escaso de la bacteria, la realización del antibiograma.

Este procedimiento clínico es altamente invasivo y genera molestias a los pacientes con lo que el clínico intenta obtener un diagnóstico de sospecha mediante pruebas no invasivas como el test de aliento con C-urea.

Recibimos y analizamos 201 muestras de biopsia gástrica recibidas del servicio de gastroenterología del CHUS.

Siguiendo el procesado descrito en la parte metodológica de esta Tesis, el resultado es positivo, tanto para la detección de *H.pylori*, como de la resistencia a Cla.

La sensibilidad de la técnica ha demostrado ser notable, obteniendo señal positiva en UFC bajas.

En el análisis con Maldi Tof de una muestra de las cepas analizadas observamos una gran dispersión en los resultados no existiendo clusters importantes. El rango de detección del sistema diseñado es amplio y diverso.

5.2. Detección de *H.pylori* y resistencia a Cla en heces

Las heces, constituyen unas muestras de gran complejidad estructural y orgánica. La detección por PCR de microorganismos en heces se ve

dificultada por la existencia de elementos inhibitorios (ácidos húmicos, etc), difíciles de aislar.

En la actualidad, los estudios metagenómicos, que estudian los metagenomas utilizando secuenciadores de gran capacidad, están sustituyendo a los cultivos tradicionales. De hecho los primeros estudios metagenómicos han mostrado que el 80% de las bacterias detectadas no habían sido sembradas (432).

En ecosistemas complejos como son las heces, las bacterias como puede ser la *Salmonella entérica* es indetectable por los actuales estudios metagenómicos (433).

La metagenómica y "culturomics" (consiste en la diversificación de cultivos bacterianos con la detección mediante MALDI-TOF para incrementar las bases de datos) pueden detectar un gran número de especies.

De 1791 especies reconocidas de forma oficial en 1980 actualmente se han reconocido más de 12.000 (434).

El método más específico para aislar *H.pylori* es el crecimiento en placa pero pocos estudios de los analizados han conseguido obtener resultados positivos en el aislamiento de *H.pylori* a partir de una muestra de heces. La presencia de una gran diversidad de microorganismos hace difícil que la bacteria pueda crecer en placa.

El mecanismo por el que la bacteria puede ser excretada en las heces no es bien conocida, ya que el H.pylori, es una bacteria de gran sensibilidad al contacto con la bilis, presente en el colon y duodeno, con lo que es difícil encontrar un bacteria viable en las heces (435).

En nuestros experimentos, hemos analizado 500 muestras de heces de toda el área sanitaria en diferentes estados, formas y concentraciones. Se analizaron las heces por inmunocromatografía y después se procesaron en el BDMAX®. El procesamiento en el BDMAX® se lleva a cabo de diferentes métodos y concentraciones.

La problemática que nos encontramos en el análisis de heces fueron principalmente 2:

- 1- Inhibición de controles internos
- 2- Ausencia de señal

Como se ha descrito en la parte metodológica de esta Tesis, con lo diversos cambios introducidos en el protocolo inicial del fabricante, conseguimos eliminar las inhibiciones en los controles internos.

A pesar de haber mejorado el protocolo y de eliminar una deficiencia importante en el kit aportado por el fabricante, no hemos logrado obtener señal, en las heces positivas por inmunocromatografía, en el BDMAX®.

Consideramos que el ADN de H.pylori existente en las heces, al tratarse de una bacteria especialmente frágil fuera de su medio, se encontraría

demasiado dañada para producir amplificación y que la competencia con productos, subproductos y otros microorganismos provocaría la ausencia de amplificación.

5.3. Muestras orales

La importancia de la presencia de la H.pylori en el medio oral, viene descrita en la literatura científica por su factor clave en los procesos de infección y reinfección.

En el año 1.989, por primera vez, Kradjen et al. aislaron H.pylori en placa dental. A pesar de que está clara su participación en los procesos de infección vía fecal-oral, nos encontramos con un tema controvertido en los procesos de reinfección. Diversos estudios científicos han hallado H.pylori en el medio oral, sobre todo en pacientes periodontales y en placa dental.

Desai et al en 1.991, reportaron que la triple terapia había sido 100% eficaz en los pacientes infectados con H.pylori en el medio gástrico pero, sin embargo, encontraron que persistía en el medio oral, con lo que concluyeron que la triple terapia no era suficiente para erradicar la bacteria, que debía ser complementada con un tratamiento local del medio oral.

En 1.999, Riggio et al demostraron que en bolsas periodontales de más de 5 mm incrementan la posibilidad de reinfección por H.pylori. Asimismo, la bacteria fue detectada en saliva, en la placa dental supra y

sub gingival, sugiriendo que estos serían los reservorios de la bacteria dentro de la cavidad oral.

Los procesos de reinfección se encuentran bajo discusión en el ámbito científico, pero los últimos estudios muestran una clara correlación entre los códigos genéticos de bacterias en el medio oral y en la mucosa gástrica.

En pacientes periodontales, el H.pylori se encuentra coagregado con cepas de Phorphyromonas gingivalis y Fusobacterium nucleatum, en cambio, las cepas de Streptococcus mutans y Prevotella intermedia, actúan como fuertes inhibidores del crecimiento del H.pylori (436).

A la vista de la literatura científica, queda demostrada la capacidad de supervivencia del H.pylori en el medio oral. Es por ello que parece razonable pensar en la capacidad del medio oral para actuar, no solo como principal vía de infección, si no que puede actuar como medio de reinfección en pacientes sometidos a tratamiento erradicador en medio gástrico.

Consideramos que es necesario continuar la investigación en esta línea ya que la detección del H.pylori en cavidad oral limitarían los procesos de reinfección.

5.4. Muestras parafinadas

La conservación de tejidos humanos en los servicios de anatomía patológica, sobre todo aquellos archivos de tejidos para conservación a largo plazo se conservan embebidos en bloques de parafina.

Las muestras de biopsia gástrica, son habitualmente conservadas en este medio ya que confiere estabilidad por décadas, y hace posible los correspondientes estudios clínicos y epidemiológicos retrospectivos.

Las principales ventajas de la conservación de tejidos en este medio son: fácil manipulación, almacenamiento económico y a largo plazo.

A pesar de las múltiples ventajas, la conservación en parafina, disminuye la eficiencia de la PCR debido a la degradación de los ácidos nucleicos.

Recibimos del Hospital Clínico Universitario de La Coruña, 100 muestras de biopsia gástrica en parafina y desparafinadas.

Hemos analizado las muestras en el BDMAX®, tanto introduciendo el tejido de forma directa en el SPC, como diluido en agua grado PCR y en modo solo PCR con un sistema de desparafinización y extracción específico.

No hemos obtenido señal en las muestras desparafinadas, ni embebidas en parafina con el sistema de extracción del BDMAX.

Sin embargo al utilizar el sistema de extracción específico para biopsias gástricas en parafina de RCBioscience® de 16 horas de duración para posterior PCR en el sistema BDMAX si obtenemos resultados positivos, demostrando ser un sistema combinado fiable para el análisis de muestras gástricas en parafina.

5.5. Resistencia a Cla

La prevalencia de cepas de H.pylori resistentes a Cla se está incrementando tanto en Europa como en EEUU con rangos desde el 4.5% hasta el 30% en los estudios más recientes (437).

La Cla es el antibiótico más potente que se utiliza actualmente contra el H.pylori por lo que la resistencia a este antibiótico es de gran relevancia clínica.

Se ha demostrado que la resistencia a Cla reduce de forma considerable las tasas de éxito de los tratamientos de primera línea, hasta valores de 18.3-44% (437).

Se encuentran más cepas resistentes a Cla, en pacientes con dispepsia no ulcerosa más que en pacientes con úlcera péptica (438).

Por tanto, la monitorización de la resistencia a Cla, es un factor de gran importancia en los servicios de anatomía patológica y microbiología, que han de ser capaces de poner a disposición del clínico lo antes posible los datos de detección de la bacteria y de la resistencia a Cla.

La tasa de resistencia a Cla en nuestra área sanitaria es del 26% lo que supone que aproximadamente 1 de cada 4 tratamientos de primera línea va a fracasar, con lo que vemos claramente la importancia de contar con esa información rápidamente para que el clínico pueda establecer el mejor tratamiento al paciente, resultando en un ahorro de costes, tiempo y molestias para el paciente.

Ante el incremento de las tasas de resistencia a quinolonas, intentamos diseñar un sistema de detección de resistencia en el BDMAX®.

La resistencia a quinolonas afecta a la subunidad-A DNA-gyrase. Las mutaciones y polimorfismos que confieren la resistencia a ese grupo de antibióticos suponen la sustitución de los aminoácidos 91 y 87.

No fue posible añadir la resistencia a quinolonas en nuestro sistema debido a que cada aminoácido cuenta con un juego de tripletes diferentes y el BDMAX cuenta con un número de canales de lectura limitados.

5.6. Flujoograma de trabajo del BDMAX®

El protocolo de análisis de las muestras clínicas de biopsia gástrica, a pesar de ser fiable, se extiende demasiado en el tiempo y en ocasiones las siembras de placa se ven contaminadas o el crecimiento es insuficiente, no pudiendo ser analizada la muestra o su resistencia a antibióticos.

Como hemos visto anteriormente, el clínico, para poder establecer un tratamiento de primera línea, ha de contar con los datos de resistencia ya que supone un alto índice de fracaso en el tratamiento.

Con el sistema que hemos desarrollado en este trabajo, reducimos el tiempo hasta el resultado de 10 días con las pruebas fenotípicas actuales a 1h 30 min, sin perder ninguna muestra por contaminación en placa o por crecimiento insuficiente.

En cuanto a la parte económica, cada vez más determinante para las administraciones hospitalarias, el coste más importante está íntimamente relacionado con el tiempo y la dificultad en poner el sistema en funcionamiento.

En este punto el BDMAX destaca frente a sus competidores ya que es un sistema muy sencillo y rápido, no teniendo interfase extracción-PCR. El ahorro en costes de cada determinación en mano de obra es un 40% inferior en el BDMAX® con respecto al sistema de Roche®, su competidor más directo.

6. CONCLUSIONES





6. CONCLUSIONES

1. La técnica desarrollada para biopsias gástricas, ha demostrado ser un método fiable, con una elevada correlación con los métodos fenotípicos, tanto para la detección de *H. pylori* como para la detección de la resistencia a Cla en un máximo de dos horas tras el procesado de la muestra. Esto hace posible, que el clínico establezca un tratamiento adecuado desde el momento inicial, que reducirá los costes de retratamiento del paciente y el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos. A la vista del análisis taxonómico con el Maldi-Tof observamos que los microorganismos analizados en nuestro estudio muestran una gran dispersión, no existiendo clusters importantes. Ello nos garantiza que nuestro sistema es capaz de detectar un amplio rango de *H. pylori*.

El sistema desarrollado no ha mostrado ser eficaz para las muestras de heces. A pesar de las mejoras en los resultados y de los cambios en el protocolo aportado por el fabricante que logró eliminar las inhibiciones del control interno, no hemos logrado detectar la bacteria en heces.

2- La cavidad oral, como demuestra la literatura, actúa como reservorio de la bacteria, siendo fundamental tanto en procesos de infección, como de reinfección. En nuestro estudio, se ha observado un ligero aumento de señal en las muestras tomadas en los primeros molares

inferiores a nivel del límite amelocementario, no pudiendo afirmar que constituyan un positivo claro.

3. En las muestras conservadas en parafina, ha demostrado ser eficaz, utilizando otros métodos específicos de extracción de ADN y posterior análisis en el BDMAX. No así utilizando el sistema de extracción del BDMAX. La posibilidad de analizar muestras conservadas en parafina abre un interesante camino para los análisis epidemiológicos de largo plazo.

4. En cuanto al análisis de costes y tiempos del BDMAX, ha demostrado ser un sistema muy competitivo, siendo menos costosa cada determinación, sencillo y con menor tiempo de manipulación por parte del técnico responsable.



7. BIBLIOGRAFÍA





Bibliografía

- 1.- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315 [PMID: 6145023 DOI: 10.1016/ Adler I et al . H. pylori in the oral pathology WJG | www.wjgnet.com 9932 August 7, 2014 | Volume 20 | Issue 29 | S0140-6736(84)91816-6]
- 2.- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 1985; 142: 436-439 [PMID: 3982345]
- 3.- Morris, A., and G. Nicholson. 1987. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* 82:192– 199.
- 4.- Morris, A. J., M. R. Ali, G. I. Nicholson, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser. 1991. Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. *Ann. Intern. Med.* 114:662–663.
- 5.- Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 713-739 [PMID: 20930071 DOI: 10.1128/CMR.00011-10]
- 6.- Fox, J. G. 2002. The non-H. pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50:273–283
- 7.- Solnick, J. V., and D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59–97.
- 8.- Solnick, J. V., and D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59–97.
- 9.- Yoshiyama, H., and T. Nakazawa. 2000. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect.* 2:55–60.
- 10.- Nakamura, H., H. Yoshiyama, H. Takeuchi, T. Mizote, K. Okita, and T. Nakazawa. 1998. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect. Immun.* 66:4832– 4837.
- 11.- Schreiber, S., R. Bucker, C. Groll, M. Azevedo-Vethacke, D. Garten, P. Scheid, S. Friedrich, S. Gatermann, C. Josenhans, and S. Suerbaum. 2005. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect. Immun.* 73:1584–1589.
- 12.- Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum. 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:5024–5029.

- 13.- Avenaud, P., A. Marais, L. Monteiro, B. Le Bail, P. Bioulac Sage, C. Balabaud, and F. Megraud. 2000. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 89:1431–1439.
- 14.- Solnick, J. V., and D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59–97.
- 15.- Verhoef, C., R. G. Pot, R. A. de Man, P. E. Zondervan, E. J. Kuipers, J. N. Ijzermans, and J. G. Kusters. 2003. Detection of identical *Helicobacter* DNA in the stomach and in the non-cirrhotic liver of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:1171–1174.
- 16.- Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, A. van Der Ende, R. W. van Der Hulst, H. P. Wirth, J. Hook-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J. Infect. Dis.* 181:273–282.
- 17.- Achtman, M., and S. Suerbaum. 2000. Sequence variation in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 8:57–58.
- 18.- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitzsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299:1582–1585.
- 19.- Suerbaum, S., and M. Achtman. 2004. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 133–139.
- 20.- Censini S, Lange C, Xiang Z, 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):14648–14653.
- 21.- Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med.* 2000;191(4):587–592.
- 22.- Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2008;10(8):1573–1581.
- 23.- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fisher W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 2000;287(5457):1497–1500.

- 24 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. 2002;295(5555):683–686.
- 25.- Franco AT, Israel DA, Washington MK, et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10646–19651.
- 26.- Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the b-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*. 2007;26(32):4617–4626.
- 27.- Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. 2003;300(5624):1430–1434.
- 28.- Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med*. 2005;202(9):1235–1247.
- 29.- Franco AT, Johnston E, Krishna U, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res*. 2008;68(2):379–387.
- 30.- 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):9300–9305.
- 31.- Figueiredo C, van Doorn LJ, Nogueira C, et al. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36(2):128–135.
- 32.- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. 1995;55(10):2111–2115
- 33.- Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J Med Microbiol*. 2008;57(5):545–553.
- 34.- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998;115(1):58–66.
- 35.- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 1988; 26(2):93–99.

- 36.- Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306–323.
- 37.- Wroblenski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):713–739
- 38.- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004;113(3):321–333.
- 39.- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17771–17777.
- 40.- Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 2007; 278(29):26734–26741.
- 41.- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(3):926–936.
- 42.- Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306–323.
- 43.- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17771–17777.
- 44.- Lu H, Hsu P, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005;128(4):833–848.
- 45.- Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):999–1004.
- 46.- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998;115(1):58–66.
- 47.- Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998;110(6):531–44.

- 48.- Shiota S, Watada M, Osamu M, Iwatani S, Suzuki R, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e30354.
- 49.- Montecucco C, Rapuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(6):457–466.
- 50.- Megraud F, Neman-Simha, Brugmann D. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun*. 1992;60(5):1858–1863.
- 51.- Suzuki M, Miura S, Suematsu M, et al. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol*. 1992;263(5 pt 1):G719–G725.
- 52.- Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*. 1996;111(2):419–425.
- 53.- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997;388(6642):539–547.
- 54.- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, J. M. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman. 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12619–12624
- 55.- Wang, G., M. Z. Humayun, and D. E. Taylor. 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*. 7:488–493.
- 56.- Odenbreit, S., and R. Haas. 2002. *Helicobacter pylori*: impact of gene transfer and the role of the cag pathogenicity island for host adaptation and virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 264:1–22.
- 57.- Suerbaum, S., and C. Josenhans. 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat. Rev. Microbiol*. 5:441–452.
- 58.- Alm, R. A., J. Bina, B. M. Andrews, P. Doig, R. E. Hancock, and T. J. Trust. 2000. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect. Immun*. 68:4155–4168.
- 59.- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998;279(5349):373–377.

- 60.- Abadi ATB, Taghvaei T, Mobarez AM, Vaira G, Vaira D. High correlation of babA2-positive strains of *Helicobacter pylori* with the presence of gastric cancer. *Intern Emerg Med*. 2013;8(6):497–501.
- 61.- Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12778–12783.
- 62.- Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, et al. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun*. 2009;77(9): 3782–3790.
- 63.- Abadi ATB, Taghvaei T, Mobarez AM, Vaira G, Vaira D. High correlation of babA2-positive strains of *Helicobacter pylori* with the presence of gastric cancer. *Intern Emerg Med*. 2013;8(6):497–501.
- 64.- Aspholm M, Olfat FO, Nordén J, et al. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog*. 2006;2(10):e110.
- 65.- Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33–35 K) antigen. *Dig Dis Sci*. 1998;43(7):1482–1487.
- 66.- Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. Importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87(23):1777–1780.
- 67.- Ando T, Peek RM, Pride D, et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with cagA status. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):239–246.
- 68.- Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2279–2281.
- 69.- Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005;21(6):653–659.
- 70.- Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol*. 2008;10(4):1008–1020.
- 71.- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandenbroucke-Grauls. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun*. 65:3672–3679.
- 72.- Enroth, H., K. Wreiber, R. Rigo, D. Risberg, A. Uribe, and L. Engstrand. 1999. In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter* 4:7–16.

- 73.- O'Toole, P. W., M. C. Lane, and S. Porwollik. 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* 2:1207–1214.
- 74.- Scott, D. R., E. A. Marcus, D. L. Weeks, and G. Sachs. 2002. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 123:187–195.
- 75.- Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14559–14564.
- 76.- Taneera, J., A. P. Moran, S. O. Hynes, H. O. Nilsson, W. Al-Soud, and T. Wadstrom. 2002. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiology* 148:677–684.
- 77.- Dent, J. C., and C. A. McNulty. 1988. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:555–558.
- 78.- Skirrow, M. B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9–11.
- 79.- Han, S. W., R. Flamm, C. Y. Hachem, H. Y. Kim, J. E. Clarridge, D. G. Evans, J. Beyer, J. Drnec, and D. Y. Graham. 1995. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:349–352.
- 80.- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandenbroucke- Grauls. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* 65:3672–3679.
- 81.- Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176–180.
- 82.- Berg, D. E., P. S. Hoffman, B. J. Appelmek, and J. G. Kusters. 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol.* 5:468–474
- 83.- Doig, P., B. L. de Jonge, R. A. Alm, E. D. Brown, M. Uria-Nickelsen, B. Noonan, S. D. Mills, P. Tummino, G. Carmel, B. C. Guild, D. T. Moir, G. F.Vovis, and T. J. Trust. 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:675–707.

- 84.- Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, and F. Megraud. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:642–674.
- 85.- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karpk, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539–547.
- 86.- Berg, D. E., P. S. Hoffman, B. J. Appelmek, and J. G. Kusters. 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol.* 5:468–474.
- 87.- Doig, P., B. L. de Jonge, R. A. Alm, E. D. Brown, M. Uria-Nickelsen, B. Noonan, S. D. Mills, P. Tummino, G. Carmel, B. C. Guild, D. T. Moir, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:675–707.
- 88.- Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, and F. Megraud. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:642–674.
- 89.- Nedenskov, P. 1994. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3450–3453.
- 90.- Mendz, G. L., A. J. Shepley, S. L. Hazell, and M. A. Smith. 1997. Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 168:448–456.
- 91.- Barnard, F. M., M. F. Loughlin, H. P. Fainberg, M. P. Messenger, D. W. Ussery, P. Williams, and P. J. Jenks. 2004. Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 51:15–32.
- 92.- Ernst, F. D., G. Homuth, J. Stoof, U. Mañder, B. Waidner, E. J. Kuipers, M. Kist, J. G. Kusters, S. Bereswill, and A. H. M. van Vliet. 2005. Ironresponsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J. Bacteriol.* 187:3687–3692.
- 93.- Shames, B., J. G. Fox, F. Dewhirst, L. Yan, Z. Shen, and N. S. Taylor. 1995. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33:2968–2972.

- 94.- Stingl, K., K. Altendorf, and E. P. Bakker. 2002. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* 10:70–74.
- 95.- Bury-Mone, S., S. Skouloubris, C. Dauga, J. M. Thiberge, D. Dailidienne, D. E. Berg, A. Labigne, and H. De Reuse. 2003. Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect. Immun.* 71:5613–5622.
- 96.- McGee, D. J., F. J. Radcliff, G. L. Mendz, R. L. Ferrero, and H. L. Mobley. 1999. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J. Bacteriol.* 181:7314–7322.
- 97.- Merrell, D. S., M. L. Goodrich, G. Otto, L. S. Tompkins, and S. Falkow. 2003. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 71:3529–3539.
- 98.- Skouloubris, S., A. Labigne, and H. De Reuse. 2001. The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. *Mol. Microbiol.* 40:596–609
- 99.- Skouloubris, S., A. Labigne, and H. De Reuse. 1997. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 25:989–998.
- 100.- van Vliet, A. H. M., J. Stoof, S. W. Poppelaars, S. Bereswill, G. Homuth, M. Kist, E. J. Kuipers, and J. G. Kusters. 2003. Differential regulation of amidase- and formamidase-mediated ammonia production by the *Helicobacter pylori* Fur repressor. *J. Biol. Chem.* 278:9052–9057.
- 101.- Bauerfeind, P., R. Garner, B. E. Dunn, and H. L. Mobley. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 40:25–30.
- 102.- Bukholm, G., T. Tannaes, P. Nedenskov, Y. Esbensen, H. J. Grav, T. Hovig, S. Ariansen, and I. Guldvog. 1997. Colony variation of *Helicobacter pylori*: pathogenic potential is correlated to cell wall lipid composition. *Scand. J. Gastroenterol.* 32:445–454.
- 103.- Haque, M., Y. Hirai, K. Yokota, N. Mori, I. Jahan, H. Ito, H. Hotta, I. Yano, Y. Kanemasa, and K. Oguma. 1996. Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. *J. Bacteriol.* 178:2065–2070.
- 104.- Tannaes, T., and G. Bukholm. 2005. Cholesteryl-6-O-acyl- α -D-glucopyranoside of *Helicobacter pylori* relate to relative lysophospholipid content. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:117–120.
- 105.- Tannaes, T., I. K. Bukholm, and G. Bukholm. 2005. High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44:17–23.

- 106.- de Vries, N., A. H. M. van Vliet, and J. G. Kusters. 2001. Gene regulation, p. 321–334. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (ed.), *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. ASM Press, Washington, D.C.
- 107.- Oshima, T., H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, B. L. Wanner, H. Mori, and T. Mizuno. 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 46: 281–291.
- 108.- Yamamoto, K., K. Hirao, T. Oshima, H. Aiba, R. Utsumi, and A. Ishihama. 2005. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280:1448–1456.
- 109.- Ernst, P. B., and B. D. Gold. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:615–640.
- 110.- Kuipers, E. J. 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13:3–12.
- 111.- Kuipers, E. J., J. C. Thijs, and H. P. Festen. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9(Suppl. 2):59–69.
- 112.- Granstrom, M., Y. Tindberg, and M. Blennow. 1997. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* 35:468–470.
- 113.- Malaty, H. M., D. Y. Graham, W. A. Wattigney, S. R. Srinivasan, M. Osato, and G. S. Berenson. 1999. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community. *Clin. Infect. Dis.* 28:279–282.
- 114.- Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, A. S. Pena, H. J. Hazenberg, E. Bloemena, J. Lindeman, E. C. Klinkenberg-Knol, and S. G. Meuwissen. 1995. Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. *Am. J. Gastroenterol.* 90:1401–1406.
- 115.- de Jonge, R., E. J. Kuipers, S. C. Langeveld, R. J. Loffeld, J. Stoof, A. H. van Vliet, and J. G. Kusters. 2004. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947–jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41:161–167.

- 116.- Scott, D. R., E. A. Marcus, D. L. Weeks, A. Lee, K. Melchers, and G. Sachs. 2000. Expression of the *Helicobacter pylori* urel gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infect. Immun.* 68:470–477.
- 117.- Verdu', E., D. Armstrong, R. Fraser, F. Viani, J.-P. Idstro"m, C. Cederberg, and A. L. Blum. 1995. Effect of *H. pylori* status on intragastric pH during treatment with omeprazole. *Gut* 36:539–543
- 118.- Holtmann, G., C. Cain, and P. Malfertheiner. 1999. Gastric *Helicobacter pylori* infection accelerates healing of reflux esophagitis during treatment with the proton pump inhibitor pantoprazole. *Gastroenterology* 117:11–16.
- 119.- El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404:398–402.
- 120.- Johannes G. Kusters, Arnoud H. M. van Vliet, and Ernst J. Kuipers. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical microbiology reviews*, July 2006, p. 449–490 Vol. 19, No. 3.
- 121.- Veldhuyzen van Zanten, S. O. J., M. F. Dixon, and A. Lee. 1999. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. *Gastroenterology* 116:1217–1229.
- 122.- Kuipers, E. J., J. C. Thijs, and H. P. Festen. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*9(Suppl. 2):59–69.
- 123.- Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser. 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann. Intern. Med.* 120:977–981.
- 124.- D. J. E. Cullen, J. Collins, K. J. Christiansen, J. Epis, J. R. Warren, and K. J. Cullen, abstract from the Digestive Diseases Week 1993, *Gastroenterology* 104:A60, 1993.
- 125.- Rauws, E. A. J., and G. N. J. Tytgat. 1990. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 335:1233–1235.
- 126.- Hentschell, E., G. Brandstatter, B. Dragosics, A. M. Hirschl, H. Nemec, K. Schutze, M. Taufer, and H. Wurzer. 1993. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N. Engl. J. Med.* 328:308–312.

127.- Hung, L. C., J. Y. Ching, J. J. Sung, K. F. To, A. J. Hui, V. W. Wong, R. W. Leong, H. L. Chan, J. C. Wu, W. K. Leung, Y. T. Lee, S. C. Chung, and F. K. Chan. 2005. Long-term outcome of Helicobacter pylori-negative idiopathic bleeding ulcers: a prospective cohort study. *Gastroenterology* 128:1845–1850.

128.- van Leerdam, M. E., E. M. Vreeburg, E. A. Rauws, A. A. Geraedts, J. G. Tijssen, J. B. Reitsma, and G. N. Tytgat. 2003. Acute upper GI bleeding: did anything change? Time trend analysis of incidence and outcome of acute upper GI bleeding between 1993/1994 and 2000. *Am. J. Gastroenterol.* 98:1494–1499.

129.- Huang, J. Q., S. Sridhar, and R. H. Hunt. 2002. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 359:14–22.

130.- Talley, N. J., and R. H. Hunt. 1997. What role does Helicobacter pylori play in dyspepsia and nonulcer dyspepsia? Arguments for and against H. pylori being associated with dyspeptic symptoms. *Gastroenterology* 113:S67–S77.

131.- Kuipers, E. J., A. M. Uytendaele, A. S. Pena, R. Roosendaal, G. Pals, G. F. Nelis, H. P. Festen, and S. G. Meuwissen. 1995. Long-term sequelae of Helicobacter pylori gastritis. *Lancet* 345:1525–1528.

132.- Sipponen, P., M. Kekki, J. Haapakoski, T. Ihamaki, and M. Siurala. 1985. 486 KUSTERS ET AL. *CLIN. MICROBIOL. REV.* Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int. J. Cancer* 35:173–177.

133.- Kuipers, E. J. 1998. Review article: relationship between Helicobacter pylori, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12:25–36.

134.- International Agency for Research on Cancer. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 61: schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

135.- Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser. 1995. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. J. Natl. Cancer Inst. 87:1777–1780.

136.- Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelman. 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Gut 40:297–301.

137.- El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 404:398–402.

138.- Parkin, D. M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol. 2:533–543.

139.- Eidt, S., M. Stolte, and R. Fischer. 1994. Helicobacter pylori gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. J. Clin. Pathol. 47:436–439.

140.- Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, and G. D. Friedman. 1994. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N. Engl. J. Med. 330:1267–1271.

141.- Parsonnet, J., and P. G. Isaacson. 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma. N. Engl. J. Med. 350:213–215.

142.- Raderer, M., B. Streubel, S. Woehrer, A. Puspoeck, U. Jaeger, M. Formanek, and A. Chott. 2005. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. Clin. Cancer Res. 11:3349–3352.

143.- Werdmuller, B. F. M., and R. J. L. F. Loffeld. 1997. Helicobacter pylori has no role in the pathogenesis of reflux esophagitis. Dig. Dis. Sci. 42:103–105.

144.- Fallone, C. A., A. N. Barkun, M. U. Gottke, L. M. Best, V. G. Loo, S. Veldhuyzen van Zanten, T. Nguyen, A. Lowe, T. Fainsilber, K. Kouri, and R. Beech. 2000. Association of Helicobacter pylori

genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 95:659–669.

145.- Labenz J., A. L. Blum, E. Bayerdorffer, A. Meining, M. Stolte, and G. Borsch. 1997. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology* 112:1442–1447.

146.- Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical hematology*, Vol. 1 and 2. Philadelphia:Williams & Wilkins, 1998.

147.- Monzón H, Forné M, Esteve M, Rosinach M, Loras C, Espinós JC, Viver JM, Salas A, Fernández-Bañares F. *Helicobacter pylori* infection as a cause of iron deficiency anaemia of unknown origin. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 4166-4171.

148.- Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 1997; 277: 973-976.

149.- Coad J, Conlon C. Iron deficiency in women: assessment, causes and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 625-634.

150.- Blecker U, Renders F, Lanciers S, Vandenplas Y. Syncope leading to the diagnosis of a *Helicobacter pylori* positive chronic active haemorrhagic gastritis. *Eur J Pediatr* 1991; 150:560-561.

151.- Annibale B, Marignani M, Monarca B, Antonelli G, Marcheggiano A, Martino G, Mandelli F, Caprilli R, Delle Fave G. Reversal of iron deficiency anemia after *Helicobacter pylori* eradication in patients with asymptomatic gastritis. *Ann Intern Med* 1999; 131: 668-672.

152.- Yoshimura M, Hirai M, Tanaka N, Kasahara Y, Hosokawa O. Remission of severe anemia persisting for over 20 years after eradication of *Helicobacter pylori* in cases of Ménétrier's disease and atrophic gastritis: *Helicobacter pylori* as a pathogenic factor in iron-deficiency anemia. *Intern Med* 2003; 42: 971-977.

- 153.- Yuan W, Li Yumin D, Yang L. Iron deficiency anemia in Helicobacter pylori infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 665-676
- 154.- Qu XH, Huang XL, Xiong P, Zhu CY, Huang YL, Lu LG, Sun X, Rong L, Zhong L, Sun DY, Lin H, Cai MC, Chen ZW, Hu B, Wu LM, Jiang YB, Yan WL. Does Helicobacter pylori infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 886-896.
- 155.- Papagiannakis P, Michalopoulos C, Papalexi F, Dalampoura D, Diamantidis MD. The role of Helicobacter pylori infection in hematological disorders. *Eur J Intern Med* 2013; 24:685-690.
- 156.- Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2011; 60: 1309-1316.
- 157.- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.
- 158.- Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 4190-4207.
- 159.- Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 1998; 352: 878.
- 160.- 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: 61-64.
- 161.- Byrne MF, Kerrigan SW, Corcoran PA, Atherton JC, Murray FE, Fitzgerald DJ, Cox DM. Helicobacter pylori binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology* 2003; 124: 1846-1854.

162.- Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, Okubo M, Zaitso Y, Ariyoshi K, Nakamura Y, Nawata R, Oka Y, Shirai M, Tanizawa Y. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2004; 124: 91-96.

163.- Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocyte Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. *J Clin Invest* 2008; 118: 2939-2949.

164.- Onat A, Sari I, Hergenç G, Yazici M, Uyarel H, Can G, Sansoy V. Predictors of abdominal obesity and high susceptibility of cardiometabolic risk to its increments among Turkish women: a prospective population-based study. *Metabolism* 2007; 56: 348-356.

165.- Lobo RA. Inflammation, coronary artery disease, and hormones. *Menopause* 2008; 15: 1036-1038.

166.- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 1994; 71: 437-439.

167.- Pieniazek P, Karczewska E, Duda A, Tracz W, Pasowicz M, Konturek SJ. Association of *Helicobacter pylori* infection with coronary heart disease. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50:743-751.

168.- Kowalski M, Konturek PC, Pieniazek P, Karczewska E, Kluczka A, Grove R, Kranig W, Nasser R, Thale J, Hahn EG, Konturek SJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease and effect of its eradication on coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 222-22.

169.- Rogha M, Nikvarz M, Pourmoghaddas Z, Shirneshan K, Dadkhah D, Pourmoghaddas M. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for coronary heart disease? *ARYA Atheroscler* 2012; 8: 5-

170.- Park MJ, Choi SH, Kim D, Kang SJ, Chung SJ, Choi SY, Yoon DH, Lim SH, Kim YS, Yim JY, Kim JS, Jung HC. Association between Helicobacter pylori Seropositivity and the Coronary Artery Calcium Score in a Screening Population. Gut Liver 2011; 5: 321-327.

171.- Huang B, Chen Y, Xie Q, Lin G, Wu Y, Feng Y, Li J, Zhuo Y, Zhang P. CagA-positive Helicobacter pylori strains enhanced coronary atherosclerosis by increasing serum OxLDL and HsCRP in patients with coronary heart disease. Dig Dis Sci 2011; 56: 109-114

172.- Niccoli G, Franceschi F, Cosentino N, Giupponi B, De Marco G, Merra G, Conte M, Montone RA, Ferrante G, Bacà M, Gasbarrini A, Silveri NG, Crea F. Coronary atherosclerotic burden in patients with infection by CagA-positive strains of Helicobacter pylori. Coron Artery Dis 2010; 21: 217-221.

173.- Danesh J, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with Helicobacter pylori: meta-analysis of 18 studies. BMJ 1998; 316: 1130-1132.

174.- Padmavati S, Gupta U, Agarwal HK. Chronic infection, coronary artery disease with special reference to Chlamydia pneumoniae. Indian J Med Res 2012; 135: 228-232

175.- Schöttker B, Adamu MA, Weck MN, Müller H, Brenner H. Helicobacter pylori infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: a population-based cohort study. Atherosclerosis 2012; 220: 569-574.

176.- Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE. Detection of Helicobacter pylori in human carotid atherosclerotic plaques. Stroke 2001; 32: 385-391

177.- 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: 1253-1256

178.- Franceschi F, Sepulveda AR, Gasbarrini A, Pola P, Silveri NG, Gasbarrini G, Graham DY, Genta RM. Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible

pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 106: 430-434.

179.- Chimienti G, Russo F, Lamanuzzi BL, Nardulli M, Messa C, Di Leo A, Correale M, Giannuzzi V, Pepe G. *Helicobacter pylori* is associated with modified lipid profile: impact on Lipoprotein(a). *Clin Biochem* 2003; 36: 359-365.

180.- Kucukazman M, Yavuz B, Sacikara M, Asilturk Z, Ata N, Ertugrul DT, Yalcin AA, Yenigun EC, Kizilca G, Okten H, Akin KO, Nazligul Y. The relationship between updated Sydney System score and LDL cholesterol levels in patients infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2009; 54:604-607.

181.- McCune A, Lane A, Murray L, Harvey I, Nair P, Donovan J, Harvey R. Reduced risk of atopic disorders in adults with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 637-640.

182.- Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55 Suppl 1:S2-10.

183. - Chen Y, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J Infect Dis* 2008; 184.-: 553-560.

184.- Corrado G, Luzzi I, Pacchiarotti C, Lucarelli S, Frediani T, Cavaliere M, Rea P, Cardi E. *Helicobacter pylori* seropositivity in children with atopic dermatitis as sole manifestation of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11: 101-105.

185.- Oertli M, Müller A. *Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immune tolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma. *Gut Microbes* 2012;3: 566-571.

186.- Annagür A, Kendirli SG, Yilmaz M, Altintas DU, Inal A. Is there any relationship between asthma and asthma attack in children and atypical bacterial infections; *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Helicobacter pylori*. *J Trop Pediatr* 2007; 53: 313-318.

187.- Holster IL, Vila AM, Caudri D, den Hoed CM, Perez-Perez GI, Blaser MJ, de Jongste JC, Kuijpers EJ. The impact of *Helicobacter pylori* on atopic disorders in childhood. *Helicobacter* 2012; 17: 232-237.

188.- Wang Q, Yu C, Sun Y. The association between asthma and *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Helicobacter* 2013; 18:41-53.

189.-Zhou X, Wu J, Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25: 460-468.

190.- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.

191.- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systematic review. *Helicobacter* 2011; 16: 79-88.

192.- Gunji T, Matsuhashi N, Sato H, Fujibayashi K, Okumura M, Sasabe N, Urabe A. *Helicobacter pylori* infection is significantly associated with metabolic syndrome in the Japanese population. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 3005-3010.

193.- Gunji T, Matsuhashi N, Sato H, Fujibayashi K, Okumura M, Sasabe N, Urabe A. *Helicobacter pylori* infection significantly increases insulin resistance in the asymptomatic Japanese population. *Helicobacter* 2009

194.-Aydemir S, Bayraktaroglu T, Sert M, Sokmen C, Atmaca H, Mungan G, Gun BD, Borazan A, Ustundag Y. The effect of *Helicobacter pylori* on insulin resistance. *Dig Dis Sci* 2005;50: 2090-2093.

195.-Eshraghian A, Hashemi SA, Hamidian Jahromi A, Eshraghian H, Masoompour SM, Davarpanah MA, Eshraghian K, Taghavi SA. Helicobacter pylori infection as a risk factor for insulin resistance. Dig Dis Sci 2009; 54: 1966-1970.

196.- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. Curr Mol Med 2009; 9: 299-314.

197.- Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiiya T, Satoh K, Ishino Y, Sugano K. Impaired production of gastric ghrelin in chronic gastritis associated with Helicobacter pylori. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 10-16.

198.- Christodoulou DK, Milionis HJ, Pappa P, Katsanos KH, Sigounas D, Florentin M, Elisaf M, Tsianos EV. Association of Helicobacter pylori infection with cardiovascular disease-is it just a myth? Eur J Intern Med 2011; 22: 191

199.- Dore MP, Bilotta M, Malaty HM, Pacifico A, Maioli M, Graham DY, Realdi G. Diabetes mellitus and Helicobacter pylori infection. Nutrition 2000; 16: 407-410

200.- Gillum RF. Infection with Helicobacter pylori, coronary heart disease, cardiovascular risk factors, and systemic inflammation: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. J Natl Med Assoc 2004; 96: 1470-1476.

201.- Naja F, Nasreddine L, Hwalla N, Moghames P, Shoaib H, Faffat M, Sibai A, Gali-Muhtasib H. Association of H. pylori infection with insulin resistance and metabolic syndrome among Lebanese adults. Helicobacter 2012; 17: 444-451.

202.- Lu YH, Yen HW, Lin TH, Huang CH, Lee KT, Wang WM, Wu DC, Voon WC, Lai WT, Sheu SH. Changes of coronary risk factors after eradication of Helicobacter pylori infection. Kaohsiung J Med Sci 2002; 18: 266-272.

203.- Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. Diabetes 2004; 53: 693-700.

204.- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334.

205.- Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Wilson PW. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004; 110: 380-385.

206.- Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Vendrell J, Ferri MJ, Recasens M, Ricart W. Burden of infection and insulin resistance in healthy middle-aged men. *Diabetes Care* 2006; 29:1058-1064

207.- Howard BV, Best L, Comuzzie A, Ebbesson SO, Epstein SE, Fabsitz RR, Howard WJ, Silverman A, Wang H, Zhu J, Umans J. C-Reactive protein, insulin resistance, and metabolic syndrome in a population with a high burden of subclinical infection: insights from the Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives (GOCADAN) study. *Diabetes Care* 2008; 31: 2312-2314

208.- Lutsey PL, Pankow JS, Bertoni AG, Szklo M, Folsom AR. Serological evidence of infections and Type 2 diabetes: the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Diabet Med* 2009; 26: 149-152.

209.- So WY, Tong PC, Ko GT, Ma RC, Ozaki R, Kong AP, Yang X, Ho CS, Lam CC, Chan JC. Low plasma adiponectin level, white blood cell count and Helicobacter pylori titre independently predict abnormal pancreatic beta-cell function. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 86: 89-95.

210.- Zhou X, Zhang C, Wu J, Zhang G. Association between Helicobacter pylori infection and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 99: 200-208.

211.- Jeon CY, Haan MN, Cheng C, Clayton ER, Mayeda ER, Miller JW, Aiello AE. Helicobacter pylori infection is associated with an increased rate of diabetes. *Diabetes Care* 2012;35: 520-525.

212.- Mogensen CE, Chachati A, Christensen CK, Close CF, Deckert T, Hommel E, Kastrup J, Lefebvre P, Mathiesen ER, Feldt-Rasmussen B. Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Invest* 1985; 9: 85-95.

- 213.- Chung GE, Heo NJ, Park MJ, Chung SJ, Kang HY, Kang SJ. Helicobacter pylori seropositivity in diabetic patients is associated with microalbuminuria. *World J Gastroenterol* 2013;19: 97-102.
- 214.- Yang X, Gao Y, Zhao X, Tang Y, Su Y. Chronic Helicobacter pylori infection and ischemic stroke subtypes. *Neurol Res* 2011; 33: 467-472.
- 215.- Whincup PH, Mendall MA, Perry IJ, Strachan DP, Walker M. Prospective relations between Helicobacter pylori infection, coronary heart disease, and stroke in middle aged men. *Heart* 1996; 75: 568-572.
- 216.- Markus HS, Mendall MA. Helicobacter pylori infection: a risk factor for ischaemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 104-107.
- 217.- Ashtari F, Shayegannejad V, Saberi A, Rabiee E. Relationship between Helicobacter pylori immunoglobulin G antibody and thrombotic ischemic stroke. *Acta Med Iran* 2008; 46: 303-306.
- 218.- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Kundsin R, Shih Baseline IgG antibody titers to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, herpes simplex virus, and cytomegalovirus and the risk for cardiovascular disease in women. *Ann Intern Med* 1999; 131: 573-577.
- 219.- Pietroiusti A, Diomedi M, Silvestrini M, Cupini LM, Luzzi I, Gomez-Miguel MJ, Bergamaschi A, Magrini A, Carrabs T, Vellini M, Galante A. Cytotoxin-associated gene-A—positive Helicobacter pylori strains are associated with atherosclerotic stroke. *Circulation* 2002; 106: 580-584.
- 220.- De Bastiani R, Gabrielli M, Ubaldi E, Benedetto E, Sanna G, Cottone C, Candelli M, Zocco MA, Saulnier N, Santoliquido A, Papaleo P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. High prevalence of Cag-A positive H. pylori strains in ischemic stroke: a primary care multicenter study. *Helicobacter* 2008; 13: 274-277.
- 221.- Strang RR. The Association of Gastro-Duodenal Ulceration and Parkinson's Disease. *Med J Aust* 1965; 1: 842-843.

222.- Altschuler E. Gastric *Helicobacter pylori* infection as a cause of idiopathic Parkinson disease and non-arteric anterior optic ischemic neuropathy. *Med Hypotheses* 1996; 47: 413-414.

223.- Tan HJ, Goh KL. Extragastrintestinal manifestations of *Helicobacter pylori* infection: facts or myth? A critical review. *J Dig Dis* 2012; 13: 342-349.

224.- Bjarnason IT, Charlett A, Dobbs RJ, Dobbs SM, Ibrahim MA, Kerwin RW, Mahler RF, Oxlade NL, Peterson DW, Plant JM, Price AB, Weller C. Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 2: response of facets of clinical idiopathic parkinsonism to *Helicobacter pylori* eradication. A randomized, double-blind, placebocontrolled efficacy study. *Helicobacter* 2005; 10: 276-287.

225.- Pierantozzi M, Pietroiusti A, Brusa L, Galati S, Stefani A, Lunardi G, Fedele E, Sancesario G, Bernardi G, Bergamaschi A, Magrini A, Stanzione P, Galante A. *Helicobacter pylori* eradication and l-dopa absorption in patients with PD and motor fluctuations. *Neurology* 2006; 66: 1824-1829.

226.- Weller C, Charlett A, Oxlade NL, Dobbs SM, Dobbs RJ, Peterson DW, Bjarnason IT. 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: 288-297.

227.- Honjo K, van Reekum R, Verhoeff NP. Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement* 2009; 5: 348-360.

228.- Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, Boziki M, Zavos C, Karatzoglou P, Chatzopoulos D, Venizelos I. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* 2006; 66: 938-940.

229.- Kountouras J, Boziki M, Gavalas E, Zavos C, Deretzi G, Grigoriadis N, Tsolaki M, Chatzopoulos D, Katsinelos P, Tzilves D, Zabouri A, Michailidou I. Increased cerebrospinal fluid Helicobacter pylori antibody in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2009; 119: 765-777.

230.- Kountouras J, Boziki M, Gavalas E, Zavos C, Grigoriadis N, Deretzi G, Tzilves D, Katsinelos P, Tsolaki M, Chatzopoulos D, Venizelos I. Eradication of Helicobacter pylori may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. *J Neurol* 2009; 256: 758-767.

231.- Charles A. The evolution of a migraine attack - a review of recent evidence. *Headache* 2013; 53: 413-419.

232.- Cutrer FM. Pathophysiology of migraine. *Semin Neurol* 2006; 26: 171-180.

233.- Charles A. Vasodilation out of the picture as a cause of migraine headache. *Lancet Neurol* 2013; 12: 419-420.

234.- Deleu D, Hanssens Y, Worthing EA. Symptomatic and prophylactic treatment of migraine: a critical reappraisal. *Clin Neuropharmacol* 1998; 21: 267-279.

235.- Gervil M, Ulrich V, Kaprio J, Olesen J, Russell MB. The relative role of genetic and environmental factors in migraine without aura. *Neurology* 1999; 53: 995-999.

236.- Gasbarrini A, De Luca A, Fiore G, Franceschi F, Ojetti V V, Torre ES, Di Campi C, Candelli M, Pola R, Serricchio M, Tondi P, Gasbarrini G, Pola P, Giacobazzo M. Primary Headache and Helicobacter Pylori. *Int J Angiol* 1998; 7: 310-312.

237.- Hong L, Zhao Y, Han Y, Guo W, Wang J, Li X, Han Y, Fan D. Reversal of migraine symptoms by Helicobacter pylori eradication therapy in patients with hepatitis-B-related liver cirrhosis. *Helicobacter* 2007; 12: 306-308.

238.- Tunca A, Türkay C, Tekin O, Kargili A, Erbayrak M. Is Helicobacter pylori infection a risk factor for migraine? A casecontrol study. *Acta Neurol Belg* 2004; 104: 161-164.

239.- Pinessi L, Savi L, Pellicano R, Rainero I, Valfrè W, Gentile S, Cossotto D, Rizzetto M, Ponzetto A. Chronic *Helicobacter pylori* infection and migraine: a case-control study. *Headache* 2000; 40: 836-839.

240.- Caselli M, Chiamenti CM, Soriani S, Fanaro S. Migraine in children and *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1116-1118.

241.- Mavromichalis I, Zaramboukas T, Giala MM. Migraine of gastrointestinal origin. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 406-410.

242.- Haberl H. Net land-atmosphere flows of biogenic carbon related to bioenergy: towards an understanding of systemic feedbacks. *Glob Change Biol Bioenergy* 2013; 5: 351-357.

243.- Ring J. *Allergy in Practice*. Berlin, Germany: Springer, 2005

244.- Zuberbier T, Asero R, Bindslev-Jensen C, Walter Canonica G, Church MK, Giménez-Arnau A, Grattan CE, Kapp A, Merk HF, Rogala B, Sajni S, Sánchez-Borges M, Schmid-Grendelmeier P, Schünemann H, Staubach P, Vena GA, Wedi B, Maurer M. EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. *Allergy* 2009; 64: 1417-1426.

245.- Nichols KM, Cook-Bolden FE. Allergic skin disease: major highlights and recent advances. *Med Clin North Am* 2009; 93: 1211-1224.

246.- 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: 827-830.

247.- Federman DG, Kirsner RS, Moriarty JP, Concato J. The effect of antibiotic therapy for patients infected with *Helicobacter pylori* who have chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 861-864.

- 248.- Daudén E, Jiménez-Alonso I, García-Díez A. Helicobacter pylori and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000; 39:446-452.
- 249.- Moreira A, Rodrigues J, Delgado L, Fonseca J, Vaz M. Is Helicobacter pylori infection associated with chronic idiopathic urticaria? *Allergol Immunopathol (Madr)* 2003; 31: 209-214.
- 250.- Chiu YC, Tai WC, Chuah SK, Hsu PI, Wu DC, Wu KL, Huang CC, Ho JC, Ring J, Chen WC. The Clinical Correlations of Helicobacter pylori Virulence Factors and Chronic Spontaneous Urticaria. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013:436727.
- 251.- Powell FC. Clinical practice. Rosacea. *N Engl J Med* 2005;352: 793-803.
- 252.- Elewski BE, Draelos Z, Dréno B, Jansen T, Layton A, Picardo M. Rosacea - global diversity and optimized outcome: proposed international consensus from the Rosacea International Expert Group. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 188-200.
- 253.- Rebora A, Drago F, Picciotto A. Helicobacter pylori in patients with rosacea. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1603-1604.
- 254.- Gürer MA, Erel A, Erbaş D, Çağlar K, Atahan C. The seroprevalence of Helicobacter pylori and nitric oxide in acne rosacea. *Int J Dermatol* 2002; 41: 768-770.
- 255.- Lazaridou E, Giannopoulou C, Fotiadou C, Vakirlis E, Trigoni A, Ioannides D. The potential role of microorganisms in the development of rosacea. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9:21-25.
- 256.- Lazaridou E, Giannopoulou C, Fotiadou C, Vakirlis E, Trigoni A, Ioannides D. The potential role of microorganisms in the development of rosacea. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9:21-25
- 257.- 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: 220-222.

- 258.- Szlachcic A. The link between *Helicobacter pylori* infection and rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 328-333.
- 259.- Utaş S, Ozbakir O, Turasan A, Utaş C. *Helicobacter pylori* eradication treatment reduces the severity of rosacea. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 433-435.
- 260.- Son SW, Kim IH, Oh CH, Kim JG. The response of rosacea to eradication of *Helicobacter pylori*. *Br J Dermatol* 1999; 140: 984-985.
- 261.- Schmidt-Wilcke T, Clauw DJ. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 518-527.
- 262.- Dadabhoy D, Crofford LJ, Spaeth M, Russell IJ, Clauw DJ. Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008;10: 211.
- 263.- Buskila D, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Etiology of fibromyalgia: the possible role of infection and vaccination. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 41-43.
- 264.- Olama SM, El-Arman M. *Helicobacter pylori* in Egyptian patients with fibromyalgia syndrome. *Egyptian Rheumatology* 2013; 35: 167-173.
- 265.- Akkaya N, Akkaya S, Polat Y, Turk M, Turk T, Turhal E, Sahin F. *Helicobacter pylori* seropositivity in fibromyalgia syndrome. *Clin Rheumatol* 2011; 30: 43-49.
- 266.- Malt EA, Olafsson S, Ursin H. Fibromyalgia A manifestation of *Helicobacter pylori* infection? *Scand J Rheumatol* 2004;33: 131.
- 267.- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.

- 268.- Gisbert JP, Pajares JM. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1001-1017.
- 269.- Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004; 9: 347-368.
- 270.- Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon AT, Deltente M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 1999; 354: 30-33.
- 271.- Loy CT, Irwig LM, Katelaris PH, Talley NJ. Do commercial serological kits for *Helicobacter pylori* infection differ in accuracy? A meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1138-1144.
- 272.- Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-1825.
- 273.- el-Zimaity HM. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* with biopsy. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 863-869.
- 274.- Li C, Ha T, Ferguson DA, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G, Thomas E. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2142-2149.
- 275.- Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215: 57-62.
- 276.- Patel SK, Mishra GN, Pratap CB, Jain AK, Nath G. *Helicobacter pylori* is not eradicated after triple therapy: a nested PCR based study. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 483136.
- 277.- Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2162-2165

278.- Vaira D, Vakil N, Menegatti M, van't Hoff B, Ricci C, Gatta L, Gasbarrini G, Quina M, Pajares Garcia JM, van Der Ende A, van Der Hulst R, Anti M, Duarte C, Gisbert JP, Miglioli M, Tytgat G. The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. *Ann Intern Med* 2002; 136: 280-287

279.- Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadström T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1072-1076.

280.- Xiang Z, Bugnoli M, Ponzetto A, Morgando A, Figura N, Covacci A, Petracca R, Pennatini C, Censini S, Armellini D. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 739-745.

281.- Singh V, Mishra S, Rao GR, Jain AK, Dixit VK, Gulati AK, Mahajan D, McClelland M, Nath G. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter* 2008; 13: 30-34.

282.- Nilsson HO, Blom J, Abu-Al-Soud W, Ljungh A A, Andersen LP, Wadström T. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 11-19.

283.- Andersen LP, Dorland A, Karacan H, Colding H, Nilsson HO, Wadström T, Blom J. Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 897-903.

284.- Elvira Garza-González, Guillermo Ignacio Perez-Perez, Héctor Jesús Maldonado-Garza, Francisco Javier Bosques-Padilla A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol* 2014 February 14; 20(6): 1438-1449.

285.- Mégraud F. Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. *Gut Microbes* 2013.

286.- Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; 62: 34-42.

287.- Su P, Li Y, Li H, Zhang J, Lin L, Wang Q, Guo F, Ji Z, Mao J, Tang W, Shi Z, Shao W, Mao J, Zhu X, Zhang X, Tong Y, Tu H, Jiang M, Wang Z, Jin F, Yang N, Zhang J. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated in the Southeast Coastal Region of China. *Helicobacter* 2013; 18: 274-279.

288.- Lee JW, Kim N, Kim JM, Nam RH, Chang H, Kim JY, Shin CM, Park YS, Lee DH, Jung HC. Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter* 2013; 18: 206-214.

289.-De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, Stoppino G, Cea U, Pace A, Zotti M, Morini S, Panella C, Ierardi E. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 783-785.

290.-Megraud F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* 2007; 56: 1502.

291.- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.

292.- Loyd RA, McClellan DA. Update on the evaluation and management of functional dyspepsia. *Am Fam Physician* 2011; 83: 547-552.292.

293.- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.

294.- Zou J, Dong J, Yu X. Meta-analysis: Lactobacillus containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for Helicobacter pylori eradication. *Helicobacter* 2009; 14:97-107.

295.-Sachdeva A, Nagpal J. Meta-analysis: efficacy of bovine lactoferrin in Helicobacter pylori eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 720-730.

296.-Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. Meta-analysis: the effects of Saccharomyces boulardii supplementation on Helicobacter pylori eradication rates and side effects during treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1069-1079.

297.- Stenström B, Mendis A, Marshall B. Helicobacter pylori—the latest in diagnosis and treatment. *Aust Fam Physician* 2008;37: 608-612.

298.- Kutluk G1, Tutar E, Bayrak A, Volkan B, Akyon Y, Celikel C, Ertem D. Sequential therapy versus standard triple therapy for Helicobacter pylori eradication in children: any advantage in clarithromycin-resistant strains? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Nov;26(11):1202-8.

299.- McColl KE. Clinical practice. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1597-1604.

300.- De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, Ierardi E, Zullo A. Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis* 2010;19: 409-414.

301.- Tay CY, Windsor HM, Thirriot F, Lu W, Conway C, Perkins TT, Marshall BJ. Helicobacter pylori eradication in Western Australia using novel quadruple therapy combinations. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 1076-1083.

302.- McNicholl AG, Marin AC, Molina-Infante J, Castro M, Barrio J, Ducons J, Calvet X, de la Coba C, Montoro M, Bory F, Perez-Aisa A, Forné M, Gisbert JP. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for *Helicobacter pylori* eradication in routine clinical practice. *Gut* 2014; 63: 244-249.

303.- Sardarian H, Fakheri H, Hosseini V, Taghvaei T, Maleki I, Mokhtare M. Comparison of hybrid and sequential therapies for *Helicobacter pylori* eradication in Iran: a prospective randomized trial. *Helicobacter* 2013; 18: 129-134.

304.- Zullo A, Scaccianoce G, De Francesco V, Ruggiero V, D'Ambrosio P, Castorani L, Bonfrate L, Vannella L, Hassan C, Portincasa P. Concomitant, sequential, and hybrid therapy for *H. pylori* eradication: a pilot study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37: 647-650.

305.- Saad RJ, Schoenfeld P, Kim HM, Chey WD. Levofloxacin based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 488-496.

306.- Gisbert JP, Morena F. Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 35-44.

307.- Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:167-180.

308.- Morgan DR, Torres J, Sexton R, Herrero R, Salazar-Martínez E, Greenberg ER, Bravo LE, Dominguez RL, Ferreccio C, Lazcano-Ponce EC, Meza-Montenegro MM, Peña EM, Peña R, Correa P, Martínez ME, Chey WD, Valdivieso M, Anderson GL, Goodman GE, Crowley JJ, Baker LH. Risk Of recurrent *Helicobacter pylori* infection 1 year after initial eradication therapy in 7 Latin American communities. *JAMA* 2013; 309: 578-586.

309.- Wang ZH, Gao QY, Fang JY. Meta-analysis of the efficacy and safety of *Lactobacillus*-containing and *Bifidobacterium*-containing probiotic compound preparation in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47: 25-32.

- 310.- Ahmad K, Fatemeh F, Mehri N, Maryam S. Probiotics for the treatment of pediatric helicobacter pylori infection: a randomized double blind clinical trial. *Iran J Pediatr* 2013; 23:79-84.
- 311.- Vajdy M, Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Soenawan E, Cuadra L, Kazzaz J, Ruggiero P, Peppoloni S, Norelli F, del Giudice G, O'Hagan D. Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology* 2003; 110: 86-94.
- 312.- Nyström J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine* 2007; 25: 2591-2598.
- 313.- Sanchez V, Gimenez S, Haensler J, Geoffroy C, Rokbi B, Seguin D, Lissolo L, Harris B, Rizvi F, Kleanthous H, Monath T, Cadoz M, Guy B. Formulations of single or multiple *H. pylori* antigens with DC Chol adjuvant induce protection by the systemic route in mice. Optimal prophylactic combinations are different from therapeutic ones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30: 157-165.
- 314.- Li Y, Jiang Y, Xi Y, Zhang L, Luo J, He D, Zeng S, Ning Y. Identification and characterization of H-2d restricted CD4+ T cell epitopes on Lpp20 of *Helicobacter pylori*. *BMC Immunol* 2012; 13: 68.
- 315.- Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68:3337-3343.
- 316.- O'Riordan AA, Morales VA, Mulligan L, Faheem N, Windle HJ, Kelleher DP. Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine* 2012; 30: 3876-3884.
- 317.- Mohammadi, M., S. Czinn, R. Redline, and J. Nedrud. 1996. Helicobacterspecific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J. Immunol* 156:4729-4738.
- 318.- Ferrero, R. L., J. M. Thiberge, I. Kansau, N. Wuscher, M. Huerre, and A. Labigne. 1995. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6499-6503.
- 319.- Lee, C. K., R. Weltzin, W. D. Thomas, Jr., H. Kleanthous, T. H. Ermak, G. Soman, J. E. Hill, S. K. Ackerman, and T. P. Monath. 1995. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. Dis.* 172:161-172.

- 320.- Saldinger, P. F., N. Porta, P. Launois, J. A. Louis, G. A. Waanders, H. Bouzourene, P. Michetti, A. L. Blum, and I. E. Corthesy-Theulaz. 1998. Immunization of BALB/c mice with Helicobacter urease B induces a T helper 2 response absent in Helicobacter infection. *Gastroenterology* 115: 891–897.
- 321.- Christensen, J. M., J. Kristiansen, N. H. Nielsen, T. Menne, and K. Byrialsen. 1999. Nickel concentrations in serum and urine of patients with nickel eczema. *Toxicol. Lett.* 108:185–189.
- 322.- Crabtree, J. E. 1998. Eradication of chronic Helicobacter pylori infection by therapeutic vaccination. *Gut* 43:7–8.
- 323.- Doidge, C., I. Gust, A. Lee, F. Buck, S. Hazell, and U. Manne. 1994. Therapeutic immunisation against helicobacter infection. *Lancet* 343:914–915.
- 324.- Ghiara, P., M. Rossi, M. Marchetti, A. Di Tommaso, C. Vindigni, F. Ciampolini, A. Covacci, J. L. Telford, M. T. De Magistris, M. Pizza, R. Rappuoli, and G. Del Giudice. 1997. Therapeutic intragastric vaccination against Helicobacter pylori in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect. Immun.* 65:4996–5002
- 325.- Hone, D., and J. Hackett. 1989. Vaccination against enteric bacterial diseases. *Rev. Infect. Dis.* 11:853–877.
- 326.- Johansson, E. L., C. Bergquist, A. Edebo, C. Johansson, and A. M. Svennerholm. 2004. Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. *Vaccine* 22:984–990
- 327.- Keller, W. C., and P. Michetti. 2001. Vaccination against Helicobacter pylori—an old companion of man. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1:795–802
- 328.- Krienitz, W. 1906. Ueber das auftreten von mageninhalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 22:872.
- 329.- Michetti, P., C. Kreiss, K. L. Kotloff, N. Porta, J. L. Blanco, D. Bachmann, M. Herranz, P. F. Saldinger, I. Corthesy-Theulaz, G. Losonsky, R. Nichols, J. Simon, M. Stolte, S. Ackerman, T. P. Monath, and A. L. Blum. 1999. Oral immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults. *Gastroenterology* 116:804–812
- 330.- Volland, P., M. Zeitner, N. Hafsi, and C. Prinz. 2006. Human immune response towards recombinant Helicobacter pylori urease and cellular fractions. *Vaccine* 24:3832–3839.

- 331.- Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, and H. Brenner. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9(Suppl. 1):1–6.
- 332.- Pounder, R. E., and D. Ng. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:33–39.
- 333.- Malaty, H. M., and D. Y. Graham. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35:742–745.
- 334.- Genta, R. M. 2002. Review article: after gastritis—an imaginary journey into a *Helicobacter*-free world. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16(Suppl. 4):89–94.
- 335.- Fiedorek, S. C., H. M. Malaty, D. L. Evans, C. L. Pumphrey, H. B. Casteel, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham. 1991. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* 88:578–582.
- 336.- Kuipers, E. J., A. S. Pena, G. van Kamp, A. M. Uytterlinde, G. Pals, N. F. Pels, E. Kurz-Pohlmann, and S. G. Meuwissen. 1993. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342:328–331
- 337.- Mysore, J. V., T. Wigginton, P. M. Simon, D. Zopf, L. M. Heman-Ackah, and A. Dubois. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* 117:1316–1325.
- 338.- Gong YH, Sun LP, Jin SG, Yuan Y. Comparative study of serology and histology based detection of *Helicobacter pylori* infections: a large population-based study of 7,241 subjects from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29:907–11.
- 339.- Li Z, Zou D, Ma X, Chen J, Shi X, Gong Y, Man X, et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:2570–7.
- 340.- Nam SY, Choi IJ, Ryu KH, Kim BC, Kim CG, Nam BH. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on reflux esophagitis and reflux symptoms. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:2153–62.
- 341.- Nguyen TL, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh DT, Ta L, Mai BH, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. *BMC Gastroenterol.* 2010; 10:114.
- 342.- Ozdil K, Sahin A, Kahraman R, Yuzbasioglu B, Demirdag H, Calhan T, et al. Current prevalence of intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic adult patients from Turkey. *Hepatogastroenterology.* 2010; 57:1563–6.

- 343.-Tsukanov VV, Butorin NN, Maady AS, Shtygasheva OV, Amelchugova OS, Tonkikh JL, et al. Helicobacter pylori Infection, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Risk in Eastern Siberia. *Helicobacter*. 2011; 16:107–12.
- 344.- Ullah SS, Shamsuzzaman SM, Ara MN, Islam MN, Islam MS, Saha M, et al. Seropositivity of Helicobacter Pylori among the fish handlers. *Mymensingh Med J*. 2010; 19:219–24.
- 345.- Rahim AA, Lee YY, Majid NA, Choo KE, Raj SM, Derakhshan MH, et al. Helicobacter pylori infection among Aborigines (the Orang Asli) in the northeastern region of Peninsular Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83:1119–22.
- 346.- Pandeya N, Whiteman DC. Prevalence and determinants of Helicobacter pylori seropositivity in the Australian adult community. *J Gastroenterol Hepatol*. Mar 28.2011 doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06726.x.
- 347.- Fraser AG, Scragg R, Schaaf D, Metcalf P, Grant CC. Helicobacter pylori infection and iron deficiency in teenage females in New Zealand. *N Z Med J*. 2010; 123:38–45.
- 348.- Al Faleh FZ, Ali S, Aljebreen AM, Alhammad E, Abdo AA. Seroprevalence rates of Helicobacter pylori and viral hepatitis A among adolescents in three regions of the Kingdom of Saudi Arabia: is there any correlation? *Helicobacter*. 2010; 15:532–7.
- 349.- Ozen A, Furman A, Berber M, Karatepe HO, Mutlu N, Saricoban HE, et al. The effect of Helicobacter pylori and economic status on growth parameters and leptin, ghrelin, and insulin-like growth factor (IGF)-I concentrations in children. *Helicobacter*. 2011; 16:55–65.
- 350.- Thankachan P, Muthayya S, Sierksma A, Eilander A, Thomas T, Duchateau GS, et al. Helicobacter pylori infection does not influence the efficacy of iron and vitamin B(12) fortification in marginally nourished Indian children. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64:1101–7.
- 351.- Cherian S, Burgner DP, Cook AG, Sanfilippo FM, Forbes DA. Associations between Helicobacter pylori infection, co-morbid infections, gastrointestinal symptoms, and circulating cytokines in African children. *Helicobacter*. 2010; 15:88–97.
- 352.- Abdollahi A, Morteza A, Khalilzadeh O, Zandieh A, Asgarshirazi M. The role of Helicobacter pylori infection in gastro-oesophageal reflux in Iranian children. *Ann Trop Paediatr*. 2011; 31:53–7.
- 353.- Tanih NP, Okeleye BI, Ndip LM, Clarke AM, Naidoo N, Mkwetshana N, et al. Helicobacter pylori

prevalence in dyspeptic patients in the Eastern Cape province - race and disease status. *S Afr Med J*. 2010; 100:734–7.

354.-Joutei HA, Hilali A, Fechtali T, Rhallabi N, Benomar H. [Helicobacter pylori infection in 755 patients with digestive complaints: Pasteur Institute, Morocco, 1998–2007]. *East Mediterr Health J*. 2010; 16:778–82.

355.- Aje AO, Otegbayo JA, Odaibo GN, Bojuwoye BJ. Comparative study of stool antigen test and serology for Helicobacter pylori among Nigerian dyspeptic patients—a pilot study. *Niger J Clin Pract*. 2010; 13:120–4.

356.- Hestvik E, Tylleskar T, Kaddu-Mulindwa DH, Ndeezi G, Grahnquist L, Olafsdottir E, et al. Helicobacter pylori in apparently healthy children aged 0–12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based cross sectional survey. *BMC Gastroenterol*. 2010; 10:62.

357.- Dattoli VC, Veiga RV, da Cunha SS, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML, Alcantara-Neves NM.

Seroprevalence and potential risk factors for Helicobacter pylori infection in Brazilian children. *Helicobacter*. 2010; 15:273–8.

358.- Miranda AC, Machado RS, da Silva EM, Kawakami E. Seroprevalence of Helicobacter pylori infection among children of low socioeconomic level in Sao Paulo. *Sao Paulo Med J*. 2010; 128:187–91.

359.- Janjetic MA, Goldman CG, Balcarce NE, Rua EC, Gonzalez AB, Fuda JA, et al. Iron, zinc, and copper nutritional status in children infected with Helicobacter pylori. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 51:85–9.

360.- Egorov AI, Sempertegui F, Estrella B, Egas J, Naumova EN, Griffiths JK. The effect of Helicobacter pylori infection on growth velocity in young children from poor urban communities in Ecuador. *Int J Infect Dis*. 2010; 14:e788–91.

361.- Araf LN, Pereira CA, Machado RS, Raguza D, Kawakami E. Helicobacter pylori and iron deficiency anemia in adolescents in Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 51:477–80.

362.- Ortega JP, Espino A, Calvo BA, Verdugo P, Pruyas M, Nilsen E, et al. Helicobacter pylori infection in symptomatic patients with benign gastroduodenal diseases: analysis of 5.664 cases. *Rev Med Chil*. 2010; 138:529–35.

- 363.- Fialho AM, Braga AB, Braga Neto MB, Carneiro JG, Rocha AM, Rodrigues MN, et al. Younger siblings play a major role in *Helicobacter pylori* transmission among children from a low-income community in the Northeast of Brazil. *Helicobacter*. 2010; 15:491–6.
- 364.- Vendt N, Kool P, Teesalu K, Lillemae K, Maaros HI, Oona M. Iron deficiency and *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Paediatr*. Mar 21.2011 doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02281.x.
- 365.- Katsanos KH, Tatsioni A, Tsakiris V, Christodoulou D, Tsianos EV. *Helicobacter pylori* is a major public health priority in western Balkans: an endoscopy referral center experience. *Eur J Intern Med*. 2010; 21:306–9.
- 366.- Epplein M, Signorello LB, Zheng W, Peek RM Jr, Michel A, Williams SM, et al. Race, African ancestry, and *Helicobacter pylori* infection in a low-income United States population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20:826–34.
- 367.- Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. *Gastroenterology*. 2010; 139:1894–901. e2; quiz e12.
- 368.- McJunkin B, Sissoko M, Levien J, Upchurch J, Ahmed A. Dramatic Decline in Prevalence of *Helicobacter pylori* and Peptic Ulcer Disease in an Endoscopy-referral Population. *Am J Med*. 2011; 124:260–4.
- 369.- Cardenas VM, Mena KD, Ortiz M, Karri S, Variyam E, Behravesh CB, et al. Hyperendemic *H. pylori* and tapeworm infections in a U.S.-Mexico border population. *Public Health Rep*. 2010; 125:441–7.
- 370.- McJunkin B, Sissoko M, Levien J, Upchurch J, Ahmed A. Dramatic Decline in Prevalence of *Helicobacter pylori* and Peptic Ulcer Disease in an Endoscopy-referral Population. *Am J Med*. 2011; 124:260–4.
- 371.- Nakajima S, Nishiyama Y, Yamaoka M, Yasuoka T, Cho E. Changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal diseases in the past 17 years. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25(Suppl 1):S99–110.
- 372.- Muhsen K, Athamna A, Bialik A, Alpert G, Cohen D. Presence of *Helicobacter pylori* in a sibling is associated with a long-term increased risk of *H. pylori* infection in Israeli Arab children. *Helicobacter*. 2010; 15:108–13.
- 373.- Brown, L. M., T. L. Thomas, J. L. Ma, Y. S. Chang, W. C. You, W. D. Liu, L. Zhang, and M. H. Gail. 2001. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand. J. Infect. Dis*. 33:686–691.

374.- Brown, L. M., T. L. Thomas, J. L. Ma, Y. S. Chang, W. C. You, W. D. Liu, L. Zhang, D. Pee, and M. H. Gail. 2002. Helicobacter pylori infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int. J. Epidemiol.*31:638–645

375.-Dore, M. P., A. R. Sepulveda, H. El-Zimaity, Y. Yamaoka, M. S. Osato, K. Mototsugu, A. M. Nieddu, G. Realdi, and D. Y. Graham. 2001. Isolation of Helicobacter pylori from sheep—implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 96:1396–1401.

376.- Herbarth, O., P. Krumbiegel, G. J. Fritz, M. Richter, U. Schlink, D. M. Muller, and T. Richter. 2001. Helicobacter pylori prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environ. Health Perspect.* 109:573–577.

377.- Allaker, R. P., K. A. Young, J. M. Hardie, P. Domizio, and N. J. Meadows. 2002. Prevalence of Helicobacter pylori at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J. Med. Microbiol.*51:312–317.

378.- Ferguson, D. A., Jr., C. Jiang, D. S. Chi, J. J. Laffan, C. Li, and E. Thomas. 1999. Evaluation of two string tests for obtaining gastric juice for culture, nested-PCR detection, and combined single- and double-stranded conformational polymorphism discrimination of Helicobacter pylori. *Dig. Dis. Sci.* 44:2056–2062.

379.- Ferguson, D. A., Jr., C. Li, N. R. Patel, W. R. Mayberry, D. S. Chi, and E. Thomas. 1993. Isolation of Helicobacter pylori from saliva. *J. Clin. Microbiol.*31:2802–2804.

380.- Kabir, S. 2004. Detection of Helicobacter pylori DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 9:115–123.

381.- Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol* 2014 May 21; 20(19): 5639-5653.

382.- Niv Y. H pylori recurrence after successful eradication. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1477-1478

383.-McColl KE. Clinical practice. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1597-1604.

384.- Al Asqah M, Al Hamoudi N, Anil S, Al Jebreen A, Al-Hamoudi WK. Is the presence of Helicobacter pylori in dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection? *Can J Gastroenterol* 2009; 23: 177-179.

385.- Zou QH, Li RQ. Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 317-324.

- 386.- Kraiden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, Babida C, Karmali M, Penner JL. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1397-1398.
- 387.- Shames B, Kraiden S, Fuksa M, Babida C, Penner JL. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2849-2850.
- 388.- Majmudar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol* 1990; 9: 271-272
- 389.- Pustorino R, Nicosia R, D'Ambra G, Di Paola M, Brugnoletti O, Grippaudo G, Paparo BS. The mouth-stomach crossing of *Helicobacter pylori*. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996; 18:183-186.
- 390.- Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielański W, Kaczmarczyk-Stachowska A. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47: 121-129.
- 391.- Suk FM, Chen SH, Ho YS, Pan S, Lou HY, Chang CC, Hsieh CR, Cheng YS, Lien GS. It is difficult to eradicate *Helicobacter pylori* from dental plaque by triple therapy. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2002; 65: 468-473.
- 392.- Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA, Litchfield Adler I et al . *H. pylori* in the oral pathology P, Thomas E. Comparison of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig Dis Sci* 2002; 47:1850-1856
- 393.- Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi C, Goncalvez R, Lecuna V. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J Med Microbiol* 2002; 51: 764-770.
- 394.- Bernander S, Dalén J, Gästrin B, Hedenborg L, Lamke LO, Ohrn R. Absence of *Helicobacter pylori* in dental plaques in *Helicobacter pylori* positive dyspeptic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 282-285
- 395.- Von Recklinghausen G, Weischer T, Ansorg R, Mohr C. No cultural detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque. *Zentralbl Bakteriol* 1994; 281: 102-106
- 396.- Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DA, West AP, Mapstone NP, Quirke P, Chalmers DM, Kowolik MJ, Axon AT. *Helicobacter pylori* infection and dental care. *Gut* 1995; 37:44-46

- 397.- Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Veneto G, Bernardi S, Boari A, Colizzi V, Fedeli G, Gasbarrini G. Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22: 174-177.
- 398.-Luman W, Alkout AM, Blackwell CC, Weir DM, Plamer KR. *Helicobacter pylori* in the mouth--negative isolation from dentalplaque and saliva. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 11-14.
- 399.- De Sousa L, Vásquez 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: 109-116.
- 400.- T Sreenivasa Bharat, M Sesha Reddy, Raghu Dhanapal, N Govind Raj Umar. Molecular detection and correlation of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsies of dyspeptic patients. *J. Oral Maxillofac Pathol.* 2014 Jan-Apr 18(1): 19-24.
- 401.- Asikainen S, Chen C, Slots J. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 318-320.
- 402.- Riggio MP, Lennon A. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. *J Med Microbiol* 1999; 48: 317-322.
- 403.-Avcu N, Avcu F, Beyan C, Ural AU, Kaptan K, Ozyurt M, Nevruz O, Yalçın A. The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin B12-deficiency anemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 166-169
- 404.- Dye BA, Kruszon-Moran D, McQuillan G. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am J Public Health* 2002; 92: 1809-1815
- 405.-Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 277-280.
- 406.-Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 329-333
- 407.- Anand PS, Nandakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection? *J Periodontol* 2006; 77: 692-698
- 408.- Eskandari A, Mahmoudpour A, Abolfazli N, Lafzi A. Detection of *Helicobacter pylori* using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15: e28-e31

- 409.-Agarwal S, Jithendra KD. Presence of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of periodontitis patients with and without dyspepsia, detected by polymerase chain reaction and culture. *J Indian Soc Periodontol* 2012; 16: 398-403.
- 410.- Bouziane A, Ahid S, Abouqal R, Ennibi O. Effect of periodontal therapy on prevention of gastric *Helicobacter pylori* recurrence: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 1166-1173.
- 411.- Ganong WF. Review of medical physiology, 12 th edition. Los Altos CA. Lange medical publications. 1985: 417.
- 412.- Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992. 256: 102-105.
- 413.-Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of patients with dyspepsia in the UK. *Gastroenterology* 1994; 107: 1671-1674.
- 414.- Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *H pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340. 1194-1195.
- 415.- Hänninen ML. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 515-518
- 416.- Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340: 1194-1195.
- 417.- Dore MP, Osato MS, Malaty HM, Graham DY. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. *Helicobacter* 2000; 5: 165-168.
- 418.- Widjojatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GPTH. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for detection of *Salmonellae* in fecal sample. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3195-3199.
- 419.- Nortarnicola M, Russo F, Cavallini A et al. PCR identification of *H pylori* DNA in feces in patients with gastroduodenal pathology. *Med Sci Res* 1996; 24: 785-787.
- 420.- Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *H.pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microb* 1995. 33; 2162-2165.
- 421.- Watanabe T, Tomita S, Kudo M et al. Detection of *H pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scan J Gastroent* 1998. 33: 1140-1143.

- 422.- Monteiro L, Bonnemaïson D, Verkris A et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in faeces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 995-998.
- 423.- Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Detection of *Helicobacter pylori* in human faeces by PCR: application of a technique to remove PCR inhibitors. *Gut* 1999; 45 Suppl 3: A124.
- 424.- Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA et al. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastric patients. *Lancet* 1993:341. 447
- 425.- van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AMD, Schirm J, Snijder JAM. Use of PCR with faeces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. *J Clin Microb* 1994: 1994; 32: 1346-1348.
- 426.- Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Be'be'ar, H. Lamouliatte, and F. Megraud. 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2724-2728.
- 427.- Taylor, D. E., Z. Ge, D. Purych, T. Lo, and K. Hiratsuka. 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2621-2628.
- 428.- Versalovic, J., D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, D. Y. Graham, and M. F. Go. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:477-480.
- 429.- Furuta, T., Soya, Y. et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 1810-1815.
- 430.- Torres P. , Budesca Brú X. Costes de la endoscopia digestiva en un hospital universitario de nivel II.- *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26(5):279-87.
- 431.- Wilrich&Wilrcih: Estimation of the POD Function and de LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J of AOAC International* Vol. 92 No 6, 2009.
- 432.- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66-74.
- 433.- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 18:1185- 1193

434.- Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761–2764.

435.-Hanninen ML. Sensitivity of *H.pylori* to different bile salts. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1.991;10: 515-518.

436.- MapstoneNP, Lynch DA, Lewis AF, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, et al. Identification of *H.pylori* infection DNA in the mouths and stomach of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol*. 1.993;46:540-3

437.- Megraud F. *H.pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advantages in testing. *Gut* 2004; 53:1374-84.

438.-Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, et al CagA status and eradication treatment outcome of *H.pylori* treatment of triple therapies in patients with non ulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 2001; 2001:39 1319-22.

