

Monografía

***Helicobacter pylori* e infecciones asociadas**Estrella Cervantes García¹¹ Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genómica Bacteriana, Facultad de Medicina, UNAM.**Introducción**

En los albores del siglo XXI, la infección por *Helicobacter pylori*, sigue siendo desde su descubrimiento por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren en 1982, uno de los fenómenos científicos de mayor importancia en la literatura biomédica mundial.¹

Por su semejanza con las bacterias patógenas del género *Campylobacter*, que se encuentran en el tracto gastrointestinal, llamaron al nuevo microorganismo *Campylobacter pyloridis* o *pylori*. A principios de 1983 estos mismos investigadores publicaron los primeros datos sobre esta bacteria. Pocos meses después otros investigadores lograron aislar a esta bacteria, donde vieron que no encajaba dentro del género *Campylobacter*, por lo que se le ubicó en un nuevo género con el término de *Helicobacter*.² Existen más de 15,300 trabajos publicados donde demuestran el interés de la comunidad científica mundial por la infección con *Helicobacter pylori*.² Hoy sabemos que la infección por *H. pylori* es la enfermedad bacteriana crónica más extendida del mundo. Afecta a más de la mitad de la población mundial, con una distribución vinculada con el grado de desarrollo económico de cada país.³

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa patógena del tracto gastrointestinal. Es el principal agente etiológico de la gastritis crónica superficial, además de ser un importante cofactor en la etiología de la úlcera péptica, también se le asocia con la patogenia del cáncer gástrico y del linfoma gástrico tipo MALT.⁴

Los mecanismos por los cuales *H. pylori* infecta al humano aún son controvertidos. Se sabe que el huésped desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar a esta bacteria, pero que puede tener un papel fundamental en la evolución de la infección hacia distintas formas clínicas tan variadas como una gastritis superficial leve a una ulceración gastroduodenal.⁵

Epidemiología y transmisión

Helicobacter pylori tiene una distribución mundial con una mayor probabilidad de infección durante la infancia y su prevalencia va aumentando con la edad. Se ha observado

que disminuye al mejorar las condiciones higiénico-sanitarias del medio.

En general existen dos patrones epidemiológicos básicos que definen su extensión, ya que los países en condiciones precarias higiénico-sanitarias presentan tasas elevadas de infección durante la infancia entre un 70-80%. Son los denominados países o áreas geográficas tipo 1. Mientras que en la mayor parte de las naciones desarrolladas, llamadas regiones o grupos tipo 2, la infección se concentra en la edad adulta (efecto cohorte) con prevalencias del 60%.⁶

En Estados Unidos la incidencia de la infección es entre un 0.5% y 1% para menores de 10 años, aumentando a un 50% con la edad. También se ha observado que en los grupos afroamericanos, hispanos e indios nativos de ese país la infección por *H. pylori* se presenta en la infancia con una transmisión intrafamiliar alta, pero existe la asociación con el nivel socioeconómico bajo, higiene deficiente y hacinamiento.⁶

Estudios realizados en Latinoamérica, en países como Costa Rica y Brasil, han reportado una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *H. pylori* por cada 100,000 habitantes. En México también se han observado regiones de mayor riesgo, como Chiapas.^{8,9}

En un estudio seroepidemiológico realizado en 1997, se trabajó con un banco de sueros representativo de la población mexicana (11,605), procedentes de personas cuya edad estaba entre 1 y 90 años. Los resultados mostraron que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaron anticuerpos contra *H. pylori* y que la seropositividad aumentó hasta un 50% en los niños de 10 años de edad, sugiriendo que la infección por este microorganismo en nuestro país se adquiere a edades tempranas.⁷ No se ha demostrado que exista influencia del sexo y tampoco se han identificado evidencias claras a favor de una relación étnica o racial. En la actualidad no se conoce un reservorio no humano, aunque existen reportes de experimentos realizados con primates en los cuales se observó que desarrolla un cuadro clínico semejante al humano.¹⁰ Los mecanismos de transmisión no están muy claros pero por lo común de la infección y su amplia distribución puede ser de persona a persona, vía oral-oral, oral-fecal y por el agua contaminada.¹¹

Microbiología

Helicobacter pylori es una bacteria patógena del tracto gastrointestinal. Coloniza el estómago del hombre permaneciendo en la mucosa gástrica por años.¹²

H. pylori es un bacilo Gram-negativo, curvo o espirilado, que mide de 2 a 3 nm por 3.5 por 0.5 nm de ancho, posee 6 flagelos unipolares que le dan gran movilidad, es un microorganismo microaerófilico. Para su crecimiento se utilizan medios enriquecidos como Campy Bap, medio de Brucela o de Skirrow suplementados con sangre de caballo y suero fetal bovino.¹³ Su característica bioquímica más sobresaliente es la producción de ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono. Se realiza la prueba de la oxidasa y catalasa para su identificación.¹⁴

Patogénesis

A pesar de la gran incidencia no todas desarrollan la enfermedad. Al parecer el tipo de cepa bacteriana que coloniza la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad.^{15,16}

Se han propuesto varios mecanismos de virulencia para *H. pylori*; una enzima llamada ureasa, cuya función es proteger a la bacteria frente al pH ácido originado por los productos oxidativos del huésped. La ureasa tiene un peso molecular de 550 kDa, está formada por dos subunidades denominadas como UreA y UreB y es una de las proteínas más abundantes secretadas por el microorganismo.^{15,17} La ureasa necesita como cofactor el níquel. Juntos hidrolizan la urea produciendo amonio, lo que le permite a la bacteria rodearse de un medio alcalino protegiéndose de la secreción ácida gástrica.¹⁸

H. pylori posee varios flagelos que le dan gran movilidad. Éstos están compuestos por proteínas llamadas flagelinas, cuyo peso molecular es de aproximadamente 50,000 a 60,000 kDa. Las flagelinas están codificadas por los genes flaA y flaB.^{19,20}

Para la colonización de este microorganismo debe de haber primero una adhesión a la mucosa gástrica, la cual se inicia a través de varias adhesinas. Las adhesinas son proteínas glicoconjugadas o lípidos bacterianos involucrados en el inicio de la colonización.^{21,22} Una vez que *H. pylori* alcanza la capa epitelial, la bacteria se adhiere a través de varias adhesinas como BabA, SabA, AlpA, AlpB, Hopo, HpA.^{23,24}

La adherencia de la bacteria a los receptores de las células del huésped induce cambios celulares, los cuales incluyen una señal de transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias como los neutrófilos y los monocitos. BabA es la adhesina que más ha sido estudiada, utilizando para su caracterización la cepa de *H. pylori* CCUG 17 875. Esta adhesina facilita la unión del microorganismo a los antígenos de Lewis b. La adhesina BabA contiene dos copias del gen

babA denominados como babA1 y babA2. La cepa que contiene el gen bab2 codifica para una proteína funcional de la membrana externa, la cual se une al antígeno de Lewis b; y babA1 tiene una pérdida de un segmento de 10 nucleótidos que contiene el codón de inicio para la traslación, lo cual induce a una delección.^{25,26}

También existen enzimas como las fosfolipasas A2 y C, que tienen un papel importante dentro de la patogenia de *H. pylori*, al degradar los componentes lipídicos de la mucosa que le proporciona integridad. Igualmente existen otras enzimas relacionadas con actividad proteolítica como la catalasa y la superoxidasa dismutasa que protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos, producto de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos.²⁷

Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que posee en su antígeno "O" los carbohidratos de Lewis "x" o Lewis "y" o ambos. Los antígenos de Lewis son glicoconjugados con diferente número de residuos de fucosa, los cuales pueden ser de 4 tipos Le^a, Le^b, Le^x, Le^y.^{28,29} Los antígenos de Lewis participan en la patogénesis ayudando al microorganismo a evadir la respuesta inmune durante la colonización en el estómago, favoreciendo a la bacteria su permanencia en el nicho gástrico, y por otro lado induce una respuesta autoinmune contra los antígenos de Lewis que expresa *H. pylori* y que son compartidos por las células eucariotas contribuyendo a un daño directo o indirecto.³⁰⁻³²

La mayoría de las investigaciones se han centrado en dos factores de virulencia: la citotoxina vacuolizante VacA, codificada por el gen vacA presente en todas las cepas de *H. pylori*, y la proteína CagA codificada por el gene cagA que se encuentra en la membrana externa, la que al parecer no presenta citotoxicidad. Por sí misma se le considera altamente inmunogénica, así como también un marcador de virulencia.

Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por genes localizados en una isla de patogenicidad asociada a cag (PAI-cag). Esta isla tiene características similares a otras islas de patogenicidad encontradas en bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Yersinia*.³³⁻³⁵

La isla de patogenicidad (PAI-cag) puede estar organizada en forma diferente, dependiendo de la cepa que se estudia. Esta isla puede estar en una misma región continua o estar dividida en dos regiones cag I y cag II por secuencias del cromosoma bacteriano.^{32,33,35}

La proteína de la membrana externa, denominada proteína asociada a la citotoxina CagA es codificada por el gen cagA. Es una proteína de la membrana externa, tiene un peso molecular entre 120 a 140 kDa y se considera altamente inmunogénica. Su función se desconoce. Sin embargo, la detección de anticuerpos contra CagA de *H. pylori* está bien documentada.^{36,37}

Las cepas de *H. pylori* cag⁺ se adhieren a las células del epitelio gástrico, donde inducen la secreción de un mediador

inflamatorio como la interleucina-8 (IL-8), a través de la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B).³⁸⁻⁴⁰ También se ha observado que la proteína CagA activa la transcripción del factor AP-1 y la cascada de las cinasas ERK/MAP permitiendo la expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-jun.^{39,41}

Cover y col, propusieron que el gen cagA sea considerado como marcador de virulencia. En estudios seroepidemiológicos detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG por la técnica de ELISA contra la proteína CagA en pacientes con úlcera duodenal en un 87.5%, con úlcera gástrica en un 76% y con dispepsia no ulcerosa un 56.4%.⁴²

A los pacientes infectados con cepas que portan el gen cagA y expresan la proteína CagA se les ha asociado con el desarrollo de gastritis activa crónica, gastritis atrófica, úlcera péptica y un aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico.⁴³⁻⁴⁵

La citotoxina vacuolizante (VacA) es un factor de virulencia importante. Está codificada por el gen vacA. Se encuentra presente en aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori* de aislamientos clínicos. La presencia de esta citotoxina está asociada con daño en el tejido epitelial y la úlcera péptica. La citotoxina VacA es un gen constitutivo y se encuentra en una sola copia en el cromosoma de *H. Pylo-ri*.^{46,47}

La citotoxina VacA es un factor de virulencia importante en el desarrollo de las enfermedades gástricas. Esta citotoxina tiene un efecto citopático sobre cultivos celulares; además de ser responsable de la formación de vacuolas *in vivo* en células del epitelio gástrico. Existen estudios realizados en ratones lactantes a los que se les administró vía oral la citotoxina donde se mostró que ésta es capaz de producir degeneración en la mucosa gástrica.⁴⁸

En otros estudios realizados *in vitro* han demostrado que VacA se une a la célula por interacción con receptores específicos, y que esta unión depende de la concentración de la citotoxina así como de la saturación de los receptores en la superficie celular.⁴⁸

Diagnóstico

Para diagnosticar la infección por *Helicobacter pylori* se utilizan diferentes métodos como los agresivos o no agresivos, directos o indirectos.⁵⁴⁻⁵⁷

Métodos directos. Histología: permite estudio anatómopatológico de la muestra gástrica y observar al microorganismo. Se utilizan varios tipos de tinciones para visualizar mejor al organismo como:

a) Tinción de Gram: se necesita una muestra fresca de las biopsias que se tomen. b) Tinción de Giemsa: es la que mejor resultados da, ya que permite una identificación rápida del microorganismo. c) Tinción de hematoxilina-eosina: permite realizar el estudio histológico, la infección por *H. pylori* es

barata y se realiza muy rápido. También se puede realizar la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales contra *H. pylori* para su detección.

Cultivo

Es un método de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, imprescindible en la investigación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos por *H. pylori*. No es una técnica de rutina ya que sólo está indicada cuando hay resistencia del microorganismo al tratamiento.

Prueba de la ureasa

Es una prueba rápida, no es costosa y permite obtener el diagnóstico en un corto tiempo. *H. pylori* hidroliza la urea por la producción de la ureasa, produciendo iones amonio, por lo que aumenta el pH de la solución produciendo un viraje del color del indicador. En la actualidad existen varias pruebas basadas en la ureasa, siendo las más utilizadas el CLO-Test, el caldo de Christensen y las soluciones de urea con concentraciones variables son de gran sensibilidad y especificidad.

Pruebas moleculares

La prueba de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), es de gran sensibilidad y especificidad muy elevadas, cercanas al 100%. Esta prueba por lo general se realiza en estudios de investigación, ya que requiere de equipo sofisticado y personal capacitado.

Métodos indirectos

1. **Prueba del aliento** con urea marcada (¹³C ó ¹⁴C): es una prueba fácil de realizar, sin molestias y bien tolerada. Se basa en la capacidad de *H. pylori* y la ureasa que produce para hidrolizar rápidamente una solución de urea marcada previamente, valorando la totalidad de la mucosa gástrica. Esta prueba detecta la infección activa con pequeñas cantidades del microorganismo.

Consiste en que el paciente ingiera cápsulas, tabletas o una solución marcada previamente con ¹³C ó ¹⁴C, después de 15 a 30 minutos, se colecta el aire espirado en tubos de vidrio o plástico, que se sellan y en un espectrómetro se analiza la presencia de CO₂ en el aliento.^{13 y 14}. Por lo general se utiliza ¹³C. No se utiliza en niños ni en mujeres embarazadas.

2. **Serología:** es una prueba sencilla y barata basada en la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos de *Helicobacter pylori*, debida a una reacción inmunológica del individuo. Esta técnica no hace diferencia entre las personas con infección activa y la enfermedad de pa-

cientes infectados pero que son asintomáticos. Esta técnica es útil en estudios epidemiológicos o cuando no se puede realizar endoscopia.

Diagnóstico alternativo

Ni la PCR ni los anticuerpos en saliva son apropiados para el uso clínico rutinario. Se deberían realizar campañas educativas que informen a los médicos de atención primaria sobre los métodos más apropiados para la evaluación de la infección causada por *Helicobacter pylori*.

Dispepsia. Pacientes con síntomas dispépticos de más de 3 meses de duración y mayores de 30 a 40 años deberán ser sometidos a endoscopia y deberá tomarse biopsia para su estudio.

A los pacientes con historia de úlcera péptica o con úlceras sangrantes que no están asociadas al uso de antiinflamatorios no esteroides, se les debe buscar si están infectados por *H. pylori* y erradicarlo con tratamiento. Para conocer si ya no existe la infección por esta bacteria, deberá de realizarse el estudio con la prueba del aliento con urea de 4 a 6 semanas después del tratamiento.

En niños infectados con *H. pylori*, deben de realizarse pruebas no invasivas como la serología, la prueba del aliento con urea marcada ^{13}C , o la búsqueda de antígenos en heces.⁵⁶⁻⁵⁸

Tratamiento

Existe un gran número de fármacos que pueden ser utilizados en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*. Sin embargo la multiplicidad de fármacos, la dosis y la duración del tratamiento así como las pautas para erradicarlo es muy diversa, por lo que la decisión sobre escoger uno u otro fármaco para el tratamiento es difícil. Los tratamientos que se utilizan en la actualidad se basan en combinaciones dobles o triples. La asociación de metronidazol con bismuto o metronidazol, bismuto y amoxicilina o tetraciclina son las que más se utilizan. Su duración oscila entre 7 y 28 días aproximadamente.

Otros tratamientos utilizan la combinación de un antibiótico con un inhibidor de la bomba de protones como la combinación de amoxicilina y omeprazol. Ésta ha presentado una eficacia de entre el 60 y 70%; aunque existen trabajos que opinan que esta combinación tiene una respuesta baja de entre el 20 y 40%. En la actualidad se utilizan terapias triples asociando un antisecreto potente con dos antibióticos tal como el omeprazol, con claritromicina y amoxicilina o metronidazol o tinidazol.⁶⁰⁻⁶³

Conclusión

Desde hace más de un siglo se habían observado microorganismos con morfología en espiral en la mucosa gástrica

que llamaban la atención por sobrevivir en medio ácido; el hallazgo de *Helicobacter pylori* por Marshall y Warren, vino a derribar el paradigma e iniciar una nueva era en la génesis de la patología gastroduodenal.

El tema requiere de más investigación, como son la búsqueda de métodos rápidos y efectivos para evaluar la resistencia a los antibióticos, o bien identificar antígenos bacterianos con posibilidad de utilizarlos como vacuna contra la gastritis y las úlceras pépticas.

El tratamiento de la enfermedad por *Helicobacter pylori* es relativamente sencillo y los nuevos esquemas que se tienen permiten obtener tasas altas de éxito terapéutico. Teniendo en cuenta las evidencias epidemiológicas con la adquisición de la infección durante la niñez, y con la adquisición del genoma completo realizado en dos cepas de *H. pylori*, la vacunación surgirá como la herramienta más útil para prevenir la colonización inicial y evitar así las consecuencias adversas de la misma en los portadores.

Referencias

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-1275.
2. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*: The size of the problem. *Gut* 1998; 43: S6-S9.
3. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S116-S128.
4. III° Simposio Internacional de Patología Gastroduodenal "Helicobacter pylori" Primer Consenso Argentino para su Diagnóstico y Tratamiento. Abril 2000.
5. Pakodi F, Abdel-Salam OM, Debrececi A, Mozsik G. *Helicobacter pylori*, one bacterium and a broad spectrum of human disease' An overview. *J Physiol Paris* 2000; 94: 139-152.
6. Cave DR. Epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 1997; 113: S9-S13.
7. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez GI, Gomez A, Camorlinga Ponce M. A community-based Seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 1089-1094.
8. Ewerhart JE, Kruszon-Moran D, Pérez-Perez GI. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infect Dis* 2000; 181: 1359-1363.
9. Torres J. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65: 13-1.
10. Bardhan PK. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 973-978.
11. Forman D, Goodman KJ. The epidemiology of stomach cancer: correlating the past with the present socioeconomic influences early life can influence mortality in adult life. *BJM* 2003; 320: 1682-1683.
12. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and pre-neoplastic gastric lesions in Chiapas Mexico. *Cancer* 1993; 71: 297-301.
13. Dobois A, Berg DE, Incecik ET, Fiala N, Heman-Ackah LM. Transient and persistent infection of nonhuman primates with

- Helicobacter pylori*: Implications for human disease. Infect Immun 1996; 64: 2885-2886.
14. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva JJ. *Helicobacter pylori* water systems for human use in Mexico City. Water Sci Technol 2001; 43: 93-98.
 15. Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y, Castillo-Rojas G, Ponce de León S. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. Arch Med Res 2001; 32: 458-467.
 16. Blaser JM. *Helicobacter pylori*. Prince and pract inf dis. Update 1991; 9: 3-9.
 17. Goodwin C, Armstrong J, Peters M. Microbiology of *Campylobacter pylori*. In: Blaser M, Ed *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York, Medical Publishers; 1989: 25-49.
 18. Koneman EW, Allen SD, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott William and Wilkins, Fifth Edition, 1997: 335-39.
 19. Rivas TF, Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed 2000; 11: 187-205.
 20. McGee DJ, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. Curr Top Microbiol Immunol 1999; 241: 155-180.
 21. Dunn B, Campbell G, Perez-Perez G. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1990; 265: 9464-9468.
 22. Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. Am J Gastroenterol 1992; 87: 1554-1560.
 23. Cover TL, Puryear W, Perez-Peres GI, Blaser MJ. Effect of urease on HeLa cell vacuolating induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. Infect Immun 1991; 59: 1264-1270.
 24. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1992; 37: 123-127.
 25. Geis G, Surebaum S, Forsthoff B, Leying H. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1993; 38: 371-377.
 26. Josenhans C, Labigne A, Surebaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: Both flagellin subunits, FlaA and FlaB are necessary for full motility in *Helicobacter* species. J Bacteriol 1995; 177: 3010-3020.
 27. Wadstrom T, Hirno S, Boren T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of human gastric mucosa. Aliment Pharmacol Ther 1996; 10: 17-27.
 28. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science 2002; 297: 573-578.
 29. Moran AP. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. J Physiol Pharmacol 1999; 50: 787-805.
 30. Bliss CM, Golenblock DT, Kates S, Linevsky JK. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. Infect Immun 1998; 66: 5357-5363.
 31. Abdulhamid M, Alkout M, Blackwell CC. Increases inflammatory responses of persons of blood group O to *Helicobacter pylori*. J Infect Dis 2000; 181: 1364-1369.
 32. Aspinall GO, Monteiro MA. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structure of the O antigen and core oligosaccharide strains. Biochemistry 1996; 35: 2498-2504.
 33. Appelmek BJ, Martino MC, Veenhoff F. Phase variation in H type 1 and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect Immun 2000; 68: 5928-5932.
 34. Covacci A, Rappouli R. *Helicobacter pylori*: Molecular evolution of a bacterial quasispecies. Curr Opin Microbiol 1998; 1: 96-102.
 35. Ge Z, Taylor D. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Annu Rev Microbiol 1999; 53:355-387.
 36. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhidorfer I. Pathogenicity island of virulent bacterial structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol 1997; 23: 1089-1097.
 37. Covacci A, Censini S, Bugnoli M. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori*: Associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5791-5795.
 38. Evans D, Quiroz D, Mendes E. *Helicobacter pylori* CagA Status and s and m alleles of VacA in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*: Associated Gastric Disease. J Clin Microbiol 1998; 36: 3435-3437.
 39. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Teleford JL. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin. Infect Immun 1995; 63: 94-98.
 40. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cell protein. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 1259-1264.
 41. Stein M, Rappouli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 1263-1268.
 42. Dundon WG, De Bernard M, Montecucco C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol 2001; 290: 647-658.
 43. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamasaki S. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 14428-14433.
 44. Blase M, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover T. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma in the stomach. Cancer Res 1995; 55: 2111-2115.
 45. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Funai F. Major virulence factors, VacA and CagA are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut 1998; 42: 338-343.
 46. Nomura A, Stemmann G, Chyan P, Perez-Perez GI. *Helicobacter pylori* infection and risk for duodenal and gastric ulceration. An Inter Med 1994; 120: 977-981.
 47. Bernard A, Papini E, Filoppis V, Gottardi E. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. J Biol Chem 1995; 270: 23937-23940.
 48. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kick D. Diversity of *Helicobacter pylori* vac A and cagA genes and relationship to vacA and protein expression cytotoxin production and associated diseases. J Clin Microbiol 1998; 36: 944-948.
 49. Weel JF, van der Huist Ewm, Gerrits Y. The interrelationship between Cytotoxin-A associated Gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. J Infect Dis 1998; 173: 1171-1175.
 50. Dumm BE, Cohen H. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 72041.
 51. Savalino V, Vinerie S, Celle G. The ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gut 1999; 45: 18-22.
 52. Lahner E, Vaira D, Figura N, Pilozi E, Pasquali A. Role of non invasive test (¹³C Urea Test Breat and stool antigen test) as additional tools in diagnosis of *Helicobacter pylori* in patients with atrophic body gastritis. Helicobacter 2004; 9: 436-438.

53. Perez-Perez CI, Cutler AF, Blaser MJ. Value of serology as a non invasive method to evaluate the efficacy of treatment in *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol 2002; 28: 103-110.
54. Loy Ct, Irwing LM, Katerekeis PH. Do commercial serological kits for *Helicobacter pylori* infection differ in accuracy. A meta-analysis. Am J Gastroenterol 1996; 91: 1138-1144.
55. Perez TE, Montes M, Alcorta M. Non endoscopic method to obtain *Helicobacter pylori* for culture. Lancet 1995; 345: 622-623.
56. Leodolter A, Agha-Amiri K, Peitz U, Gerards C. Validity of a *Helicobacter pylori* stool antigen assay for the assessment of *Helicobacter pylori* status following eradication therapy. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13: 673-676.
57. Vaira D, Holton J, Menegatti. New immunological assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gut 1999; 45: 23-27.
58. Monteiro L, Gras N, Vidal R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR, DNA stability and removal inhibitors. J Microbiol Meth 2001; 45: 89-94.
59. Monteiro L, Gras N, Mégraud F. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. J Clin Microbiol 2001; 39: 3778-37780.
60. Lara LF, Cisneros Gm, Gurney M. One-day quadruple therapy compared with 7-day triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. Arch J Med 2003; 163: 2079-2084.
61. Zullo A, Vaira D, Vakil N. High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 719-726.
62. Sanjuro JL, Pérez J, Hidalgo H, Geyne A. Eficacia y seguridad entre diferentes dosis de nitazoxanida + subcitato de bismuto + lanzoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori*. Revista Médica del Hospital General de México 1999; 14: 172-175.
63. Bazzoli F. Key points from the revised Maastrich consensus Report: the impact general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13: S3-S7.
64. Miwa H, Ohkura R, Murai T. Impact of rabeprazole, a new proton pump inhibitor, in triple therapy for *Helicobacter pylori* infection comparison with omeprazole and lansoprazole.
65. Gasbarrini A, Franceschi F, Gasbarrini G. Extraintestinal pathology associated with *Helicobacter* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997; 23: 231-233.
66. Leontiadis GI, Sharman VK, Howden CW. Non-gastrointestinal tract associations of *Helicobacter pylori* infection. Arch Intern Med 1999; 159: 925-940.