



Diagnóstico y tratamiento de infecciones causadas por *Helicobacter pylori*

Estrella Cervantes García*

Palabras clave:

Helicobacter pylori, diagnóstico, tratamiento, infección.

Key words:

Helicobacter pylori, diagnostic, treatment, infection.

* Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina UNAM.

Correspondencia: Estrella Cervantes García
 Departamento de Microbiología y Parasitología
 5° Piso del Edificio de Investigación, cubículo 1
 Facultad de Medicina, UNAM.
 Of. 56232134
 Cel. 5521918733

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se adquiere durante la infancia, desarrollando una respuesta inflamatoria y erosión de la mucosa gástrica en más de 50% de la población mundial. Se ha reconocido como agente etiológico en el desarrollo de úlcera, gastritis crónica, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT). Durante la infección se pueden presentar signos y síntomas como dolor, náuseas, dispepsia, pérdida de peso. Debido al potencial patogénico que se ha detectado en esta bacteria, es necesario contar con métodos eficaces de diagnóstico para su detección y llevar a cabo un tratamiento eficaz. Las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se pueden dividir en métodos invasivos como la endoscopia gástrica para la obtención de biopsias, cultivo, PCR, y técnicas no invasivas, que son menos agresivas para el paciente. Esta revisión constituye una actualización de las principales técnicas utilizadas para el diagnóstico de *H. pylori* y los tratamientos que existen hasta este momento.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is acquired during childhood, developing an inflammatory response and erosion of the gastric mucosa in more than 50% of the world population. It has been recognized as an etiological agent in the development of ulcers, chronic gastritis, gastric cancer and lymphoma of gastric mucosal associated lymphoid tissue (MALT). During the infection there may be signs and symptoms such as pain, nausea, dyspepsia, weight loss. Due to the pathogenic potential that has been detected in this bacterium, it is necessary to have effective diagnostic methods for its detection and to carry out an effective treatment. The techniques used for the diagnosis of *H. pylori* infection can be divided into invasive methods such as gastric endoscopy for obtaining biopsies, culture, PCR, and non-invasive techniques, which are less aggressive for the patient. This review constitutes an update of the main techniques used for the diagnosis of *H. pylori* and the treatments that exist up to now.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por lo general, se adquiere durante la infancia. La infección se relaciona con el nivel socioeconómico, condiciones higiénicas deficientes y un grado elevado de hacinamiento; es adquirida por la ingestión oral de la bacteria y transmitida principalmente dentro de las familias en la infancia. La vía fecal-oral parece ser una de las vías de transmisión más probables.

Cincuenta por ciento de la población mundial está colonizada por *H. pylori*. La bacteria se adapta fuertemente a la mucosa gástrica debido a sus características, que le permiten entrar dentro del moco, nadar, atacar a las células epiteliales y evadir la respuesta inmune,

lo que da como resultado la colonización y transmisión persistente.

A nivel mundial existen cepas de *H. pylori* que difieren en su virulencia; asimismo, los diferentes factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad, vinculados al hospedero y al ambiente (como son la edad, el género, la región geográfica, el nivel socioeconómico), determinan diferencias en la expresión de la enfermedad; estos factores influyen en la incidencia y prevalencia de la infección por *H. pylori*.

La prevalencia es alta en países en vías de desarrollo y baja en países desarrollados; además, dentro de un mismo país puede haber variación en la prevalencia entre las poblaciones urbanas y de mayor nivel económico y las poblaciones rurales. Estas variaciones tienen

Recibido:
28/10/2016
Aceptado:
24/11/2016

que ver con las diferencias socioeconómicas entre estas poblaciones. En los países en desarrollo, la infección por *H. pylori* constituye un problema de salud pública. La alta prevalencia de la infección exige el desarrollo de intervenciones del sector salud. Es probable que el desarrollo de una vacuna terapéutica sea la única estrategia que logre determinar una diferencia decisiva en la prevalencia e incidencia a nivel mundial. Sin embargo, siempre y cuando los recursos lo permitan, la disponibilidad y asequibilidad de los exámenes necesarios para el diagnóstico varían ampliamente. El enfoque a corto plazo sería una estrategia para «diagnosticar y tratar la infección por *H. pylori*» para aquellos individuos en riesgo de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico, así como para aquellos con dispepsia problemática. El objetivo de este trabajo es conocer el estatus actual que existe para diagnosticar y tratar infecciones por *H. pylori*.¹⁻⁴

DIAGNÓSTICO

Actualmente existen varios métodos para diagnosticar la presencia de *H. pylori*. Sin embargo, más importante que el diagnóstico es saber en quién se debe investigar su presencia. En algunos lugares, hasta 90% de la población está colonizada por esta bacteria, y los exámenes serán positivos en casi todo mundo. Por lo tanto, no tiene sentido solicitar la investigación de *H. pylori* en personas que no presentan una sintomatología específica.

Helicobacter pylori se puede diagnosticar a través de dos tipos de métodos:

- a) Métodos no invasivos, que no requieren de endoscopia.
- b) Métodos invasivos, que requieren de realizar una endoscopia con toma de biopsia gástrica.

Un método de diagnóstico ideal es aquel que no es invasivo ni costoso, es seguro, además de estar disponible en todos los centros de salud, y es capaz de diferenciar una infección activa de una pasada. Ninguno de los métodos que se utilizan en la actualidad cumple con estas características. Todos los métodos presentan ventajas y desventajas; al momento de elegir alguno se debe tener en cuenta el fin: epidemiológico, de diagnóstico o seguimiento, el centro de salud donde se realiza, así como las características del paciente. Todos los métodos presentan ventajas y desventajas.⁵⁻⁸

Métodos invasivos

Histología: Es un método que sirve para diagnosticar la infección por *H. pylori*; el examen histológico nos

proporciona datos sobre inflamación, metaplasia intestinal, atrofia glandular, displasia y neoplasia. Este análisis es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. El estudio histológico de la biopsia es un método sencillo que permite conocer las lesiones presentes en la mucosa, además de detectar la densidad de colonización en infecciones por *H. pylori*. El análisis histológico es importante tanto para el diagnóstico como para determinar el daño del tejido durante la infección por *H. pylori*. Estos estudios brindan información sobre la presencia de polimorfos nucleares, además de dar un diagnóstico sobre la gravedad de la gastritis, metaplasia y/o atrofia en el tejido analizado.¹⁻⁸

La técnica de tinción es fácil, rápida, de bajo coste y de gran utilidad. Las tinciones que se han utilizado son hematoxilina-eosina, Warthin-Starry con nitrato de plata, Giemsa, la de Gram, carbolfuchina.⁹⁻¹²

Existen otras técnicas complementarias para el estudio histológico, como la inmunohistoquímica y la técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*), que se han empleado para la detección de *H. pylori* con una sensibilidad de 98 y 100% de especificidad. A pesar de los buenos resultados que se reportan con la técnica de FISH, se necesita un microscopio de fluorescencia, oligonucleótidos fluorescentes específicos y varios reactivos que hacen que esta técnica sea costosa.¹³⁻¹⁵

Es necesario realizar una endoscopia para la toma de biopsia para el estudio histológico, lo que permitirá diagnosticar la infección mediante el cultivo de la misma; además, el cultivo es imprescindible para conocer la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de dar un tratamiento efectivo a cada paciente.

La biopsia debe protegerse de la deshidratación y mantenerse a temperatura baja. Se recomienda guardarla a 4 °C si se va a procesar dentro de las primeras horas o congelar a -70 °C en caso de que se demore más tiempo. Los medios de transporte más utilizados son solución de glucosa al 20% y suero fisiológico. En algunos estudios se sugiere que se transporte en solución salina estéril y que se siembre directamente la biopsia en agar chocolate o en el medio de transporte *Portagerm pylori*.¹⁶

Cultivo. El cultivo es considerado el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones por *H. pylori*. La principal ventaja que posee este método es que se puede estudiar la sensibilidad antimicrobiana. Además, el cultivo es el único medio para obtener y conservar cepas para conocer los factores de virulencia, la purificación de antígenos específicos y realizar estudios posteriores de genómica y proteómica. La desventaja del cultivo es que se trata de un método lento de diagnóstico que puede demorarse varios días, así como su baja sensibilidad en

condiciones óptimas, por los requerimientos exigentes para el cultivo y lo costoso que es.^{6,7}

Para realizar el aislamiento de *H. pylori*, se han utilizado varios medios de cultivo, como caldo cerebro-corazón (BIH), agar Columbia, Brucella, Wilkins-Chalgren y Muller-Hinton; todos estos medios son suplementados con sangre de caballo, carnero o humano en 5-10%, así como con hemina, isovitalex, ciclodextrina y almidón, además de antibióticos. De todos los medios de cultivo, el agar Columbia suplementado con 7% de sangre y antibióticos como trimetopina, vancomicina y anfotericina B ha sido empleado con mayor frecuencia para el aislamiento de *H. pylori*. Esta bacteria requiere, además, de una atmósfera microaerófila, humedad y una temperatura entre 35 °C-37 °C, con un tiempo de incubación de cinco a 10 días. *H. pylori* se identifica por su morfología colonial como colonias pequeñas grisáceas y brillantes de 1 mm de diámetro; son Gram negativas, espiriladas o esféricas, ureasa, catalasa y oxidasa positivas.¹⁶⁻²⁰

Prueba de la ureasa. Es una técnica cualitativa que determina la actividad de la enzima ureasa en una pequeña muestra de mucosa gástrica; dicha prueba es universalmente empleada para detectar la presencia de este microorganismo. Se realiza colocando una pequeña muestra de biopsia en un tubo con urea que contiene un indicador de pH. Si la muestra presenta actividad ureasa, se hidroliza la urea en anhídrido carbónico y amoníaco; se observa mediante el cambio de color en el medio (amarillo a rosa).²¹⁻²⁴ Entre las primeras pruebas comerciales utilizadas que se desarrollaron basadas en esta técnica se encuentran la CLO test y PyloriTek, con las que se han obtenido muy buenos resultados en el diagnóstico. También, existen otras pruebas comerciales como la GUT test y la MIU test (*motility indole urease test*). Para la GUT test se ha reportado una especificidad de 100% y una sensibilidad de 95.3%; esta prueba puede obtenerse a los 60 minutos de incubarse la muestra. Por otra parte, con la prueba de MIU se reportó mayor sensibilidad que con la CLO test cuando se evaluó una sola muestra gástrica. Sin embargo, recientemente se demostró que al aumentar el número de muestras gástricas, la CLO test incrementa notablemente su sensibilidad.²⁵⁻²⁷

La especificidad de la prueba de la ureasa es alta debido a que el número de bacterias diferentes de *H. pylori* en la cavidad gástrica es escaso y los análisis se realizan a temperatura ambiente, lo cual limita la posible proliferación de otras bacterias durante la realización de la prueba. Por su sencillez, rapidez y bajo costo, se considera como una técnica de elección para el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* en pacientes que son sometidos a endoscopia. Sin embargo, la sensibilidad

de la prueba puede verse afectada en individuos que han recibido tratamiento con antibióticos y en aquellos tratados con fármacos inhibidores de la bomba de protones.²⁰⁻²³

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite utilizar el DNA para distintos estudios aparte del diagnóstico de la infección, en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas.¹⁸ Actualmente se está utilizando la PCR en tiempo real, que permite la detección de cepas resistentes a los antibióticos. Para la técnica se utilizan diferentes iniciadores de secuencias (cebadores) para amplificar varios genes de virulencia específicos de *H. pylori* como CagA y VacA²⁸ y secuencias altamente conservadas del gen que codifica para el ácido ribonucleico de la subunidad 16S del ribosoma (ARNr 16S).^{6,7,17} De todos los genes, el gen *glmM* que codifica para la fosfoglucoamina mutasa ha sido el más empleado para el diagnóstico de *H. pylori*, y se reportan buenos valores de sensibilidad y especificidad con su uso. La mayoría de los métodos basados en esta técnica tienen una sensibilidad de 100%; varios estudios sugieren que la PCR es tan válida como el cultivo para confirmar la erradicación del microorganismo y detectar las fallas de las terapias empleadas para erradicar esta bacteria.²⁹⁻³²

La PCR es un método rápido y aplicable a diferentes tipos de muestras. Su principal inconveniente lo constituye la presencia en la muestra de restos de tejido gástrico, lípidos u otros componentes que inhiben la reacción de la PCR y, por tanto, favorecen la obtención de falsos negativos. Al igual que en el cultivo y la histología, la sensibilidad de la PCR se ve afectada por la heterogénea colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*.³¹

Recientemente, se empleó un nuevo sistema para la identificación de *H. pylori*, que consiste en la combinación de la endoscopia de barrido y el método LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*). En este sistema se emplean cebadores para el gen *glmM* y se logra una sensibilidad y especificidad de 100%. Este procedimiento tiene la ventaja de no necesitar una muestra de biopsia gástrica; además, tiene menos requerimientos que la PCR estándar; sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar su eficiencia en el diagnóstico de *H. pylori*.^{33,34}

Hibridación «in situ». La infección puede ser diagnosticada mediante sondas de hibridación fluorescentes (FISH: *fluorescent in situ hybridization*) utilizadas en biopsia gástrica (*in situ*) que se unen al 16S RNAr de *H. pylori*. También se puede detectar la resistencia a claritromicina si estas sondas se unen al 23S RNAr. Esta técnica se puede realizar en aproximadamente tres horas.^{35,36}

Métodos no invasivos

El método ideal para diagnosticar la infección sería uno no invasivo, capaz de diferenciar una infección activa de una infección pasada. Los métodos desarrollados hasta ahora pueden tener utilidad en determinadas circunstancias, como la evaluación del seguimiento del tratamiento o estudios epidemiológicos.^{37,38} Dentro de los métodos invasivos están:

Prueba del aliento (urea breath test: UBT). Esta prueba se basa en la actividad de la ureasa de *H. pylori* con urea marcada. Es el resultado de la ingestión de una suspensión de urea marcada con C^{13} o C^{14} , donde se lleva a cabo la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre y es transportada a los pulmones; posteriormente, es exhalada a través del aliento.^{36,37} La cantidad de CO_2 marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *H. pylori*. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria, ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Esta prueba es útil como seguimiento del tratamiento llevado de cuatro a seis semanas después de finalizado.³⁹⁻⁴³

La prueba del aliento es un método cualitativo cuya sensibilidad y especificidad son muy altas, a diferencia de la prueba de la ureasa rápida, tanto en pacientes que no han sido tratados previamente como en aquellos que sí han recibido un tratamiento erradicador. Esta técnica es costosa y en su realización existen aspectos que pueden afectar el resultado, como son las variaciones en cuanto al punto de corte utilizado para la positividad, la ingestión previa de algunos alimentos y el intervalo para la toma de la muestra. Además, la presencia de atrofia gástrica puede favorecer la obtención de falsos negativos, por lo que en estos casos se ha demostrado la utilidad de realizar, además, pruebas serológicas para el diagnóstico de *H. pylori*.³⁹⁻⁴³

Serología. Las pruebas serológicas para el diagnóstico de *H. pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos de clase IgG o IgA contra antígenos específicos del microorganismo. La serología es útil en los estudios de poblaciones seleccionadas; sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo. *H. pylori* provoca una respuesta inmune, tanto local como sistémica. El sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo tran-

sitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG, por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico. La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA, puede tener especial interés en estudios sobre virulencia. Ya que la detección de anticuerpos depende del antígeno utilizado, considerando la heterogeneidad genética de *H. pylori*, algunos autores recomiendan el uso de mezclas de antígenos procedentes de varias cepas para mejorar la sensibilidad de estas técnicas, así como su valoración en cada medio. Se han utilizado varias clases de antígenos, que van desde antígenos parciales o altamente purificados como ejemplo la ureasa. La técnica más utilizada es EIA cuantitativa, que permite, además del diagnóstico primario, la monitorización del tratamiento. Los métodos basados en la técnica del Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos, como CagA y VacA.⁴⁴⁻⁴⁷

Prueba de sangre completa. Es un inmunoensayo indirecto realizado en fase sólida. Existen tiras comercializadas de fácil uso (Pyoriset®, AccuStat.) Se detectan anticuerpos IgG frente a *H. pylori* presentes en la sangre. En la misma consulta se puede obtener una gota de sangre del paciente. Se ha visto que al aumentar el tiempo de lectura de 10 minutos a seis horas aumenta la sensibilidad de la prueba. Esta prueba no se recomienda actualmente.^{44,45}

Detección de anticuerpos en orina. Cuando ocurre la infección por *H. pylori*, se eliminan anticuerpos de clase IgG en orina.⁴⁸ Basadas en este principio, se desarrollaron en Japón dos pruebas comerciales: un ELISA estándar, denominado Urinelisa (*Otsuka Diagnostic*), y uno basado en inmunocromatografía, denominado Rapirum (*Otsuka Diagnostic*). Estas pruebas se han empleado en diversos estudios y han demostrado tener buena sensibilidad, pero la especificidad ha sido muy variada y no siempre aceptable. La mayoría de estos trabajos se han realizado en países orientales, principalmente en Japón,⁴⁹ por lo que a pesar de ser la orina una muestra no invasiva promisoría, es necesario realizar más investigaciones para validar su posibilidad en el diagnóstico.

Detección de anticuerpos en saliva. Varios estudios han evaluado la saliva y la placa dental como posibles muestras no invasivas para el diagnóstico de *H. pylori* empleando diversas técnicas. Existen pruebas comerciales basadas en la detección de anticuerpos anti-*H. pylori* en saliva; sin embargo, los valores de sensibilidad y especificidad han sido inferiores al 90%.⁵⁰ Por otra parte, el cultivo de la bacteria a partir de la cavidad oral pocas veces ha sido positivo.⁵¹ Con la técnica de PCR se han reportado buenos resultados cuando se han empleado muestras

de saliva y placa dental.⁵² No obstante, dado el número de especies bacterianas que habitan en la cavidad oral, muchas de ellas no identificadas aún, no se consideran confiables los resultados que se obtienen al emplear un solo juego de cebadores en el diagnóstico por PCR.

Antígeno en heces. La detección de antígenos de *H. pylori* en heces fecales mediante técnicas inmunoenzimáticas se ha empleado para el diagnóstico inicial de la bacteria y para confirmar la erradicación de la misma después del tratamiento. La primera desarrollada comercialmente fue el Premier Platinum HpSATHM (*Meridian Diagnostics*), que contenía una mezcla de anticuerpos policlonales para el reconocimiento de los antígenos; aunque su sensibilidad era buena, la especificidad no era suficiente. Estas se sustituyeron por otras que contienen anticuerpos monoclonales, las cuales muestran muy buena especificidad. Esta técnica tiene la ventaja de no ser invasiva y, por tanto, es muy útil para el diagnóstico de la infección en individuos de cualquier edad, sobre todo en niños. Se ha descrito como válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección. Se trata de un ensayo cualitativo. La técnica proporciona información muy valiosa por la fácil obtención y la conservación de las muestras, se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología y no necesita la colaboración del paciente. Es muy útil para niños pequeños. Las pruebas comerciales basadas en la detección de antígenos en heces fecales se ven afectadas por varios factores, entre los que destaca la excreción de los antígenos muy diluidos o degradados cuando hay problemas de diarreas u obstrucciones intestinales, respectivamente; esto compromete la sensibilidad de estas pruebas.⁸ Otro aspecto que limita su uso extensivo son sus altos precios.⁵³⁻⁵⁷

Prueba de inmunocromatografía. Detecta a la enzima catalasa en su estado nativo en heces fecales; fue desarrollada y empleada en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en niños asintomáticos y personas de edad avanzada. Aunque con esta prueba se obtuvieron buenos resultados, es necesario realizar otros estudios para corroborar su eficacia en el diagnóstico.

Las técnicas serológicas son simples, reproducibles y económicas, pero además, son las únicas que permiten realizar estudios epidemiológicos y determinar la prevalencia y edad de adquisición de la infección por *H. pylori* en diferentes poblaciones. La limitación principal de la serología es su incapacidad para distinguir entre la infección activa y una infección previa con *H. pylori*, ya que los niveles de anticuerpos persisten alrededor de seis meses en sangre y esto puede determinar la obtención de falsos positivos. Por otra parte, dada la heterogeneidad de

las cepas que circulan en las diferentes zonas geográficas y las variaciones en las preparaciones antigénicas de los diferentes juegos serológicos comerciales, es necesario validar cada prueba comercial en la población particular donde se pretenda hacer extensivo su empleo.^{58,59}

Tratamiento de infecciones por *H. pylori*

Existen múltiples esquemas para tratar la infección por *H. pylori*; sin embargo, aún no se ha establecido un régimen óptimo. Su efectividad se ha visto reducida debido al surgimiento de cepas resistentes, así como a un mal seguimiento del tratamiento por el paciente. Anteriormente, se utilizaba una combinación de antibióticos, que incluía metronidazol, claritromicina, fluoroquinolonas, tetraciclinas y amoxicilina, entre algunos, para erradicar infecciones por *H. pylori*. Estos antibióticos, usados con frecuencia, incluían un inhibidor de la bomba de protones (IBP) o sales de bismuto. Estas combinaciones mostraron ser efectivas, con diferentes tasas de eficacia y tolerancia en la erradicación. Sin embargo, las terapias usadas han incrementado la rápida aparición de cepas resistentes de *H. pylori*, así como una adherencia pobre al tratamiento. Estos factores han reducido la eficacia del tratamiento a niveles menores de 80% en muchas áreas geográficas. Debido a esto se han desarrollado nuevas estrategias para reemplazar la terapia triple estándar. Estas se han utilizado en áreas con una alta resistencia a claritromicina.⁶⁰ La resistencia a amoxicilina y metronidazol ha permanecido estable; sin embargo, la resistencia a claritromicina ha ido en aumento, lo que constituye un factor de riesgo en el fracaso del tratamiento, por lo que no se recomienda como abordaje de primera línea. El levofloxacino, que se emplea con frecuencia en el tratamiento de segunda línea, es considerable; sin embargo, existen estudios realizados en diferentes países donde ya han aparecido cepas resistentes a este antibiótico. La resistencia a metronidazol es elevada y puede reducir la respuesta al tratamiento; sin embargo, puede superarse utilizando dosis y duración adecuadas.

Esquemas de tratamiento

La primera terapia usada para infecciones por *H. pylori* fue en jóvenes adultos menores de 45 años que presentaban dispepsia persistente, úlcera péptica, MALT en bajo grado y gastritis atrófica. Las estrategias en las pruebas y el tratamiento están basadas en la determinación y erradicación de *H. pylori* cuando es detectado. Es recomendable partir de una terapia de primera línea en dos grupos grandes, como en poblaciones con una baja y alta resistencia a

claritromicina. Para estos grupos se acepta una resistencia a claritromicina menor de 15 a 20%.^{61,62}

Terapia triple o estándar (en áreas con baja resistencia a claritromicina). Es la terapia más recomendada como primera línea e incluye un IBP y dos antibióticos, generalmente claritromicina y amoxicilina. El metronidazol puede reemplazar a la amoxicilina en casos de alergia a la penicilina. Las tasas de erradicación son de 70-85%. Sin embargo, en pacientes tratados recientemente o repetición con claritromicina o metronidazol, o cuando la resistencia a la claritromicina es alta (≥ 15 por ciento), la terapia cuádruple debe utilizarse como primera opción. La eficacia de este esquema ha disminuido últimamente debido a la creciente resistencia bacteriana; por ello, no se recomienda su empleo en poblaciones con tasas de resistencia a la claritromicina por encima de 15-20% y al metronidazol mayores de 40%.

La duración de la terapia es controversial según varios estudios; estos sugieren que 14 días proporcionan una tasa de erradicación de 5% mayor que la terapia por siete días. Explicaciones de por qué la claritromicina reduce la tasa de éxito en la terapia son la pobre adherencia al tratamiento por el paciente, la acidez gástrica, la densidad bacteriana, mutaciones bacterianas y la resistencia a la droga.⁶³⁻⁶⁵

Terapia cuádruple. Se recomienda como tratamiento de segunda línea en áreas que tienen una elevada resistencia a claritromicina. Esta consiste en un IBP junto con salicilato-bismuto, metronidazol y tetraciclina. Las tasas de erradicación oscilan entre 77-95%. El inconveniente de esta terapia es su complejidad (requiere tomas cada seis y 12 horas) y la frecuencia de efectos adversos asociados, así como una menor adherencia. Recientemente se ha aprobado el uso de Pylera (Axcán Scandipharm), cápsula que contiene 140 mg de subcitrate de bismuto, 125 mg de metronidazol y 125 mg de tetraciclina.

En general, para los pacientes en los que fracasa el tratamiento inicial con la terapia triple se recomienda la terapia cuádruple, utilizando una combinación diferente de antibióticos durante 14 días, tomando en cuenta recomendaciones como:

- I. La claritromicina no debe utilizarse a menos que el antibiograma confirme que la cepa infectante de *H. pylori* es susceptible a la claritromicina.
- II. Los antibióticos tomados previamente deben evitarse en general; la tetraciclina puede ser más eficaz en este contexto que el metronidazol.
- III. Se debe reforzar la adherencia al tratamiento.

Como pautas de la tercera línea se han propuesto combinaciones con diferentes antibióticos como le-

vofloxacino, rifabutina, moxifloxacino o furazolidona; estas combinaciones son para individuos en quienes han fracasado al menos dos antibióticos de primera línea.

- I. IBP + amoxicilina (o tinidazol) 1 g/12 h + levofloxacino (250-500 mg/24) durante 10-14 días. Con índices de radicación de 63 a 94%, con una excelente adherencia.
- II. BP + amoxicilina 1 g/12 h + rifabutina 150 mg/12 h durante 7-10 días (riesgo de mielotoxicidad).
- III. BP + furazolidona + levofloxacino durante 7-10 días.

Segundo intento con terapia cuádruple: IBP (debe darse al doble de la dosis estándar, dos veces al día), subcitrate de bismuto (120 mg cuatro veces al día o 240 mg dos veces al día), tetraciclina (de 250 mg tres veces al día a 500 mg cuatro veces al día) y metronidazol (de 250 mg tres veces al día a 500 mg cuatro veces al día) durante 10-14 días.⁶⁶⁻⁷⁰

La resistencia a levofloxacino por *H. pylori* es poco frecuente; sin embargo, se han reportado tasas de resistencia alrededor de 17% en varios países. La mayoría de las bacterias desarrollan resistencia rápidamente a las quinolonas cuando se usan de manera indiscriminada, por lo que se sugiere que estos esquemas deben utilizarse sólo en casos en que falle el tratamiento.

Los tratamientos con rifabutina tienen un costo elevado y elevada toxicidad a nivel medular y ocular.

La furazolidona ha sido evaluada como alternativa a claritromicina, metronidazol o amoxicilina en la terapia triple, con índices de erradicación que van de 50 a 90%. La furazolidona ha reemplazado al metronidazol en países en los que la resistencia a este antibiótico es alta.

La primera opción es la más recomendada por la Academia Americana de Gastroenterología; es la terapia cuádruple con bismuto por siete a 14 días. La mayoría de los autores recomiendan una duración de tratamiento de dos semanas.

La segunda opción es la terapia triple convencional, reemplazando los antibióticos usados durante la terapia inicial. La claritromicina no debería utilizarse en la terapia de segunda línea, a no ser que haya sido probada su sensibilidad previamente mediante cultivo y estudio genético.^{68,69}

Terapia: secuencial concomitante e híbrida

Debido a que la terapia triple ha disminuido su eficacia en el tratamiento de erradicación de infecciones por *H. pylori*, se han diseñado nuevos esquemas a través de varias modificaciones a la terapia cuádruple para erradicar

H. pylori, como las terapias concomitante, secuencial e híbrida.

Terapia secuencial. Es un modelo de terapia relativamente nuevo propuesto por un grupo de investigadores italianos que proponen administrar antimicrobianos durante 10 días de tratamiento. Los primeros cinco días se administra amoxicilina con un IBP y, en una segunda fase, se retira la amoxicilina y se añaden claritromicina y metronidazol durante cinco días más; el IBP se administra durante todo el tratamiento. Parece que la amoxicilina podría debilitar las paredes bacterianas en la fase inicial del tratamiento, lo cual aumentaría la eficacia de la claritromicina en la segunda fase. Esta pauta ha mostrado mayores índices de éxito que la triple terapia de siete a 10 días, pero no se ha mostrado mayor eficacia que con la terapia cuádruple ni con la terapia triple durante 14 días. En zonas en las que la resistencia a la claritromicina es alta > 15%, esta es sustituida por levofloxacino (250-500 mg dos veces al día).⁷⁰

Tratamiento de rescate (concomitante). Esta terapia fue propuesta para reducir la complejidad de la terapia secuencial, la cual involucra la administración simultánea de tres antibióticos y el IBP durante 10 días. Este tratamiento es usado en las regiones donde hay una alta resistencia a la claritromicina; está basado en la terapia cuádruple, pero sin el bismuto.

Terapia híbrida. Fue descrita por el grupo de Hsu y sus colaboradores; consiste de dos etapas: 1) el tratamiento se lleva a cabo durante siete días con IBP y amoxicilina (1 g/12 h), seguido por 2) IBP, amoxicilina (1 g/12 h), metronidazol (500 mg/12 h) y claritromicina (500 mg/12 h) por siete días.^{71,72} Sin embargo, es necesario realizar más estudios para entender la eficacia de estas terapias para erradicar *H. Pylori*, así como su costo.^{72,73}

Segundo intento con terapia cuádruple: IBP (debe darse al doble de la dosis estándar, dos veces al día), subcitrate de bismuto (120 mg cuatro veces al día o 240 mg dos veces al día), tetraciclina (de 250 mg tres veces al día a 500 mg cuatro veces al día) y metronidazol (de 250 mg tres veces al día a 500 mg cuatro veces al día) durante 10-14 días.^{70,74}

La resistencia a levofloxacino por *H. pylori* es poco frecuente; sin embargo, se han reportado tasas de resistencia de alrededor de 17% en varios países. La mayoría de las bacterias desarrollan resistencia rápidamente a las quinolonas cuando se usan de manera indiscriminada; por ello, se sugiere que estos esquemas se utilicen sólo en casos en que falla el tratamiento.

Los abordajes con rifabutina tienen un costo elevado y alta toxicidad a nivel medular y ocular.

La furazolidona se ha evaluado como una alternativa a la claritromicina, el metronidazol o la amoxicilina en la terapia triple, con índices de erradicación que van de 50 a 90%. La furazolidona ha reemplazado al metronidazol en países en los que la resistencia a este antibiótico es elevada.⁷⁵

Nuevas estrategias de tratamiento

Esquemas alternativos. Estudios realizados recientemente en Italia han evaluado un esquema triple secuencial usando tres antibióticos: un inhibidor de la bomba de protones + claritromicina (500 mg/2 veces al día) + tinidazol (500 mg/dos veces al día) durante 21 días.

Este esquema ha mostrado una erradicación mejor que la terapia triple, con 89 versus 77%, sobre todo cuando hay resistencia a la claritromicina.

Esta terapia es bien tolerada por niños, adultos y ancianos, con efectos adversos similares a los de la terapia triple convencional; además, el costo del esquema es similar o menor al de ésta. Esta terapia secuencial podría ser una nueva opción para el tratamiento de primera línea.

Uso de probióticos. Consiste en añadir lactoferrina bovina y probióticos (*Lactobacillus GC* y *Saccharomyces*) a los esquemas convencionales. Los probióticos disminuyen la inflamación cuando son introducidos al intestino inflamado.

Varios estudios publicados recientemente muestran que mejoran las tasas de erradicación por *H. pylori* cuando se añade lactoferrina bovina y probióticos a la terapia triple convencional. Este esquema aumenta la eficacia, ya que disminuye la aparición de los efectos adversos del tratamiento (parece ser que está relacionado con el restablecimiento de la flora intestinal alterada por los antibióticos).^{76,77}

Farmacogenética. Es una nueva estrategia para erradicar infecciones por *H. pylori*. A través de la farmacogenética se determina el tipo de citocromo P-450, familia 2, subfamilia C, polipéptido que el paciente posee. Este último determina el metabolismo de los inhibidores de la bomba de protones; estos se han clasificado como metabolizadores rápidos, intermedios o pobres, lo que permitirá ajustar la dosis y el esquema de administración de este medicamento en función del estado de cada individuo.

Vacunas

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* es difícil, ya que un buen porcentaje de la población general no presenta síntomas, además de que la terapia con anti-

bióticos no es muy efectiva. La inmunización contra *H. pylori* sería la estrategia más importante y eficaz para eliminar esta infección de la población mundial, así como la menos costosa. A pesar de los avances en este campo y los resultados encontrados en estudios con modelos animales, no se ha podido diseñar aún una vacuna eficaz para el humano. *H. pylori* posee un gran número de factores de virulencia, los cuales son reconocidos por el sistema inmune del hospedero. Muchos de estos factores han sido el blanco para diseñar vacunas contra este patógeno. Los factores que se han utilizado con éxito han sido las enzimas ureasa y catalasa, las proteínas CagA y VacA, proteínas de choque térmico (Hsp), adhesinas y lipoproteínas.

La limitación encontrada en el diseño de las vacunas es que se necesita un adyuvante para que el epítipo bacteriano usado induzca una respuesta inmune satisfactoria en el hospedero. En modelos animales se ha utilizado como adyuvante un derivado de la toxina del cólera (CTAI-DD), la toxina termolábil (TL) de *E. coli*. Sin embargo, su uso está limitado por el efecto dañino en humanos.

Otros adyuvantes utilizados como el hidróxido de aluminio, LTK63 y muramil dipéptido han mostrado ser seguros para el humano, pero no tienen eficacia aceptable. En años recientes, se ha usado el quitosán, un producto derivado de la desacetilación del *chitin*; oligonucleótidos no metilados a base de citosina-fosfato-guanosina con resultados aceptables. También, se han utilizado oligodesoxirribonucleótidos CpG como adyuvantes con el fin de evitar el efecto tóxico del derivado de la toxina colérica en humanos donde se ha observado una reducción en la carga bacteriana.⁷⁸⁻⁸⁴

Una limitación importante es la necesidad de utilizar modelos animales donde los resultados obtenidos se puedan extrapolar a los humanos.

Las vacunas desarrolladas se han administrado por diferentes vías, como la oral e intestinal, la nasal, rectal e intramuscular. Los estudios preliminares realizados sugirieron una mayor eficacia administrándolas por vía parenteral.

Vacunas nuevas. Actualmente se ha investigado en modelos animales y humanos con vacunas con vector vivo, vacunas tipo DNA, vacunas microesféricas y vacunas fantasma, con resultados alentadores.

Vacuna con vector vivo. El uso de técnicas de DNA recombinante logra que organismos vivos, usualmente virus y bacterias no patógenas para el ser humano, expresen moléculas antigénicas de organismos virulentos, en este caso, *H. pylori*. Estos vectores vivos posteriormente son inoculados en el hospedero para desarrollar una res-

puesta inmune efectiva que le confiere una inmunidad persistente contra la infección.

Se han realizado experimentos en modelos animales y humanos con *Salmonella typhimurium* y diferentes especies de adenovirus capaces de expresar la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*, y se han obtenido buenos resultados.

Vacunas tipo ADN. Estas vacunas son producidas mediante la inserción de segmentos de DNA que codifican una proteína antigénica de un organismo patógeno dentro de un plásmido bacteriano. Este plásmido es posteriormente inoculado en el huésped a inmunizar a través de microorganismos atenuados como la bacteria *Salmonella*, capaces de invadir las células del huésped.

Este tipo de vacunas tienen la ventaja de producir una respuesta inmune tanto humoral como celular, son relativamente estables, seguras y pueden conferir inmunidad a más de un organismo patógeno a través de la fabricación de vacunas polivalentes.

Ensayos en modelos animales han mostrado resultados óptimos con este tipo de vacunas contra *Helicobacter pylori*, pero aún se necesitan mayores estudios para determinar su eficacia y seguridad.

Vacunas microesféricas. Esta técnica hace uso de micropartículas de material biodegradable y biocompatible como adyuvantes de la vacuna. Es capaz de estimular la inmunidad celular y humoral, y tendría como principales ventajas su administración a través de mucosas, ser de liberación prolongada (por lo que no existe la necesidad de refuerzos) y bastantes seguras. Estudios preliminares en modelos animales muestran resultados aún controversiales en el caso de la inmunización contra *Helicobacter pylori*.

Vacunas fantasma. Esta novedosa técnica hace uso de bacterias Gram negativas muertas (bacterias fantasma) que conservan su pared celular pero carecen de contenido citoplasmático. Estas bacterias fantasma son producidas en el laboratorio mediante una proteína (proteína E Phix174) aislada de un virus bacteriófago capaz de mediar la lisis citoplasmática de bacterias Gram negativas, conservando intacta la morfología antigénica de su pared celular.

Se han logrado crear bacterias fantasma de *H. pylori* capaces de generar inmunidad efectiva contra esta infección en modelos animales. Las ventajas de esta técnica son su seguridad, la no necesidad de mantener la cadena de frío y su versatilidad para combinarse con otras vacunas.⁷⁸⁻⁸⁴

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existen varios métodos disponibles que pueden ser útiles en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, aunque

tienen diferencias en su sensibilidad y especificidad. El estudio de *Helicobacter* planteado por el *European Helicobacter Study Group* propuso adoptar como estándar de oro por lo menos dos pruebas diferentes positivas. La selección de la prueba diagnóstica debe considerar varios aspectos como la sensibilidad, la especificidad, la clínica, la disponibilidad y los costos de la prueba. Varias pruebas de ureasa están disponibles comercialmente, incluyendo pruebas basadas en gel (*gel-based tests*: CLOtest, Hp-Fast), papel (*paper-based tests*: PyloriTek, ProntoDryHpOne) y en fase líquida (*liquid-based tests*: CPtest, EndoschHp).

La mayor parte de las PRU comercialmente disponibles indican una sensibilidad y especificidad entre 79 y 100% y de 92 a 100%, respectivamente. La sensibilidad y especificidad del examen histológico en el diagnóstico de *H. pylori* varía entre 53 y 90%, dependiendo de la práctica clínica, la densidad de la colonización y la experiencia del histopatólogo. En general, un diagnóstico histológico puede ser hecho en alrededor de 90% de los casos con un promedio de dos a tres días, pero este se incrementa cuando se toman múltiples biopsias, lo cual aumenta los precios por el procesamiento de las biopsias y, sobre todo, en el monto final del diagnóstico. Un tratamiento previo reduce el número de *H. pylori* y afecta en forma negativa la sensibilidad.

En la actualidad se dispone de varias técnicas moleculares para detectar *H. pylori* que ofrecen excelentes posibilidades en el diagnóstico. La PCR ha sido extensamente utilizada para el diagnóstico de *H. pylori* en biopsia gástrica, saliva, heces fecales y otros especímenes que no sólo permiten detectar la bacteria sino también los factores de virulencia y de los genes involucrados en la resistencia a los antibióticos. Debido a la elevada tasa de resultados falsos negativos y a las dificultades relacionadas al cultivo de *H. pylori*, este no se recomienda como método de referencia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en la práctica clínica; el cultivo seguirá siendo una herramienta útil para estudiar virulencia y resistencia a los antimicrobianos.

La combinación de resultados positivos de EH y PRU es una excelente opción cuando clínicamente se requiere la endoscopia; ello permite establecer el verdadero estatus de la infección y las alteraciones histopatológicas en los pacientes con síntomas dispépticos, y aunque estas dos pruebas son invasivas, pueden realizarse durante el procedimiento endoscópico sin que se altere en mayor grado el tiempo de la intervención ni se aumente su morbilidad, y los costos siguen siendo razonablemente más bajos que los de las otras pruebas empleadas.⁷⁶⁻⁸⁰

REFERENCIAS

1. Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015; 20: 1-7.
2. Calvet X, Ramirez-Lázaro MJ, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2013; 18: 5-11.
3. Cervantes-García E. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Rev Fac Med, UNAM*. 2006; 49: 163-168.
4. Morgan DR, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, eds. *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management*. Chap 51. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016.
5. Lee HC, Huang TC, Lin CL, Chen KY, Wang CK, Wu DC. Performance of routine *Helicobacter pylori* invasive tests in patients with dyspepsia. *Gastroenterol Res Pract*. 2013; 2013: 184806.
6. Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter*. 2007; 12: 6-11.
7. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21: 299-313.
8. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 12847-12859.
9. Laine L, Lewin DN, Naritoku W, Cohen H. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc*. 1997; 45: 463-467.
10. Fallone CA, Loo VG, Lough J, Barkun AN. Hematoxylin and eosin staining of gastric tissue for the detection of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1997; 2: 32-35.
11. El-Zimaity HM, Segura AM, Genta RM, Graham DY. Histologic assessment of *Helicobacter pylori* status after therapy: comparison of Giemsa, Diff-Quik, and Genta stains. *Mod Pathol*. 1998; 11: 288-291.
12. Eshun JK, Black DD, Casteel HB, Horn H, Beavers-May T, Jetton CA et al. Comparison of immunohistochemistry and silver stain for the diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection in urease-negative gastric biopsies. *Pediatr Dev Pathol*. 2001; 4: 82-88.
13. Rüssmann H, Kempf VA, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 304-308.
14. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. *Gut*. 2000; 46: 608-614.
15. Samarbaf-Zadeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM, Sadeghi-Zadeh M, Azmi M, Hashemi J et al. Application of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Med Sci Monit*. 2007; 12: CR426-430.
16. Windsor HM, Abioye-Kuteyi EA, Marshall BJ. Methodology and transport medium for collection of *Helicobacter pylori* on a string test in remote locations. *Helicobacter*. 2005; 10: 630-634.
17. Fresnadillo-Martínez MJ, Rodríguez-Rincón M, Blázquez de Castro AM, García-Sánchez E, García-Sánchez JE, Trujillano-Martín I et al. Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Helicobacter*. 1997; 2 (1): 36-39.
18. Withmire JM, Merrell DS. Successful culture techniques of *Helicobacter* species: general culture techniques for *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol*. 2012; 921: 17-27.
19. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003; 36: 616-622.

20. Perez-Perez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000; 29: 879-884.
21. Uotani T, Graham DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using rapid urease test. *Ann Transl Med*. 2015; 3: 9.
22. Moon SW, Kim TH, Kim HS, Ju JH, Ahn YJ, Jang HJ et al. United rapid urease test is superior than separate test in detecting *Helicobacter pylori* at the gastric antrum and body specimens. *Clin Endosc*. 2012; 45 (4): 392-396.
23. Tseng CA, Wang WM, Wu DC. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci*. 2005; 50: 449-452.
24. Lewis JD, Kroser J, Bevan J, Furth EE, Metz DC. Urease based tests for *Helicobacter pylori* gastritis. Accurate for diagnosis but poor correlation with disease severity. *J Clin Gastroenterol*. 1997; 25 (2): 415-420.
25. Van Keeken N, Van Hattum E, de Boer WA. Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies. *Neth J Med*. 2006; 64 (9): 329-333.
26. Kumala W. Evaluation of the motility indole urease (MIU) test to detect *Helicobacter pylori* infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37 (5): 966-969.
27. Siddique I, Al-Mekhaizeem K, Alateeqi N, Memon A, Hasan F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: improving the sensitivity of CLOtest by increasing the number of gastric antral biopsies. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42 (4): 356-360.
28. Paniagua GL, Monroy E, Rodriguez R, Arroniz R, Rodríguez C, Cortés JL et al. Frequency of VacA, CagA, and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009; 8: 14.
29. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M et al. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori* infected with gastritis. *Microb Pathog*. 2015; 80: 67-72.
30. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol*. 2013; 943: 279-287.
31. Duš I, Dobosz T, Manzin A, Loi G, Serra C, Radwan-Oczko M. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research —new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013; 67: 261-268.
32. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut*. 2002; 50: 285-289.
33. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T et al. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification methods a novel rapid, and safe system for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (11): 4032-4037.
34. Yari F, Abiri R, Aryan E, Ahmandi-Jouyhari T, Navadi J, Alvandi A5. Loop mediated isothermal amplification as a fast noninvasive method of *Helicobacter pylori*. *J Clin Lab Annal*. 2016; 30 (5): 464-470. doi:10.1002/jcla.21880.
35. Samarabaf-Zandeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM, Sadeghi Z. Application of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Med Sci Monit*. 2006; 12: CR426-430.
36. Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D, Rasell B, Dondi E et al. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from children gastric antrum and fundus as assessed by fluorescent *in situ* hybridization and culture on four sector agar plates. *Helicobacter*. 2008; 13: 557-563.
37. Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergery B, Barberis C, Talby P et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96: 353-358.
38. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 4819423.
39. Uндler GK, Ozgur GT, Gokturk HS, Durukan E, Erhamamnci S. Does the urea breath test predict eradication of *Helicobacter pylori* infection? *Acta Gastroenterol Belg*. 2016; 79: 3-7.
40. Niv Y, Hazazi R. *Helicobacter pylori* recurrence in developed and developing countries: meta-analysis of 13C-urea breath test follow-up after eradication. *Helicobacter*. 2008; 13: 56-61.
41. Peura DA, Pambianco DJ, Dye KR, Lind C, Frierson HF, Hoffman SR et al. Microdose 14C-urea breath test offers diagnosis of *Helicobacter pylori* in 10 minutes. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91: 233-238.
42. Masucci L, Blackhouse G, Goeree R. Cost-effectiveness of the carbon-13 urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori*: an economic analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2013; 13: 1-28.
43. Gisbert JP, Pajares JM. 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection —a critical review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20: 1001-1017.
44. Burucoa C, Delchier JC, Courillon-Mallet A, de Korwin JD, Mégraud F, Zerbif F et al. Comparative evaluation of 29 commercial *Helicobacter pylori* serological kits. *Helicobacter*. 2013; 18: 169-179.
45. Mégraud F. The most important diagnostic modalities for *Helicobacter pylori*, now and in the future. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 9: S13-S15.
46. Harris P, Perez-Perez G, Zylberberg A, Rollán A, Serrano C, Riera F et al. Relevance of adjusted cut-off values in commercial serological immunoassays for *Helicobacter pylori* infection in children. *Dig Dis Sci*. 2005; 50: 2103-2109.
47. Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *J Gastroenterol*. 1996; 31: 33-36.
48. Kato S, Tachikawa T, Ozawa K, Konno M, Okuda M, Fujisawa T et al. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics*. 2001; 107: E87.
49. Hu HM, Kuo CH, Lo YC, Wu MT, Wu IC, Lu CY et al. Evaluation of the two immunochromatographic methods for detecting urine and serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* and comparison of accuracy and clinical utility. *Hepatogastroenterology*. 2007; 54: 119-123.
50. Ballam LD, Mendall MA, Asante M, Morris J, Stranahan DP, Whincup PH et al. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*. 2000; 53: 314-317.
51. Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*. 1999; 282: 2240-2245.
52. Kignel S, de Almeida PF, André EA, Alves MM, Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Dis*. 2005; 11: 17-21.
53. McNulty CA, Whiting JW. Patients' attitudes to *Helicobacter pylori* breath and stool antigen tests compared to blood serology. *J Infect*. 2007; 55: 19-22.
54. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter*. 2004; 9: 347-368.
55. Cullen KP, Broderick BM, Jayaram J, Flynn B, O'Connor HJ. Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) test in routine clinical practice —Is it patient-friendly? *Ir Med J*. 2002; 95: 305-306.
56. Veijola L, Oksanen A, Löfgren T, Sipponen P, Karvonen AL, Rautelin H. Comparison of three stool antigen tests in confirming *Helicobacter pylori* eradication in adults. *Scand J Gastroenterol*. 2005; 40: 395-401.
57. Pourakbari B, Mirsalehian A, Maleknejad P, Mamishi S, Azhdarkosh H, Daryani NE et al. Evaluation of a new antigen for diagnosis of

- Helicobacter pylori* infection in stool of adult and children. *Helicobacter*. 2011; 16: 42-46.
58. Choi J, Kim CH, Kim D, Chung SJ, Song JH, Kang JM et al. Prospective evaluation of a new stool antigen test for the detection of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, rapid urease test, (13)C-urea breath test, and serology. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26: 1053-1059.
 59. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 12847-12859.
 60. Ernis F, Senocak Tasci E. Current *Helicobacter pylori* treatment in 2014. *World J Methodol*. 2015; 5: 101-107.
 61. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 2012; 61: 646-664.
 62. Papastergiou V, Georgopoulos SD, Karatapanis S. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014; 5: 392-399.
 63. Lee JY, Kim N, Kim MS, Choi YJ, Lee JW, Yoon H et al. Factors affecting first-line triple therapy of *Helicobacter pylori* including CYP2C19 genotype and antibiotic resistance. *Dig Dis Sci*. 2014; 59: 1235-1243.
 64. Furuta T, Sugimoto M, Shirai N, Matsushita F, Nakajima H, Kumagai J et al. Effect of MDR1 C3435T polymorphism on cure rates of *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with lansoprazole, amoxicillin and clarithromycin in relation to CYP2C19 genotypes and 23S rRNA genotypes of *H. pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26: 693-703.
 65. Urgesi R, Cianci R, Riccioni ME. Update on triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*: current status of the art. *Clin Exp Gastroenterol*. 2012; 5: 151-157.
 66. Bosques-Padilla FJ. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 1438-1449.
 67. Malfertheiner P, Selgrad M. *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014; 30: 589-595.
 68. Liang X, Xu X, Zheng Q, Zhang W, Sun Q, Liu W et al. Efficacy of bismuth-containing quadruple therapies for clarithromycin-, metronidazole-, and fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* infections in a prospective study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11: 802-807.
 69. Venerito M, Krieger T, Ecker T, Leandro G, Malfertheiner P. Meta-analysis of bismuth quadruple therapy versus clarithromycin triple therapy for empiric primary treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion*. 2013; 88: 33-45.
 70. Molina IJ, Romano M, Fernandez BM, Federico A, Gravina AG, Pozzati L et al. Optimized non-bismuth quadruple therapies cure most patients with *Helicobacter pylori* infection in populations with high rates of antibiotic resistance. *Gastroenterology*. 2013; 145:121-128.
 71. Yuan Y, Ford AC, Khan KJ, Gisbert JP, Forman D, Leontiadis GI et al. Optimum duration of regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 12: CD008337.
 72. Zullo A, Scaccianoce G, De Francesco V, Ruggiero V, D'Ambrosio P, Castorani L et al. Concomitant, sequential, and hybrid therapy for *H. pylori* eradication: a pilot study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013; 37: 647-650.
 73. McNicholl AG, Marin AC, Molina-Infante J, Castro M, Barrio J, Ducons J et al. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for *Helicobacter pylori* eradication in routine clinical practice. *Gut*. 2014; 63: 244-249.
 74. De Francesco V, Hassan C, Ridola L, Giorgio F, Ierardi E, Zullo A. Sequential, concomitant and hybrid first-line therapies for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized study. *J Med Microbiol*. 2014; 63:748-752.
 75. 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.
 76. Zheng X, Lyu L, Mei Z. Lactobacillus-containing probiotic supplementation increases *Helicobacter pylori* eradication rate—evidence from a meta-analysis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013; 105: 445-453.
 77. Song MJ, Park DI, Park JH, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI et al. The effect of probiotics and mucoprotective agent on PPI-based triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2010; 15: 206-213.
 78. D'Elis MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2014; 1: 19-26.
 79. Milani M, Sharifi Y, Rahmati-Yamchi M, Somi MH, Akbarzadeh A. Immunology and vaccines and nanovaccines for *Helicobacter pylori*. *Exper Rev Vaccines*. 2015; 14: 833-840.
 80. Zhou Z, Gong S, Li-XM, Yang Y, Guan R, Zhou S et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol*. 2015; 64: 104-110.
 81. Walduck A, Andersen LP, Raghavan S. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015; 1: 17-25.
 82. Zhang S, Moise L, Moss SF. *Helicobacter pylori* vaccines: why we still don't have any. *Human Vaccine*. 2011; 7: 1153-1157.
 83. Wang B, Pan X, Wang H, Zhou J, Yang J, Li W. Immunological response of recombinant *H. pylori* multi-epitope vaccine with different vaccination strategies. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 6559-6566.
 84. Anderl F, Gerhard M. *Helicobacter pylori* vaccination is a path to protection. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 11939-11949.