

Rev Biomed 2000; 11:187-205.

Helicobacter pylori: Factores de virulencia, patología y diagnóstico.

Revisión

Francisco Rivas-Traverso¹, Francisco Hernández^{1,2}.

¹Facultad de Microbiología, ²Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

RESUMEN.

En este artículo revisamos la evidencia concerniente a los factores de virulencia de *Helicobacter pylori*, la principal causa de gastritis, úlceras pépticas y algunos tipos de neoplasias. También se hace un resumen de los hallazgos acerca de los posibles modos de transmisión, incluyendo las siguientes rutas: oral-oral, gastro-oral y fecal-oral. La principal evidencia para cada una de esas rutas consisten el aislamiento e identificación del DNA de *H pylori* en saliva, placa dental, heces y en el agua. También se describen algunos factores de virulencia tales como a) la actividad de ureasa que promueve la liberación de amonía la cual puede inducir daño en el epitelio gástrico; b) adhesinas bacterianas que son fundamentales para el proceso de colonización; c) hemaglutininas las cuales inducen auto-anticuerpos debido a su similaridad bioquímica con antígenos presentes en los grupos sanguíneos; d) presencia del gen asociado a la vacuolización (*vacA*) y del gen asociado a la cito-

toxicidad (*cagA*) que correlaciona con cepas virulentas que exhiben actividad de citotóxica.

El perfil de la distribución epidemiológica a nivel mundial de *H. pylori* está correlacionado con la distribución del cáncer gástrico.

También describimos en este artículo la metodología para la diagnosis de *H. pylori* mediante el cultivo, incluyendo un método económico que genera la atmósfera microaerofílica requerida, un método de ureasa rápido y de bajo costo, así como la visualización de bacterias curvas en frotis de biopsias gástricas. (*Rev Biomed 2000; 11:187-205*)

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico, enfermedad ácido péptica, ureasa, adhesinas bacterianas, hemaglutininas, gen *vacA*, gen *cagA*.

SUMMARY.

***Helicobacter pylori*: virulence factors and their relationship with the gastroduodenal pathology.**

Solicitud de sobretiros: Dr. Francisco Hernández. Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", San José, Costa Rica.

Recibido el 24/Mayo/1999. Aceptado para publicación el 10/Nov./1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001136.pdf>

Vol. 11/No. 3/Julio-Septiembre, 2000

F Rivas-Traverso, F Hernández.

In this paper we review evidence concerning virulence factors of *Helicobacter pylori*, the major cause of gastritis, peptic ulcers and some kinds of gastric neoplasia. We also summarize the findings about possible modes of transmission, including the following routes: oral-oral, gastric-oral, and fecal-oral. The main evidence for each of those routes is bacterial isolation and identification of DNA from saliva, dental plaque, faeces, and water. Also, virulence factors are described, such as: a) urease activity which promotes the liberation of ammonia that could induce damage on the gastric epithelia; b) bacterial adhesins that are fundamental to the colonization process; c) haemagglutinins that could induce auto-antibodies due to their biochemical similarity with some antigens of blood groups; d) presence of *vacuolization associated gene* (*vacA*) and *cytotoxin-associated gene* (*cagA*) that correlates with highly virulent strains exhibiting toxin activity. The worldwide epidemiological profile of *H. pylori* correlates with the distribution of gastric cancer. We also describe the methodology for the diagnosis of *H. pylori* by culture, including an economic method, which generates the required microaerophilic atmosphere, a low cost rapid urease method as well as the microscopic visualization of curved bacteria from gastric biopsy tissues.

(*Rev Biomed 2000; 11:187-205*)

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric cancer, acid peptic disease, urease, bacterial adhesins, haemagglutinins, *vacA* gen, *cagA* gen.

INTRODUCCIÓN.

Helicobacter pylori es la bacteria descrita más recientemente que ha causado mayor revuelo a nivel mundial en medicina, pues se considera que afecta a más del 50% de la población del globo, con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo que en los desarrollados. Su importancia ha sido tal, que a menos de dos décadas de su

descubrimiento ya se conoce la secuencia de su genoma (1), se ha descrito una pléyade de factores de virulencia y se acepta su participación en la causalidad de las gastritis, úlceras pépticas e incluso se asocia con algunos tipos de cáncer gástrico.

LA HISTORIA DE *HELICOBACTER*.

El descubrimiento de *Helicobacter* representa un moderno ejemplo de serendipia, pues luego de infortunados intentos de aislamiento, el olvido de unos platos de cultivo en la incubadora durante las vacaciones de Semana Santa, llevaron a su aislamiento (2, 3). Aunque originalmente se describió como un organismo similar a *Campylobacter* y luego como *Campylobacter pyloridis*; nombre de la especie que no se ajustó a las normas de nomenclatura, lo que fue enmendado como *Campylobacter pylori*. No obstante, las diferencias morfológicas de la nueva especie con las preexistentes, su patrón de ácidos grasos y diferencias genéticas, ponía en duda su inclusión en el género *Campylobacter*, lo que llevó a la propuesta del nuevo género *Helicobacter* (4) y ello motivó la redescipción del género *Campylobacter* (5). Esto condujo a la reubicación de dos especies anteriormente incluidas en el género *Campylobacter*, cuya nueva ubicación es *H. cinaedi* y *H. fennelliae* (5). Actualmente el género *Helicobacter* alberga a más de 15 especies, la mayoría aisladas a partir de mucosa gástrica de diferentes mamíferos; sin embargo, las especies descritas más recientemente se han aislado de vías hepáticas e intestinales de diversos animales. También esta definición taxonómica permitió la creación de otro nuevo género: *Arcobacter*, que alojó a dos especies anteriormente denominadas como *Campylobacter* atípicos, hoy conocidos como *A. nitrofigilis* y *A. crioaerophilicus*, que junto con *A. skirrowii* y *A. butzleri* conforman el nuevo género (6). Morfológicamente los miembros de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* son similares, ambos presentan extremos puntiagudos con un flagelo desnudo en cada extremo; en el caso de *Campylobacter* el flagelo nace de una

Factores patogénicos y diagnóstico de H. pylori.

Figura 1.- Micrografía electrónica de transmisión, *Campylobacter jejuni* aislado de heces de un niño con diarrea. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Se aprecia la forma curva de la bacteria exhibiendo un flagelo desnudo en cada extremo, los cuales salen de una concavidad a manera de poro. El cuerpo de la bacteria aparece rodeado por una delicada microcápsula (MET, Hitachi H-300).

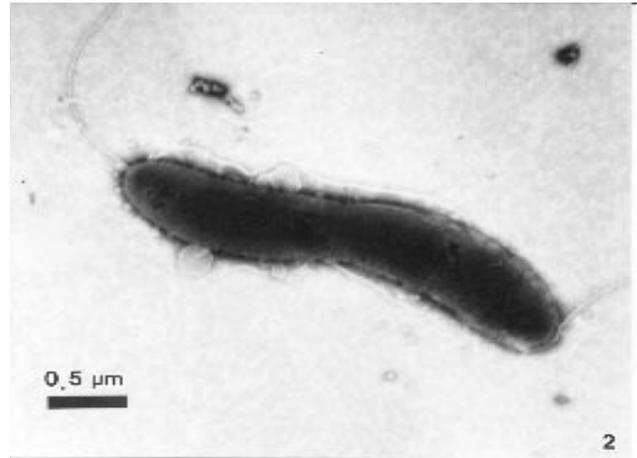


Figura 2.- Micrografía electrónica de transmisión. *Arcobacter butzlerii*, aislado de la cloaca de un pollo. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Se observa la forma curva de la bacteria con los extremos romos, de cada uno de los cuales sale un flagelo desnudo.

concauidad (fig. 1) y en *Arcobacter* los extremos son más redondeados (fig. 2). En tanto, *Helicobacter* presenta extremos romos y en uno de ellos exhibe un mechón de 3 a 8 flagelos envainados, como se muestra en la figura 3 (7).

Los primeros años de la historia de *Helicobacter* estuvieron matizados de controversias, pues unos investigadores le atribuían un papel protagónico en la patología gastroduodenal, mientras otros asumían que sólo se trataba de un saprófito. El acúmulo de pruebas incriminatorias favorecería a los primeros; una de esas pruebas fue la asociación estadística entre la presencia de *H. pylori* y patología como gastritis antral de tipo B o úlceras pépticas, ya fuesen gástricas o duodenales. Esa relación estadística arrojaba resultados altamente significativos y cuya confirmación se repetía en distintos países (8-10), incluyendo Costa Rica (11,12). También, la respuesta efectiva del tratamiento antimicrobiano ante esas patologías, respaldaba su papel etiológico, pues la erradicación del microorganismo resulta en una remisión de los síntomas (13) y su reaparición se asocia con el recrudecimiento de la sintomatología

(14). Otros factores importantes, fueron los resultados de infecciones experimentales en animales, que confirmaron clínica e histológicamente la localización de la bacteria en la vecindad de las zonas afectadas (15). Finalmente, la demostración parcial de los postulados de Koch por Marshall (16) y por Morris (17), confirmaron el potencial

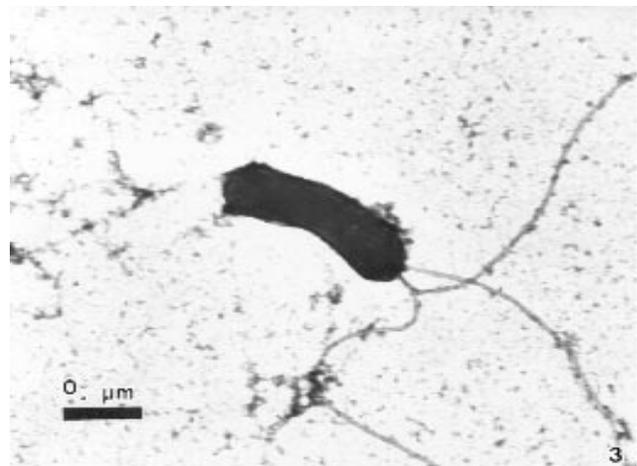


Figura 3.- Micrografía electrónica de transmisión. *Helicobacter pylori* aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico, mostrando una bacteria curva, con extremos romos y en uno de los cuales se observan tres flagelos, que aparecen más gruesos que los de las figuras 1 y 2, ya que están envainados.

patogénico de *H. pylori*. Las evidencias aportadas llevaron a una conferencia de consenso del Instituto Nacional de Salud, ("NIH", por sus siglas en inglés) en la cual se recomendó la prescripción de antibióticos a todos los pacientes con úlceras asociadas con *Helicobacter pylori* o sea que se trataran como cuadros infecciosos (18).

TRANSMISIÓN.

Se ha postulado que la infección con *Helicobacter* se adquiere temprano en la vida. Además, esta infección que afecta a más de la mitad de la población mundial, se presenta con mayor prevalencia en países en desarrollo que en países industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población, lo que incluso se refleja en la prevalencia de la infección descrita en población no blanca en los Estados Unidos (19-21).

Tal patrón de infección se asocia con mecanismos de transmisión directa o indirectamente relacionados con la higiene ambiental. Lo que también ha permitido explicar la alta prevalencia encontrada en individuos mayores de 50 años de países industrializados (22), lo cual se explica por un efecto de cohorte. Según estos criterios, es posible que esos individuos de países desarrollados vivieron una niñez en ambientes con condiciones higiénicas como las que hoy prevalecen en muchos países en vías de desarrollo (23). Tal patrón epidemiológico hace suponer que la vía de infección es común y muy efectiva. En tal sentido se han propuesto por lo menos tres opciones: transmisión oro-oral, gastro-oral y feco-oral (22,24).

Transmisión oro-oral. La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de *Helicobacter* en placa dental (25), en saliva (26) o bien la identificación de su genoma en saliva (27,28); también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva (29); pero otras bacterias de la flora oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada (30,31).

El escollo más importante para esta posibilidad es el pobre acervo bibliográfico relacionado

con el cultivo de la bacteria a partir de muestras orales (32).

Transmisión oro-gástrica. Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios (33,34). Tal posibilidad llevaría también a relacionarle con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños, ya que estos vomitan más frecuentemente que los adultos, además de que frecuentemente se llevan objetos a la boca (32).

Transmisión feco-oral. Esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda un cierto paralelismo con las tasas de enfermedades diarreicas en esos mismos países (35). A pesar de que hay informes esporádicos sobre el aislamiento de la bacteria a partir de heces (40,41), e incluso se ha descrito el método para tal aislamiento (38), esos hallazgos no son sistemáticos, lo que representa un escollo para la verificación de esta hipótesis. La dificultad de aislar *Helicobacter* a partir de heces se relaciona con su alta susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos empleados en medios de cultivo selectivos.

Por otra parte, los métodos de PCR han permitido su identificación en heces (39-41); no obstante, estas técnicas han enfrentado limitaciones debido a metabolitos como polisacáridos ácidos que han llevado a resultados erráticos (42). Sin embargo, la identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo (43) como en países industrializados (44), apoya la transmisión fecal de este agente.

La diseminación de la bacteria con las heces de los pacientes infectados lleva a la posibilidad de que las moscas puedan actuar como vectores mecánicos de la infección. En tal sentido se ha documentado la sobrevivencia de la bacteria en moscas domésticas infestadas experimentalmente, alimentándolas con cultivos de *Helicobacter pylori* (22, 24, 32) e incluso se ha hallado el genoma de la bacteria en moscas infectadas naturalmente (45).

Sin embargo, otros autores ponen en tela de duda tal posibilidad, pues no se ha logrado infectar a las moscas a partir de heces contaminadas con *Helicobacter* (46). Además, el hallazgo de *H. pylori* en gatos domésticos plantea otra posible vía de diseminación, que podría afectar principalmente a niños que juegan con las mascotas (47).

FACTORES DE VIRULENCIA.

La búsqueda de los factores causantes de ulceración se ha intensificado en los últimos años, señalándose entre ellos a la ureasa bacteriana, adhesinas, hemaglutininas y la producción de una toxina vacuolizante.

Ureasa.

El jugo gástrico normal posee un $\text{pH} < 4$, el cual le confiere un carácter bactericida y por tanto capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos, por ello epidemiológicamente se hace referencia al estómago como la "barrera ácida". Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, implica la capacidad de esta bacteria para sobrevivir en ese ambiente ácido. Cuando se descubrió esta bacteria su localización gástrica presumía un comportamiento acidófilo; pero la confirmación de que el pH óptimo para su cultivo era cercano a la neutralidad, se transformaba en uno de los escollos importantes que se enfrentó al principio de la historia de *H. pylori*, pues a parte de aceptar que una bacteria tendría como nicho esa barrera ácida, no había una explicación para tal resistencia al pH ácido.

La clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa (48). Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas. El efecto neto de esas reacciones es un aumento del pH. También explica el hecho de la asociación de la bacteria con los espacios

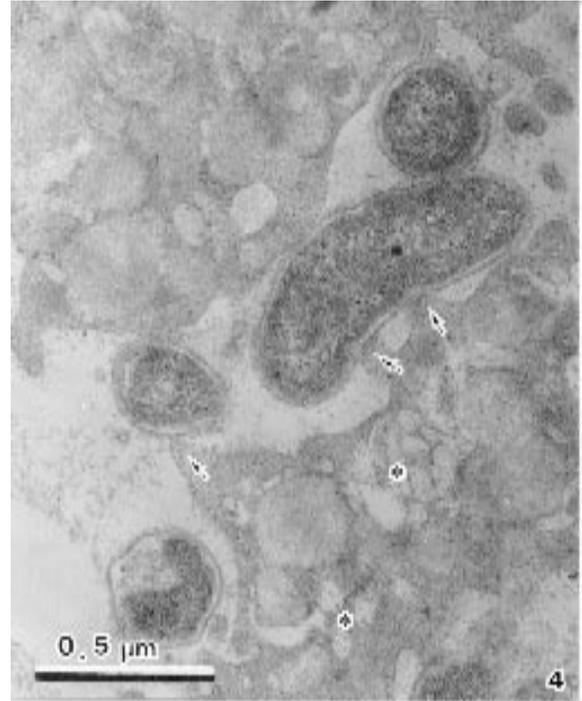


Figura 4.- Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica. Se aprecian 4 bacterias, 3 de ellas localizadas en un espacio intercelular distendido. Entre la bacteria cortada longitudinalmente y la célula epitelial aparecen dos estructuras en pedestal (flechas). Los asteriscos indican zonas vacuolizadas de la célula epitelial, lo que indica el efecto toxigénico de la bacteria *in vivo*.

intercelulares del epitelio gástrico, por los cuales se excreta urea (fig. 4). La ureasa es la enzima más estudiada de todos los productos de *H. pylori*, y representa alrededor de un 5% del total de sus proteínas celulares (49). Se localiza en el citosol de la bacteria y en su superficie, aunque esta última localización puede tratarse de un mecanismo no específico para la exportación de la enzima; posee un peso molecular de 600 kDa y está codificada por siete genes denominados *ureA* a *ureG* (50). Los dos primeros *ureA* y *ureB* codifican las subunidades de 26.5 kDa y 60.3 kDa, respectivamente. Luego *ureC*, *ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG* son considerados genes accesorios, localizados en el cromosoma (51-53) y son homólogos a los genes que codifican la ureasa de *Proteus mirabilis* (54), *Klebsiella aerogenes* (55), *Yersinia enterocolitica* (56-58) y *Bacillus spp* termofílicos (59).

La enzima también provee nitrógeno para la síntesis proteica; este papel metabólico se sustenta en experimentos cultivando la bacteria en medios con urea con nitrógeno marcado, el cual luego se ha encontrado en las proteínas de la bacteria. El descubrimiento reciente del gen de la glutamina sintetasa *glnA*, sirve de base para sustentar este papel, ya que la única ruta por la cual el amonio puede ser incorporado en aminoácidos y proteínas es mediante el glutamato, para producir glutamina en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa (50).

Por otra parte, el hidróxido de amonio generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con esta infección; aunque debe enfatizarse que directamente el amonio no es tóxico, si no que el daño infringido es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua. Éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente, para ganar los espacios intercelulares. Pero, en esta capa de moco funciona uno de los mecanismos que protegen la mucosa del propio ácido, lo cual se conoce como el gradiente de bicarbonato; por lo tanto, al licuarse el moco se pierde parte de esa protección, lo que colabora en la génesis de la gastritis, máxime que las células G de la mucosa estarán detectando un pH neutro que promoverá la liberación de gastrina para estimular la producción de ácido. En última instancia, el paciente presenta hipergastrinemia e hiperacidez gástrica, lo que agrava la lesión inicial. Otro ejemplo de esa acción patogénica del amonio se muestra en cultivos celulares, cuya acción es inversamente proporcional a la concentración de amonio generado por la hidrólisis de urea, lo que se ha demostrado con células derivadas de carcinomas humanos y con células Vero (60).

La actividad de la urea también puede ser responsable indirectamente del daño tisular mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos. Ello se ha demostrado experimentalmente con células

intactas de *H. pylori*, las cuales son capaces de cebar e inclusive causar una activación directa del estallido respiratorio de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), monocitos y además, ejerce acción quimiotáctica sobre otras células inflamatorias mediante liberación de citocinas proinflamatorias e intermediarios del oxígeno reactivo que colaboran con el proceso inflamatorio (61). Los extractos acuosos de *H. pylori* inducen la expresión de CD11/CD18 en neutrófilos, aumentan la permeabilidad vascular y promueven su adhesión mediante las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) del endotelio (62). Cuando esos extractos contienen una alta concentración de ureasa pueden activar monocitos mediante una vía LPS-independiente (63).

El potencial de virulencia de esta enzima se refleja en la fuerte respuesta de inmunoglobulinas séricas generada contra ella, detectada en pacientes con gastritis activa debido a *H. pylori*. Esto ha motivado el desarrollo de sistemas de ELISA que utilizan ureasa purificada o parcialmente purificada como antígeno, para medir la respuesta inmune (64); lo que también se ha empleado como herramienta diagnóstica en diversas pruebas (65-67).

En resumen, la ureasa mediante una variedad de mecanismos es responsable parcialmente del reclutamiento inicial de monocitos y neutrófilos, de una mayor activación y estimulación del sistema inmune, así como de la producción de una lesión inflamatoria local asociada con la licuefacción del moco gástrico, lo cual indirectamente expone la mucosa a la acción del pH ácido del estómago.

Factores de adherencia.

La colonización de la mucosa lleva implícito como paso previo la capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio gástrico (68), lo cual es esencial para la inducción de gastritis (69). Esta adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular.

Factores patogénicos y diagnóstico de H. pylori.

De tal manera que las lesiones inducidas por la adherencia son de tipo adhesión-efacelación y ultraestructuralmente son similares a las producidas por *E. coli* enteropatógena (EPEC). Estas lesiones se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión, lo que conduce a la formación de una estructura similar a un pedestal de unos 5 nM de diámetro, con uniones estrechas entre la bacteria y la superficie celular, como se aprecia en la figura 4 (70-74).

Estas lesiones también se han observado en infecciones causadas por *Helicobacter mustelae* en urones, único hospedero no humano en el que se producen úlceras durante el curso de la infección (75).

H. pylori infecta sólo mucosa de tipo gástrico, debido a esa estrecha relación con la excreción de urea y posiblemente a la expresión de receptores en ese epitelio. En las lesiones duodenales, la colonización inicial se realiza en focos de metaplasia gástrica y nunca en epitelio intestinal, lo cual denota un alto grado de adaptación al nicho gástrico (76,77). Similarmente, las lesiones extra-gástricas en las que se ha evidenciado la bacteria, siempre están asociadas con metaplasia gástrica, como es el caso del esófago de Barrett o en divertículos intestinales (78-81).

La adhesión a la mucosa gástrica hace que la toxina se libere justo en el epitelio blanco. Además, estudios *in vitro* demuestran que la adherencia es necesaria para la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias (80-82); por lo tanto, la adherencia no debe ser considerada como un evento aislado si no más bien como parte de un proceso complejo que involucra quimiotaxis. Los múltiples flagelos y la morfología espiral de *H. pylori* enfatizan la importancia del movimiento dirigido, el cual está determinado por la detección de quimiotaxinas específicas del hospedero (82,83).

Hemaglutininas.

H. pylori es capaz de aglutinar eritrocitos debido a su interacción con glucosaminas de gru-

pos sanguíneos, algunos de los cuales también se expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica una función adherente .

Debido a que los perfiles de hemaglutinación son importantes en el proceso de adherencia de *Helicobacter* a las células de la mucosa gástrica, muchos grupos de investigadores han usado hemaglutininas para el estudio de adhesinas tipo lectinas (84-88), demostrándose su actividad así como una enorme variación de expresión entre las cepas, debido probablemente a diferencias en las condiciones de crecimiento de la bacteria (p. ej. medios sólidos vs. caldos de cultivo) o bien a criterios utilizados en su cuantificación, entre los que se mencionan la cantidad de glóbulos rojos utilizados y la cantidad de bacterias o la fracción purificada de éstas, lo cual puede afectar de manera crítica el entrecruzamiento y la aglutinación de los eritrocitos (89-91). Entonces las cepas con una pronunciada actividad de hemaglutininas pueden producirlas en mayor cantidad y liberar aquellas que son solubles o que al menos son fácilmente dissociables. Se ha intentado caracterizar dichas hemaglutininas bloqueándolas con azúcares o incubando las bacterias con enzimas cuya especificidad de sustrato es conocida: los resultados obtenidos sugieren que el mayor componente hemaglutinante de *Helicobacter* es una proteína con una especificidad de receptor determinada por la configuración NeuAc(2-3)Gal del ácido siálico. Una mayor caracterización de la HA utilizando métodos complementarios ha permitido la identificación de dos proteínas, una con un peso de 20-25kDa y la otra de 57kDa (92). Evans y col. (93) identificaron una proteína de 20kDa expuesta en la superficie de la bacteria con un receptor específico de ácido siálico que reconoce la configuración NeuAc(alfa2-3)Gal. La expresión de esta adhesina ácido siálico dependiente (sHA) es mayor cuando los cultivos se hacen en agar que en medios líquidos, lo cual sugiere que su regulación está mediada por un fenómeno de fase o alternativamente varía según otros cofactores, cuya composición podría cambiar

durante las condiciones de crecimiento; por ejemplo, la forma lisa o rugosa del lipopolisacárido podría aumentar la interacción de la sHA con el receptor de superficie (91).

Aunque las úlceras pépticas son más frecuentes en pacientes con el grupo sanguíneo O, que es no secretor y el cáncer gástrico en aquellos del grupo A, los perfiles de HA no presentan sesgos en relación con los grupos humanos ABO, lo cual es consistente con la pobre asociación entre el estado secretor o no de los grupos sanguíneos y la infección con *H. pylori* (94-96). Sin embargo la distribución de determinantes en grupos sanguíneos, abre la posibilidad de que la baja afinidad de unión de antígenos de grupos sanguíneos con la mucosa gástrica sea un factor importante en la distribución topográfica de la colonización de la mucosa (97).

Se ha demostrado que algunas cepas de *H. pylori* presentan cadenas laterales del LPS similares a antígenos alélicos de los grupos sanguíneos Lewis^x, Lewis^y y Lewis^{xy} (98). La cadena O-lateral del LPS de *H. pylori* NCTC 11637 es estructuralmente similar al Lewis^x, que también se expresa a nivel de la mucosa gástrica (99). El LPS de la cepa *H. pylori* MO19 es estructuralmente similar al Lewis^y y el LPS correspondiente a la cepa *H. pylori* P466 es similar a los antígenos Lewis^{xy} (100,101). Por lo tanto, en una infección el huésped produciría anticuerpos contra la bacteria y por reacción cruzada esos anticuerpos estarían reconociendo a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis, los cuales no sólo se expresan en eritrocitos, si no también en la cadena β de las ATPasas H, K y en la bomba parietal de protones, por lo que se han considerado blancos potenciales para esos anticuerpos, que estarían entonces actuando como autoanticuerpos. Este fenómeno de autoinmunidad podría tener mayores implicaciones ya que el antígeno Lewis^x también se expresa en un receptor presente en neutrófilos, el CD15, que induce la expresión de CD11b, que a su vez promueve la unión con el endotelio. Por lo tanto, la producción de autoanticuerpos cuyos blancos estarían

expresados en la mucosa gástrica, da pie para postular que un mecanismo productor de las gastritis asociadas con *Helicobacter*, es de carácter autoinmune (98).

Papel de *vacA* y *cagA*

H. pylori puede inducir la formación de vacuolas en una gran variedad de células eucariotas. Inicialmente se pensó que dicha acción no era de carácter tóxico, pues no era neutralizada por antitoxinas bacterianas; además, el amonio liberado por la actividad de la ureasa puede inducir un daño similar. Sin embargo, posteriormente se logró purificar la toxina responsable de tal alteración, la cual debido a su acción ha sido denominada "toxina vacuolizante", ya que ella induce la formación de vacuolas en las células afectadas, hallazgo que también se ha constatado en biopsias de pacientes afectados (fig. 4). Contra esta toxina se han identificado anticuerpos serosos en personas infectadas con *Helicobacter* (102, 103).

El hallazgo de esa toxina es una característica fenotípica que podía ser detectada *in vitro*, lo que motivó a numerosos investigadores a estudiar aislamientos de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas, que incluían desde cuadros leves como la gastritis superficial hasta úlceras, tratando de correlacionar ambos hechos: presencia de toxina y asociación con patología importante. Los resultados obtenidos indicaron que las cepas toxigénicas se aislaban significativamente con más frecuencia de pacientes con úlceras pépticas que de aquellos que sólo presentaban gastritis leves. Esto permitía entonces contar con criterios para identificar las cepas más virulentas, lo que condujo a la búsqueda de métodos genéticos que permitieran identificar las cepas toxigénicas. No obstante, la identificación del gen responsable de esa toxigenicidad llevó a resultados incongruentes, puesto que la mayoría de las cepas contenían ese gen, ahora conocido como *vacA* ("vacuolization associated gen"). Este gen ha sido clonado y su análisis sugiere que codifica una proteína que posee una señal aminoterminal corta, que es escindida

para permitir su paso a través de la membrana citoplasmática y una carboxiterminal de 45kDa que actúa como poro. La secuencia de la toxina madura no demuestra homología con otras toxinas conocidas (104-107).

La búsqueda de una respuesta para la incongruencia entre la citotoxicidad y la presencia del gen *vacA*, llevó al hallazgo del gen *cagA* ("cytotoxin associated gen") cuya presencia se relaciona con la expresión del gen *vacA* y por lo tanto con la toxigenicidad. Además, está presente sólo en las cepas aisladas de pacientes sintomáticos. En los países desarrollados el 60% de las cepas son *cagA+*; pero en los países en vías de desarrollo la proporción de *cagA+* es mayor (108).

Las cepas *cagA+* al ser más virulentas están asociadas con ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y recientemente se ha demostrado que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces la inducida por cepas *cagA-* (109). Por lo tanto, la identificación de los genes *vacA* y *cagA* permite identificar las cepas con mayor virulencia y por tanto asociadas con cuadros clínicos más severos.

ASOCIACIÓN CON CÁNCER GÁSTRICO.

El cáncer gástrico ocupa el segundo lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial (110) y desafortunadamente en países en vías de desarrollo el diagnóstico se realiza generalmente en estadios avanzados, lo que se asocia con una alta tasa de mortalidad (111).

Por ejemplo, la tasa de mortalidad por cáncer gástrico en Costa Rica fue de 1,81 por 100 mil habitantes en el año de 1994, constituyéndose en la segunda causa de muerte (112, 113).

El adenocarcinoma gástrico se clasifica en dos tipos histológicos distintos: uno intestinal y otro difuso. El primero predomina en poblaciones de alto riesgo y es más común en personas de edad avanzada. Es precedido por continuos cambios histológicos, tales como gastritis activa, atrofia in-

testinal, metaplasia y displasia. El tipo difuso es menos común, las lesiones precancerosas no han sido bien definidas y se presenta en poblaciones de menor riesgo, compuesta generalmente por grupos de gente joven (114-116). La evolución histológica del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, lleva implícitos los cambios histológicos descritos en las infecciones por *Helicobacter*, por lo que este agente se ha incriminado en la etiología del cáncer gástrico, a tal grado que *H. pylori* fue declarado como carcinógeno de grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en 1994 (117).

La infección con *H. pylori* se asocia con un 70% de los casos de gastritis crónica activa y con el 90 a 95% de las úlceras duodenales y con un 60% de pacientes con cáncer (118). En los Estados Unidos, la infección se presenta con menos frecuencia entre la población caucásica que en la población afroamericana e hispanica (19).

Durante el desarrollo del EUROGAST, un estudio epidemiológico realizado en múltiples centros que abarcó 17 poblaciones separadas en 13 países europeos e incluyó también a Japón y los Estados Unidos, se determinó que existe una relación significativa estadísticamente entre la infección determinada mediante la detección de anticuerpos IgG contra *H. pylori* y la mortalidad e incidencia por cáncer gástrico; así como un riesgo relativo de padecer cáncer 6 veces superior en poblaciones con alta prevalencia de la infección, en comparación con poblaciones no infectadas. Por otra parte, las tasas de infección de *H. pylori* y el cáncer gástrico se correlacionan de manera inversa con el nivel socioeconómico y aumentan con la edad, concluyéndose que existe una importante asociación entre esta infección y el cáncer gástrico (119).

Otros estudios geográficos sobre la incidencia de cáncer y la infección con *H. pylori* revelan un paralelismo sorprendente entre ambos (120).

En regiones de elevado riesgo de cáncer, la infección es adquirida en la niñez, en contraste con la infección en regiones con tasas bajas de cáncer

gástrico. Por ejemplo, en Perú, donde las tasas de cáncer gástrico alcanzan proporciones endémicas, virtualmente todos los adultos están infectados por *H. pylori* (121). Algo similar ocurre en China (122) y en Colombia (123).

Sin embargo, existen algunas discrepancias en los estudios epidemiológicos entre ambas enfermedades. Por ejemplo, el cáncer gástrico es más frecuente en hombres que en mujeres; mientras que la prevalencia de la infección por *H. pylori* es igual en ambos géneros. Por el contrario, se ha informado de algunas poblaciones africanas que poseen una elevada tasa de infección por *H. pylori*, pero presentan tasas de cáncer gástrico muy bajas (124). También, un estudio de seroprevalencia realizado en Italia no mostró diferencias significativas entre las tasas de infección por *H. pylori* en regiones de elevado y bajo riesgo de cáncer (125). Estos hechos en conjunto hacen suponer que existen otros factores carcinogénicos importantes que permanecen aún ocultos.

DESARROLLO DE CÁNCER Y *H. PYLORI*.

La hipótesis corriente que relaciona *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal, se basa en un daño progresivo inducido por la presencia prolongada de la bacteria, que lleva a lesiones que evolucionan de una gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis atrófica y en esta última etapa, hay una infiltración inflamatoria importante con agregados foliculares linfoides que destruyen la mucosa a tal grado, que ocurre pérdida de la función y se induce una metaplasia intestinal, displasia y eventualmente cáncer (116).

La metaplasia intestinal puede ser considerada como una estrategia defensiva contra *H. pylori*, ya que esta bacteria sólo coloniza el epitelio gástrico (126,127).

Entre los factores asociados con protección contra el cáncer gástrico se menciona el ácido ascórbico, el cual es secretado contra un gradiente desde la mucosa hacia el jugo gástrico (128). El papel protector parece radicar en su habilidad para inactivar las formas reactivas de oxígeno, que da-

ñan el ADN, así como de alterar el mecanismo responsable de la formación de compuestos nitrosos (129, 130). Las formas reactivas de oxígeno dañan el ADN causando rupturas en las bandas del ácido nucleico, translocaciones y deleciones (131,132). *H. pylori* no sólo tiende a disminuir la secreción del ácido ascórbico sino que la gastritis crónica causada por la infección resulta en una hipoclorhidria que conduce a un sobrecrecimiento bacteriano (128). Luego de la erradicación exitosa de la bacteria los niveles de ácido gástrico retornan a niveles normales y las especies reactivas de oxígeno se reducen sustancialmente (132).

En un pequeño porcentaje de tumores gástricos del tipo linfoma, la infección con *H. pylori* también se encuentra fuertemente relacionada (133).

Se ha demostrado una elevada incidencia de tejido linfoide asociado a mucosa ("MALT") en regiones con una elevada prevalencia de cáncer gástrico e infección con esta bacteria, por lo que se ha acuñado el anglicismo "MALToma" para referirse a estos tumores (134). El tejido linfoide no es normal a nivel del estómago y la erradicación exitosa de la bacteria conduce a una completa regresión de la neoplasia, reforzando aun más la asociación de esta patología con *Helicobacter* (135).

DIAGNÓSTICO DE *H. PYLORI*.

Los primeros informes sobre el hallazgo de *H. pylori* se realizaron analizando biopsias gástricas, lo que llevó a definir una serie de métodos diagnósticos basados en el análisis de tejidos, o sea cuyo prerrequisito era la gastroscopía y por ende la biopsia, de ahí que esos métodos fueron denominados invasivos; en contra posición con aquellos otros desarrollados más tarde, que no requieren biopsia y que se denominan "no invasivos" (136).

Métodos invasivos.

Los métodos invasivos requieren el análisis de biopsias gástricas, ya sea para la búsqueda microscópica de la bacteria ya fuese en cortes histológicos o en improntas de éstas, o bien el

Factores patogénicos y diagnóstico de H. pylori.

cultivo y las pruebas de ureasa. En nuestra experiencia, la secuencia diagnóstica seguida es: a) prueba de ureasa rápida; b) maceración de la biopsia; c) inoculación del macerado en platos de agar sangre sin antibióticos; d) frotis del material macerado y tinción con azul de toluidina; e) cortes histológicos, que además de la tinción de hematoxilina eosina, se puede utilizar azul de toluidina para buscar la bacteria. El detalle de esta metodología es el siguiente:

a) Ureasa rápida:

Existe una serie de diversas versiones del método, y en general se basan en que la hidrólisis de la urea provoca liberación de CO_2 y NH_4 , con el consiguiente aumento del pH, lo que se pone de manifiesto por un cambio en el color de un indicador ácido-base. En el mercado se consiguen diversas pruebas comerciales como CLOtest, PyloriTek y Hpfast, cuya carta de presentación es una alta sensibilidad y especificidad y un tiempo de lectura corto, que puede ser desde un minuto a 24 horas (137); obviamente las versiones rápidas han sido las más empleadas. En nuestro caso evaluamos, con buenos resultados, una solución de urea al 6% con rojo de fenol como indicador de pH a una concentración del 0,05%, haciendo la lectura entre uno y 10 minutos, aunque usualmente los casos positivos viran el indicador antes del minuto (138).

No obstante, el cambio de coloración es muy tenue ya que vira de un tono ligeramente amarillento a un rosáceo, por lo que probamos una mezcla de indicadores (azul de bromotimol y rojo de fenol) que brinda un cambio de color más acentuado, la lectura se hace antes del minuto y mantiene una sensibilidad y especificidad similar a la prueba anterior (66).

b) Cultivo:

Contrario a la suposición de que *H. pylori* es una bacteria fastidiosa, es posible aislarla e identificarla fácilmente. La muestra para el estudio bacteriológico es una biopsia que debe ser macerada. Esto se hace colocándola en un tubo de 16 x 100 mm que actúa como mortero y se macera

con un tubo de 13 x 100 mm que actúa como pistilo y sirve también para inocular el material macerado en la placa de cultivo; obviamente este segundo tubo debe estar estéril por fuera. El medio de cultivo que empleamos es agar sangre sin antimicrobianos y las placas se incuban en microaerobiosis por 5 días a 35°C. Esta atmósfera microaerofílica puede generarse con sobres generadores de CO_2 y N_2 como el CampyPak o con el sobre empleado para anaerobiosis, pero en este caso no debe colocarse el catalizador a la jarra; también puede lograrse incubando las placas en una incubadora con una atmósfera de CO_2 del 10 al 15%. Sin embargo, un método económico y sencillo consiste en colocar las placas en un frasco de vidrio de boca ancha, con tapa de rosca cuyo empaque puede hacerse con un trozo de neumático de automóvil y la atmósfera se genera con una vela encendida y una tableta efervescente de antiácido, tipo Alka-Seltzer®, la cual se coloca con unos 10 ml de agua en una bolsa plástica adherida a la pared del frasco para economizar espacio (139).

A los cinco días de incubación en una muestra positiva se obtienen colonias de aproximadamente 1mm de diámetro, claras, transparentes, brillantes y convexas, que a la tinción de Gram muestran bacilos curvos Gram negativos, que son ureasa, catalasa y oxidasa positivos. La tinción de Gram o una tinción de flagelos (140) ayuda a la identificación de la bacteria, pues como indicábamos previamente se trata de un bacilo curvo, Gram negativo, con un mechón de 4 a 7 flagelos en un sólo extremo de la bacteria (5). Sin embargo, para la tinción de Gram debe contratarse con fucsina básica, pues con safranina esta bacteria se colorea muy levemente y es difícil de observar.

c) Detección microscópica de la bacteria:

La forma curvada característica de *Helicobacter* hace que su observación en un frotis pueda utilizarse como diagnóstico presuntivo. Esta observación puede realizarse en improntas de la biopsia o en cortes histológicos, en ambos casos con tinciones como Gram, hematoxilina-eosina,

F Rivas-Traverso, F Hernández.

impregnaciones argénticas y recientemente se ha utilizado con mucho éxito la coloración con azul de toluidina. Este último colorante permite una fácil identificación de la bacteria ya que ésta se colorea intensamente, metodología ideada por A. Delgado en el Laboratorio del Dr. P. Correa (Comunicación personal). La observación microscópica de la bacteria, aun en muestras teñidas con hematoxilina eosina, guarda una buena correlación con su aislamiento (138).

Métodos no invasivos:

Los métodos en los cuales no se requiere biopsia han sido denominados no invasivos (136), los dos más utilizados son la serología y la prueba del carbono marcado en el aliento del paciente. Sin embargo, recientemente se ha diseñado una prueba para la detección de antígenos de *Helicobacter* en las heces del paciente, cuya correlación es excelente con respecto al hallazgo de la bacteria en la biopsia. Los métodos serológicos desarrollados permiten la evaluación del nivel de anticuerpos en sangre total, en saliva y en orina (136). Estos métodos permiten realizar encuestas serológicas a bajo costo, pero no permiten dar seguimiento post tratamiento al paciente, ya que los anticuerpos suelen permanecer elevados entre 24 y 48 meses después del tratamiento (136, 141); aunque manteniendo un suero control pretratamiento es posible un seguimiento mediante un ELISA cuantitativo (142).

La detección de carbono marcado con un isótopo, se basa en suministrar al paciente una dosis de urea marcada con un isótopo, C^{13} o C^{14} (143, 144). Este último no es radioactivo, por lo que se centran las esperanzas en él como prueba general, aunque es una prueba cara para países en desarrollo (144). Si el paciente está infectado la bacteria hidroliza la urea en el estómago liberando CO_2 con el isótopo que es detectado en el aliento del paciente.

Por otro lado, las pruebas de PCR han permitido la identificación del genoma de la bacteria en saliva, placa dental y heces, aparte de los tejidos gástricos (39, 40), por lo que estas

pruebas bien podrían considerarse tanto como métodos diagnósticos no invasivos o invasivos, según la muestra empleada. Finalmente, la prueba que parece ideal tanto para evaluar la evolución postratamiento, como para investigaciones epidemiológicas y que vendría a aclarar la vía de diseminación de este agente, es la identificación de antígenos de *Helicobacter* en heces del paciente, lo cual se ha realizado mediante pruebas inmunoenzimáticas.

CONCLUSIÓN.

Aunque ciertamente organismos con morfología espiral habían sido observados en la mucosa gástrica desde hace más de un siglo, la atención microbiológica a este micronicho nació luego del aislamiento de *H pylori* en 1982 por Marshall y Warren, hallazgo que vino a derribar un paradigma largamente sostenido y a marcar el inicio de una nueva era en lo que respecta a la génesis de la patología duodenal, así como un renovado interés en el tema por parte de especialistas. Sin embargo, se abren nuevas posibilidades que requieren un caudal continuo de investigación, como son la búsqueda de métodos rápidos y efectivos para evaluar la resistencia a antibióticos (145), o bien evaluar antígenos bacterianos con posibilidades de utilizarlos como vacuna contra la gastritis y úlceras pépticas (146-148).

En la presente revisión hemos querido presentar un vistazo acerca de los más discutidos mecanismos empleados por este patógeno

REFERENCIAS.

- 1.- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The Complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388:539-47.
- 2.- Marshall BJ. History of the discovery of *C pylori*. In Blasser MJ. ed. *Campylobacter pylori* in Gastritis and Peptic Ulcer Disease. New York: Igaku-Shoin; 1989 p. 7-23.

Factores patogénicos y diagnóstico de *H. pylori*.

- 3.- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1983; i:1311-65.
- 4.- Goodwin CS, Armstrong JA, Shilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. *nov.* As *Helicobacter pylori* comb. *nov.* and *Helicobacter mustelae* comb. *nov.* *Int Syst Bacteriol* 1989; 39:397-405.
- 5.- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *nov.* *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41:88-103.
- 6.- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van Den Borre C, Higgins R, Hommez J, Kersters K, Butzler JP, Goosens H. Polyphasic taxonomic study to the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. *nov.* and *Arcobacter skirrowii* sp. *nov.*, an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:344-356
- 7.- Hernández F, Monge-Nájera J. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop* 1994;42:85-92.
- 8.- Jones DM, Lessells AM, Eldridge J. *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J Clin Pathol* 1984; 37:1002-6.
- 9.- Langenberg ML, Tytgat GNJ, Schipper MEI, Rictra PJGM, Zanen HC. *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet* 1984; i:1348.
- 10.- McNulty CMA, Watson DM. Spiral bacteria of the gastric antrum. *Lancet* 1984; i:1068-69.
- 11.- Hernández, F, Rivera P. The first cases of *Campylobacter (Helicobacter) pylori* reported from Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1990;38:481-2.
- 12.- Hernández F, Rivera P, Miranda J, Sigarán M. Prevalence of *Helicobacter pylori* in adults from Costa Rica. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo*. En prensa. 1999.
- 13.- Valle J, Sëppäla K, Siponnen P, Kosunen T. Disappearance of gastritis after eradication of *Helicobacter pylori*. A morphometric study. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26:1057-65.
- 14.- Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990; 161:626-33.
- 15.- Eaton KAD, Morgan DR, Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1989; 57:1119-25.
- 16.- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 1985; 142:436-9.
- 17.- Morris A, Nicholson GI *et al.* Experimental and accidental *Campylobacter pylori* infection in humans. In Blaser MJ, ed. *Campylobacter pylori* gastritis and Peptic Ulcer Disease. New York: Igaku Shoin Medical Publishers; 1989 p. 61-72.
- 18.- NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994; 272:65-9.
- 19.- Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DY, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology* 1991; 100:1495-1501.
- 20.- Mendall, MA, Goggin PM, Molineux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 1992; 339:896-7.
- 21.- Taylor DN, Parsonnet J. Epidemiology and natural history of *H pylori* infections, In M. J. Blaser, P. F. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg and R.L Guerrant (ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press; 1995. p. 551-564.
- 22.- Cave DR. How *Helicobacter pylori* is transmitted? *Gastroenterology* 1997; 113:s9-s14.
- 23.- Cullen DJE, Collin BJ, Christiansen BJ *et al.* When is bacterial *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* 1997; 34:1861-2.
- 24.- Axon ATR. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Yale J Biol Med* 1997; 70:1-6.
- 25.- Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petrea C, et al. Examination of human stomach, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1397-8.

F Rivas-Traverso, F Hernández.

- 26.- Ferguson Da LIC, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J Clin Pathol 1993; 31:2802-4.
- 27.- Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, Zaatari FA. Detection of *H pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31:783-7.
- 28.- Li CF, Ha TZ, Ferguson DA, *et al.* A newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva and faeces. Evidence of high prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva support oral transmission. Digest Dis Sci 1996; 41:2142-9.
- 29.- Majmudar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in health volunteers. Indian J Gastroenterol 1990; 9:271-2.
- 30.- Grubel P, Cave DR. Sanitation and houseflies (*Musca domestica*) for the transmission of *Helicobacter pylori*. Bull Inst Pasteur 1998; 96:83-91.
- 31.- Grubel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1300-3.
- 32.- Axon ATR. Review Article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? Aliment Pharmacol Ther 1995; 9:585-8.
- 33.- Langenberg W, Raws EAJ, Odubier JH, Tytgat GNJ. Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy biopsy. J Infect Dis 1990; 161:507-11.
- 34.- Akamatsu T, Tabata K, Hironga M, Kawakami H, Uyeda M. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. Am J Infect Control 1996; 24:396-401.
- 35.- Talley JN, Noack KB. The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infections In: *Helicobacter pylori*. Biology and clinical practice. Goodwin CS, Worsley BW, ed. London: PCR Press; 1993. p. 63.
- 36.- Thomas JE, Gibson GR, Darboe KM, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet 1992; 340:1194-5.
- 37.- Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterology 1994; 107:1671-4.
- 38.- Gibson W, Kelly SM, McFarlane G, McFarlane T. Methodology for the isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of persons in the United Kingdom. J Microbiol Meth 1995; 23:321-8.
- 39.- Nilsson HO, Aleljung P, Nilsson I, Tyszhiewicz T, Wadstrom T. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. J Microbiol Meth 1996; 27:73-9.
- 40.- Notarnicola N, Russo F, Cavallini A, *et al.* PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA faeces from patient with gastroduodenal pathology. Med Sci Res 1996; 24:785-7.
- 41.- Watanabe T, Tomita S, Kudo M, Kurosawa M, Orino A, Todo A, Chiva T. Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in faeces. Scand J Gastroenterol 1998; 33:1140-3.
- 42.- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Vidal R, Cabrita J, *et al.* Complex polysaccharides as PCR inhibitors in faeces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol 1997; 35:995-8.
- 43.- Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Lancet 1991; 337:1503-6.
- 44.- Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. Presence of *Helicobacter pylori* in Swedish faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. J Appl Microbiol 1998; 85:282-6.
- 45.- Grubel P, Huang L, Masubuchi N, Stutzenberger FJ, Cave DR. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. Lancet 1998; 352:788-9.
- 46.- Osato MS, Ayub K, Le HH, Reddy R, Graham DY. Houseflies are unlikely reservoir of vector for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1998; 36:2786-8.
- 47.- Handt LK, Fox JG, Dewhirst E, *et al.* *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect Immun 1994; 62:2367-74.
- 48.- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced

Factores patogénicos y diagnóstico de *H. pylori*.

- by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun 1991; 59:2470-5.
- 49.- Hu LT, Mobley HLT. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1990; 58:992-8.
- 50.- Mobley HLT. The Role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. Aliment Pharmacol Ther 1996; 10 (suppl.):57-64.
- 51.- Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Wren BW, Tabaqchali S. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. Nucl Acids Res 1990; 18:362.
- 52.- Cussac V, Ferrero RL, Labigne A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen limiting conditions. J Bacteriol 1992; 174:2466-73.
- 53.- Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. J Bacteriol 1991; 173:1920-31.
- 54.- Jones BD, Mobley HLT. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. J Bacteriol 1989; 171:6414-22.
- 55.- Nicholson EB, Concaugh EA, Foxall PA, Island MD, Mobley HLT. *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by *ureR*. J Bacteriol 1993; 175:465-73.
- 56.- Lee MH, Mulrooney SB, Renner MJ, Markowitz Y, Hausinger RP. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureF*, *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. J Bacteriol 1992; 174:4324-30.
- 57.- de Koning-Ward TF, Ward AC, Robins-Browne RM. Characterization of the urease-encoding genes complex of *Yersinia enterocolitica*. Gene 1994; 145:25-32.
- 58.- Skurnik M, Batsford S, Mertz A, Schiltz E, Toivanen P. The putative arthritogenic cationic 19-kilodalton antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease β -subunit. Infect Immun 1993; 61:2498-504.
- 59.- Maeda M, Hidaka M, Nakamura A, Masaki H, Uozumi T. Cloning, sequencing, and expression of thermophilic *Bacillus sp* strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1994; 176:432-42.
- 60.- Barer MR, Elliot TSJ, Berkeley D, Thomas JE, Eastham EJ. Intracellular vacuolization caused by the urease of *Helicobacter pylori*. J Infect Dis 1990; 161:1302-4.
- 61.- Suzuki M, Miura S, Soematsu M, et al. *Helicobacter pylori* associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. Am J Physiol 1992; 263:G719-25.
- 62.- Bodger K, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. Br Med Bull 1998; 54:139-50.
- 63.- Mai UEH, Pérez-Pérez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. J Clin Invest 1991; 87:894-900.
- 64.- Laheij RJF, Straatman H, Jansen JBMJ, Verbeek ALM. Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology kits: a Review. J Clin Microbiol 1998; 36:2803-9.
- 65.- Malfertheiner P, Dominguez-Muñoz JE, Heckenmüller H, Neubrand M, Fischer HP, Sauerbruch T. Modified rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* infection. Eur J Gastrol Hepatol 1996; 8:53-6.
- 66.- Blanco CA, Guerra D, Rivera P, Hernández F, Hevia F, Guillén F, et al. Evaluación de una prueba de ureasa rápida para la detección de *Helicobacter pylori* y prevalencia de este agente en pacientes costarricenses. Rev Gastroenterol En prensa, 1999.
- 67.- Cole R. Detección de *Helicobacter pylori* mediante una prueba de ureasa. Trabajo de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 68.- Logan RPH. Adherence of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 1996; 10 (suppl):3-15.
- 69.- Hessej SJ, Spencer J, Wyatt JI, et al. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter*-associated chronic gastritis. Gut 1990; 31:134-8.
- 70.- Smoot DT, Resau JH, Naab T, et al. Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. Infect Immun 1993; 61:350-5.
- 71.- Noach LA, Rolf TM, Tytgat GNJ. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. J Clin Pathol 1994; 47:699-704.

F Rivas-Traverso, F Hernández.

- 72.- Dytoc M, Gold B, Louie M, *et al.* Comparison of *Helicobacter* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect Immun* 1993; 61:448-56.
- 73.- Law D. Adhesion and its Role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:152-73.
- 74.- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989; 53:210-30.
- 75.- O'Rourke J, Lee A, Fox JG. An ultrastructural study of *Helicobacter mustelae* and evidence of a specific association with gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1992; 36:420-7.
- 76.- O'Rourke JL, Lee A, Fox JG. *Helicobacter* infection in animals: A clue to the role of adhesion in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1992; 4:s31-7.
- 77.- Gold BD, Dytoc M, Huesca M, *et al.* Comparison of *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* adhesion to eukaryotic cells *in vitro*. *Gastroenterol* 1995; 109:692-700.
- 78.- Walker SJ, Birch PJ, Stewart M, Stoddart CJ, Hart CA, Day DW. Patterns of colonisation of *Campylobacter pylori* in the oesophagus, stomach and duodenum. *Gut* 1989; 30:1334-8.
- 79.- Shabib SM, Cutz E, Drumm B, Sherman PM. Association of gastric metaplasia and duodenitis with *Helicobacter pylori* infection in children. *Am J Clin Pathol* 1994; 102:188-91.
- 80.- Madsen JE, Vetvik, Aase S. *Helicobacter*-associated duodenitis and gastric metaplasia in duodenal ulcer patients. *APMIS* 1991; 99:997-1000.
- 81.- Clearfield HR. *Helicobacter pylori*: aggressor or innocent bystander? *Med Clin North Am* 1991; 75:815-9.
- 82.- Sharma SA, Tummuru MKR, Blaser M. Characterization of gastric epithelial cell IL-8 induction by *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:A244.
- 83.- Crowe SE, Alvarez L, Dytoc M, *et al.* Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Gastroenterology* 1995; 108:656-74.
- 84.- Emody L, Carlsson A, Ljungh A, Wädström T. Mannose resistant haemagglutination by *Campylobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* 1988; 20:353-4.
- 85.- Nakazawa T, Ishibashi M, Konishi H, Takemoto T, Shigeeda M, Kochiyama T. Haemagglutination activity of *Campylobacter pylori*. *Infect Immun* 1989; 57:989-91.
- 86.- Robinson NJ, Goodwin CS, Cooper M, Burke V, Mee BJ. Soluble and cell associated haemagglutinins of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J Med Microbiol* 1990; 33:277-84.
- 87.- Lelwala-Guruge J, Ljungh A, Wadström T. Haemagglutination patterns of *Helicobacter pylori*. *APMIS* 1992; 100:908-13.
- 88.- Taylor NS, Hasubski AT, Fox JG, Lee A. Haemagglutination profiles of *Helicobacter pylori* species that causes gastritis in man and animals. *J Med Microbiol* 1992; 37:299-303.
- 89.- Huang J, Keeling PWN, Smyth CJ. Identification of erythrocytes binding antigens in *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* 1992; 138:1503-13.
- 90.- Evans DG, Evans DJ Jr, Moulds JJ, Graham DY. N-acetylneuraminylactose-binding Fibrillar haemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonisation factor antigen. *Infect Immun* 1988; 56:2896-906.
- 91.- Armstrong JA, Coper M, Goodwin CS, *et al.* Influence of soluble haemagglutinins on adherence of *Helicobacter pylori* to Hep-2 cells. *J Med Microbiol* 1991; 34:181-7.
- 92.- Lelwala-Guruge J, Ascencio F, Kreger AS, Ljungh A, Wadström T. Isolation of sialic acid-specific surface haemagglutinin of *Helicobacter pylori* strain NCTC 11637. *Zbl Bakt* 1993; 280:93-106.
- 93.- Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ Jr, Graham DY, Lee CH. Cloning nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1993; 175:674-83.
- 94.- Löffeld RJLF, Stobberingh E. *Helicobacter pylori* and ABO blood groups. *J Clin Pathol* 1991; 44:516-7.
- 95.- Mentis A, Blackwell CC, Weir DM, Spiliadis C, Dailianis A, Skandalis N. ABO blood group, secretor status and detection of *Helicobacter pylori* among patients with gastric or duodenal ulcers. *Epidemiol Infect* 1991; 106:221-9.

Factores patogénicos y diagnóstico de *H. pylori*.

- 96.- Hook-Nikanne J, Sistonen P, Kosunen TU. Effect of ABO blood group and secretor status on the frequency of *Helicobacter pylori* antibodies. Scand J Gastroenterol 1990; 25:815-8.
- 97.- Sidebotham RL, Baron JH, Schragger J, Spencer J, Clamp JR, Hough L. Influence of blood group and secretor status on carbohydrate structures in human gastric mucins: implications for peptic ulcer. Clin Sci 1995; 89:405-15.
- 98.- Appelmelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, et al. Potential Role of Molecular Mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group in autoimmunity. Infect Immun 1996; 64:2031-40.
- 99.- Aspinall GO, Monteiro MA, Pang H, Walsh EJ, Moran AP. O antigens chains in the lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* NCTC 11637. Carbohydr Lett 1994; 1:151-6.
- 100.- Aspinall GO, Monteiro MO, Pang H, Walsh EJ. Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the O antigen and the core oligosaccharide regions. Biochemistry 1996; 35:2489-97.
- 101.- Aspinall GO, Monteiro MA. O antigen chains in the lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide strains. Biochemistry 1996; 35:2498-504.
- 102.- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J Med Microbiol 1988; 26:93-9.
- 103.- Cover TL, Cao P, Murthy UK, Sipple MS, Blaser MJ. Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *H. pylori*. J Clin Invest 1992; 90:913-8.
- 104.- Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem 1994; 269:1056-73.
- 105.- Telford JL, Guiara P, Dell'Orco M, et al. Gene structure of the *Helicobacter* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J Exp Med 1994; 179:1653-8.
- 106.- Schmitt W, Hass R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type exported protein. Molec Microbiol 1994; 12:307-19.
- 107.- Phadnis SH, Janson ID, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1994; 62:1557-65.
- 108.- Blaser MJ. Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. Aliment Pharmacol Ther 1996; 10 (suppl, 1):73-7.
- 109.- Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* in the gastric antrum: association of bacterial density with duodenal ulcer status and infection with *cagA* positive bacterial strains, and negative association with serum IgG levels. Am J Gastroenterol 1994; 89:1322.
- 110.- Parkin DM, Pisani P, Fearly J. Estimates of worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int J Cancer 1993; 54:594-606.
- 111.- Ruge M, Sonogo F, Panozzo M, et al. Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis. Cancer 1994; 73:1127-33.
- 112.- Indicadores de mortalidad general por cantón de Costa Rica. 1994. Departamento Estadístico. Ministerio de Salud.
- 113.- Sierra, R. "Boletín: Alimentos y Salud", 1994; 4:1-6.
- 114.- Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965; 64:31-49.
- 115.- Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res 1988; 48:3554-66.
- 116.- Correa P. Human carcinogenesis: a multistep and multifactorial process Cancer Res 1992; 52:6735-40.
- 117.- International Agency for Research on Cancer. *Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol 61, Lyon:IARC; 1994.
- 118.- O'Connor F, Buckley M, O'Morain C. *Helicobacter pylori*: the cancer link. J R Soc Med 1996; 89:674-8.
- 119.- The Eurogast Study Group. An International Association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet 1992; 341:1359-13.
- 120.- Pérez-Pérez GI, Taylor DN, Bodhidatta L, et al.

F Rivas-Traverso, F Hernández.

Seroprevalence of *H pylori* infections in Thailand. J Infect Dis 1990; 161:1237-41.

121.- The Gastrointestinal Physiology Working Group. *Helicobacter* and gastritis in Peruvian patients: relationship to socioeconomic level, age and sex. Am J Gastroenterol 1990; 85:819-23.

122.- Forman D, Sitas F, Newell DG, *et al.* Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. Int J Cancer 1990; 46:608-11.

123.- Correa P, Fox J, Fontham E, *et al.* *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. Cancer 1990; 66:2569-74.

124.- Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. Gut 1992; 33:429-31.

125.- Palli D, Decarli A, Cipriani F, *et al.* *Helicobacter pylori* antibodies in areas of Italy at varying gastric cancer risk. Cancer Epid Biomarkers Prev 1993; 2:37-40.

126.- Filipe MI. Histochemistry of intestinal mucins. In: Whitehead R, ed. Gastrointestinal and Oesophageal Pathology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989. p. 71.

127.- Rokkas T, Filipe MI, Salden GE. Detection of an increased incidence of early cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. Gut 1991; 32:1110-3.

128.- O'Connor HJ, Schorah CJ, Habibzadah N, Axon ATR, Cockel R. Vitamin C in the human stomach: relation to gastric pH, gastroduodenal disease and possible sources. Gut 1989; 30:436-42.

129.- Freeman JT, Halkesbring R. Comparative studies of ascorbic acid levels in gastric secretion and blood. Gastroenterology 1957; 32:878-86.

130.- Hansson LE, Myren O, Bergstrom R, *et al.* Nutrients and gastric cancer risk. A population based control study in Sweden. Int J Cancer 1994; 57:638-44.

131.- Koningsberger JC, Marx JJM, Van Hattum J. Free radicals in gastroenterology. Scand J Gastroenterol 1988; 23 (suppl. 154):30-40.

132.- Drake IM, Warland D, Carswell N, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) activity and damage in *Helicobacter*

pylori-associated gastritis (HPG)-effect of eradication therapy. Gut 1995; 37 (suppl. 1):A155.

133.- Atherton JC, Cover TJJ, Ray KC, PeeK RM, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Genotypic analysis of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* isolates from the U.S., Thailand, Peru and China. Gut 1995; 37 (suppl 1):A275.

134.- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. Lancet 1995; 345:1591-4.

135.- Stolte M, Edti S. Lymphoid follicles in the antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*. J Clin Pathol 1989;42:1269-71

136.- Cutler AF, Haustad S, Ma C, *et al.* Accuracy of invasive and non invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infections. Gastroenterology 1995; 109:136-41.

137.- Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology Clin N Amer 1993; 22:5-19.

138.- Hernández F, Rivera P, Sigarán M, Miranda J. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Comparison of an urease test, histological visualization of curved bacteria and culture. Rev. Inst. Trop Med. Sao Paulo 1990; 33:80-2.

139.- Hernández F, Rivera P. A low cost method to produce a gaseous environment for the isolation of *Helicobacter pylori*. Rev Inst Trop Med Sao Paulo 1992; 33:80.

140.- Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, Dowel VR. Practical procedure for demonstrating bacterial flagellae. J Clin Microbiol 1989;16: 948-52.

141.- Talley N, Newell D, Ormand J, *et al.* Serodiagnosis of *Helicobacter pylori*: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 1991; 29:1635-9.

142.- Crabtree J, Shallcross JM, Heatley RV, Wyatt JJ. Evaluation of commercial Elisa for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J Clin Pathol 1991; 44:326-8.

143.- Marshall BJ, Surveyor T. Carbon-14 urea breath test for diagnosis fo *Campylobacter pylori* associated gastritis. J Nucl Med 1988; 29:11-6.

144.- Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr, *et al.* *Campylobacter pylori* detected by the C-13 urea breath test.

Factores patogénicos y diagnóstico de H. pylory.

Lancet 1987; 1:1134-7.

145.- Björkholm B, Befrits R, Jaup B, Engstrand L. Rapid PCR detection of *Helicobacter pylori* associated virulence and resistance genes directly from gastric biopsy material. J Clin Microbiol 1998; 36:3689-90.

146.- Lu J, Perng C, Shyu R, Chan C, Lou Q, Chang S, Lee C. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol 1999; 37:372-4.

147.- Corthesy-Theulez I, Vaney AC, Haas R. *Helicobacter pylori* urease B subunits as therapeutic vaccine against *H felis* infection. Gastroenterology 1994; 106:668.

148.- Corthesy-Theulez I, Porta N, Glauser. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. Gastroenterology 1995; 109:115-21.