Rev Mex Med Forense, 2017, 2(2): 36-50 ISSN 2448-8011

Método de ELISA para la determinación de Helicobacter pylori en muestras de suero y saliva

Artículo Original

ELISA method for the determination of Helicobacter pylori in samples of serum and saliva: Original Article

Iván Arturo Quijano García[1], Ángel Augusto Aguirre Gutiérrez[2], Patricia Beatriz Denis Rodríguez[3], Clara Luz Parra Uscanga[4], Carolina Barrientos Salcedo[5]

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori es una bacteria que se ha asociado recientemente a la etiología de gastritis aguda, gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico; los métodos tradicionales de detección son invasivos; por ello, es importante valorar técnicas no invasivas para su detección en sustratos accesibles como el suero y la saliva.*

Material y Métodos. *Se tomaron muestras de suero y saliva en una población de 65 individuos de 18-31 años, 71% del sexo femenino; las muestras fueron analizadas por medio del kit de ELISA de IBL International; los resultados fueron comparados para determinación de sensibilidad y especificidad.*

Resultados: *Los resultados de las primeras 22 muestras de suero y saliva resultaron positivos para ambas matrices biológicas, dándonos una asociación estadísticamente significativa. Al valorar los resultados de las ultimas 43 muestras de suero y saliva encontramos cierta variabilidad, sin significancia estadística.*

Conclusión: *El kit IgG ELISA es un método sensible; teniendo en cuenta las ventajas para la obtención de las muestras de saliva ante el suero, se puede considerar como una ayuda para el diagnóstico de la bacteria.*

Palabras Clave: *Helicobacter pylori, saliva, ELISA*

Recibido: 20 Mayo 2017, Aceptado: 6 Junio 2017, Publicado: 15 Agosto 2017

[1] Cirujano Dentista, Máster en Medicina Forense
[2] Médico Cirujano, Máster en Medicina Forense, Doctor en Ciencias Forense, Instituto de Medicina Forense, UV
[3] Médico Cirujano, Máster en Medicina Forense, Doctora en Educación, Instituto de Medicina Forense, UV
[4] Cirujano Dentista, Directora de la Facultad de Odontología, UV
[5] Bióloga, Doctora en Ciencias, Instituto de Investigaciones Médico Biológicas, UV
Corresponding author: Dr. Iván Quijano, revmforense@uv.mx

SUMMARY

Introduction: *Helicobacter pylori has recently been associated with the etiology of acute gastritis, chronic gastritis, peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and gastric lymphoma; traditional detection methods are invasive; therefore, it is important to evaluate non-invasive techniques for detection on accessible substrates such as serum and saliva.*
Methods: *Serum and saliva samples were collected from a population of 65 individuals aged 18-31 years, 71% female; the samples were analyzed by the IBL International ELISA kit; results were compared for sensitivity and specificity determinations.*
Results: *The results of the first 22 samples of serum and saliva were positive for both biological matrices, giving us a statistically significant association. When evaluating the results of the last 43 samples of serum and saliva we found some variability, without statistical significance.*
Conclusion: *The IgG ELISA kit is a sensitive method; taking into account the advantages for obtaining the samples of saliva and serum, this method can be considered as an aid for the non-invasive detection of H. pylori.*

Keywords: *Helicobacter pylori, saliva, ELISA.*

INTRODUCCIÓN

Helicobacter Pylori es una bacteria común que produce infecciones crónicas en humanos en distintas edades; y una vez que se establece, la infección persiste durante toda la vida, aunque también se ha descrito su eliminación natural (Marshall, 1988). El modo de transmisión más común en todos los países puede ser de persona a persona por transmisión oral-oral y oral fecal porque se ha encontrado esta bacteria en muestra de deposiciones de sujetos afectados (Madinier, 1997), y que son condiciones que fortalecen la aparición de este microorganismo. También se consideran factores de riesgo los antecedentes familiares y el género (Kabris, 2004: Boshian, 2012).

En el año 2005, Robin Warren y Barry Marshall fueron distinguidos con el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento del Helicobacter pylori (Torres, 2007), considerado como el avance más significativo en las enfermedades gastroduodenales del siglo XX (Ernst, 2006; Rico, 2006). En la historia de los premios Nobel, es la tercera ocasión que este galardón se concede por el descubrimiento de una bacteria (Mégraud, 2007).

La prevalencia de la infección por H. pylori en una comunidad depende de tres factores: la tasa de adquisición de la infección, la tasa de desaparición, y la persistencia tras el contagio (Buckley, 1998). En México, como país en desarrollo, también se adquiere desde la infancia, alcanzando cifras de 80 % en la población joven con edades de 18 a 20 años, y de que la seropositividad aumenta un 5 % cada año de los primeros 10 años de vida (Torres, 1998). La frecuencia de seropositividad depende de la población estudiada, oscilando entre el 40-60% dependiendo del estudio realizado

(Lagunés, 2001; Constanza, 2004; Rodríguez, 2006).

El Helicobacter Pylori es un bacilo gramnegativo, curvado y microaerofílico que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano. Tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales. Esta forma se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a situaciones no favorables para su crecimiento adoptando forma cocoide. (Allen, 2008). Presenta un tamaño de 0,5 a 1,0 micras de ancho y de 3 micras de largo. Tiene de 2 a 6 flagelos monopolares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación del medio ácido (Amieva, 2008).

Uno de los retos de la investigación de H. pylori es la identificación de los factores de virulencia predictivos de la progresión de la infección. Se han propuesto varios factores de virulencia como cagA, vacA y babA, entre otros. Aunque se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT (Beswick, 2006), ninguno de ellos implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto. Esta asociación aumenta cuantos más factores de virulencia acumula una bacteria (Wen, 2009).

La colonización de la bacteria en la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de dos años o décadas desarrollar una ulcera péptica (duodenal o gástrica) o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución de un cáncer gástrico, o bien desarrollarse el linfoma gástrico tipo MALT (Alvarado, 2007; Van Amsterdam, 2006). Esta bacteria es el principal factor etiológico para el desarrollo de la gastritis crónica, la úlcera péptica y el adenocarcinoma gástrico y se estima que infecta a casi la mitad de la población mundial (Go, 2002; Graham, 1998).

Existen dos patrones de gastritis bien diferenciados (Monés, 2005). El más común es un infiltrado inflamatorio de predominio antral (gastritis crónica superficial no atrófica), localizado en la proximidad del epitelio de superficie, que cursa en la mayoría de los casos de forma asintomática y se asocia a la úlcera duodenal. El segundo patrón es la extensión difusa o multifocal de la inflamación hacia el cuerpo y el fórnix gástricos, con destrucción de las glándulas (gastritis crónica atrófica). Los mecanismos implicados en la evolución hacia uno u otro tipo se desconocen, posiblemente participen factores bacterianos, ambientales y del hospedador (Quintero, 2004).

Actualmente se sabe que la gastritis causada por H. pylori puede progresar en algunos casos hacia la atrofia, con destrucción del epitelio glandular y su sustitución por fibrosis y por un epitelio de tipo intestinal; uno de los factores de virulencia del microrganismo más estudiados es la proteína CagA, que se ha asociado con un riesgo elevado de aparición de AG en estudios efectuados en países occidentales (Asaka, 1997; Houghton, 2005). Adicionalmente, H. pylori puede causar diversas alteraciones de la fisiología celular que contribuyen a la

malignización, tales como la activación de receptores de factores de crecimiento, la estimulación de la angiogénesis, la inducción de mecanismos de evasión de la apoptosis o la facilitación de la pérdida del contacto intercelular (Malfertheiner, 2005). Algunas evidencias han permitido demostrar la estrecha relación entre la infección por H. pylori y este tipo de linfomas. Estudios epidemiológicos (Wotherspoon, 1991; Edit, 1994; Doglioni, 2002) han mostrado que la infección puede encontrarse entre el 90-100% de los afectados por un linfoma gástrico.

Estudios han tratado de determinar la prevalencia de infección por H. pylori en odontólogos de países en vías de desarrollo con mayores tasas de infección comparados con la comunidad local por estar expuestos a secreciones gástricas y a la saliva (Medina, 2005; Camargo, 2012).

Métodos de detección de Helicobacter pylori

No existe un único método específico para diagnosticar a los pacientes infectados por H. pylori, sin embargo; es importante a la hora de elegir el método de detección emplear la estrategia más adecuada para cada paciente. La elección de la técnica apropiada para diagnosticar la infección por H. pylori depende de varios factores, como son: la sensibilidad y especificidad de la técnica, el costo y disponibilidad de la misma.

En la actualidad contamos con dos grupos de pruebas que se emplean en el reconocimiento de esta bacteria: el grupo invasivo o directo (Bermejo, 2000; Gisbert, 2000; Pajares, 2002) y el no invasivo o indirecto en el que se sitúan las pruebas serológicas. Entre los métodos invasivos, que requieren la participación de estudios endoscópicos, se encuentran la técnica de la ureasa (Fawcett, 2004), el estudio histológico (Raica, 1996; Trakarnvanich, 2007) el cultivo bacteriano (Lee, 1997; Chromvarin, 2006), la detección por técnica de reacción de la polimerasa (Clayton, 1991; Lu, 1999; Lottspeich, 2007).

Por medio de las técnicas no invasivas se reconoce la respuesta inmune humoral del organismo frente a la infección por Helicobacter pylori con la participación de los linfocitos B presentes en el infiltrado inflamatorio y en los folículos linfoides (Sabbi, 2005). Estas células producen anticuerpos específicos (inmunoglobulinas A, G, M, y E) frente a los antígenos de esta bacteria que se pueden detectar mediante prueba de ELISA (análisis de enzima ligada).

La técnica de ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada.

En algunos estudios se han evaluado la saliva y la placa dental como posibles muestras no invasivas para el diagnóstico de *H. pylori* empleando diversas técnicas (Kignel, 2005; Nauntoffte, 2006; Hoffman, 2001). Se ha descrito la detección de anticuerpos anti-H. pylori en saliva, una prueba de fácil realización, que sería útil sobre todo en niños, obteniéndose en general con los

diferentes preparados comercializados unas cifras bajas de sensibilidad y especificidad, lo que limita su empleo. Sin embargo, también se han descrito buenos resultados, por lo que quizás un perfeccionamiento futuro la convierta en una técnica útil (Vaira, 1999; Sonmezoglu, 2005). El interés en la saliva como un medio de diagnóstico se ha incrementado considerablemente durante la última década. La saliva, como otros fluidos orales, ha demostrado ser un reflejo completo de los estados normales o de enfermedad del organismo incluyendo niveles de moléculas propias en tejidos, estado hormonal, inmunológico, neurológico, nutricional, concentraciones de moléculas del metabolismo y de sustancias introducidas en el organismo con fines terapéuticos o sustancias de abuso (Li, 2005; Tenuovo, 1997).

Entre las ventajas del empleo de saliva en comparación con otras muestras biológicas podemos mencionar que: la toma de ésta es fácil y no invasiva, los materiales que se requieren para su recolección tienen costo accesible y en general no son materiales muy complejos para su uso, no se requiere de personal altamente capacitado y el trasporte y almacenaje son sencillos. Sin embargo, una de las mayores desventajas que tiene el empleo de saliva es la detección cuantitativa de los analitos de interés, ya que generalmente se encuentran presentes en concentraciones menores que en otros líquidos biológicos como el suero (Hoffman, 2001). Por fortuna, el desarrollo de nuevas tecnologías con alta sensibilidad permite realizar detecciones y cuantificaciones del analito de interés aún en concentraciones bajas como las encontradas en saliva, por lo que la muestra biológica no es, hoy en día, una limitación (Christodoulides, 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y comparativo, realizado en una muestra de 65 alumnos inscritos a la Facultad de Odontología de la Universidad Veracruzana; excluimos aquellos que hayan estado tomando en las últimas 2 semanas medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), bismuto, antibióticos, inhibidores de la bomba de protones y corticoesteroides.

La primera fase comprende un estudio de diagnóstico en suero. En la segunda fase se comparó la efectividad diagnóstica de la saliva con el kit utilizado en la fase de diagnóstico. En la tercera fase se analizó la prevalencia de la bacteria en la población y se comparara con los datos obtenidos en el estudio con saliva.

Se obtuvieron 5ml de sangre y 10ml de saliva por paciente en un horario de 08:00 am a 10.00 am. Las muestras de suero se mantuvieron a 4-8°C, se centrifugaron para obtener el suero y se mantuvieron a -20°C hasta el momento del análisis. Las muestras de saliva fueron colocadas en recipientes estériles y almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

Las muestras séricas fueron analizadas por medio de la técnica de ELISA, siguiendo las indicaciones del Kit de la marca IBL International. Cada kit permite realizar 96 determinaciones. Los resultados se interpretaron de forma objetiva mediante espectrofotometría de longitud de onda simple (450 nm). En el caso de las muestras de saliva, se siguieron las indicaciones del fabricante,

con algunas modificaciones, como la cantidad de analito utilizada (100 microlitros)

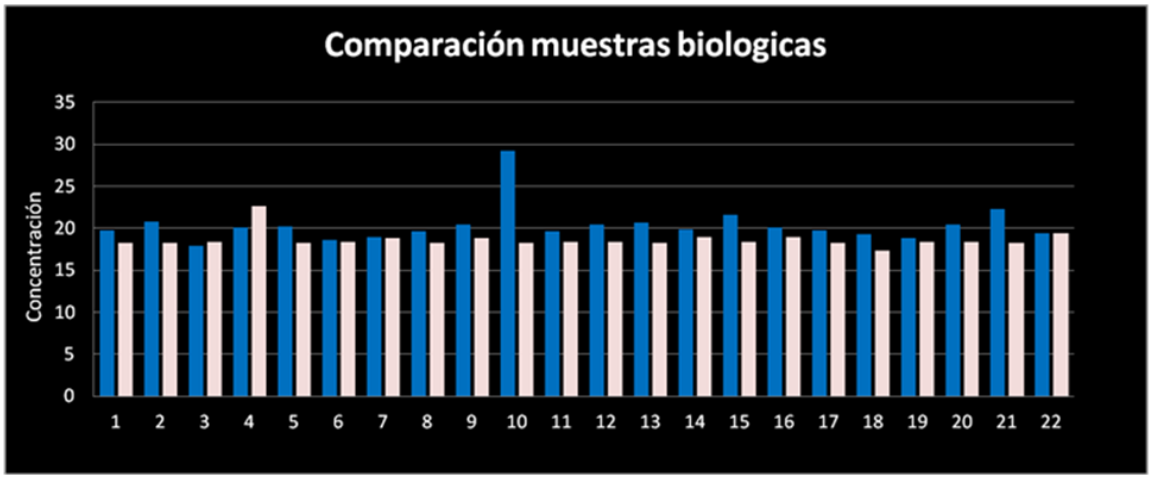
Para el análisis estadístico de la información se diseñó un formulario electrónico en Microsoft Excel para la recolección de datos; en función del tipo de variables, se emplearon tablas y gráficos para su representación.

RESULTADOS

De la muestra incluida (n=65), 71% correspondieron al sexo femenino y 29% al sexo masculino. La edad de la población analizada osciló entre los 18 y 31 años, aunque el 66% de la población tenían entre 18 y 19 años (Gráfica 1).

Gráfica 1. Edad de la población estudiada

Al observar los resultados de las primeras 22 muestras de suero y saliva, podemos observar que la mayoría de los casos resultaron positivos para ambas matrices biológicas (Gráfica 2), dándonos una asociación estadísticamente significativa (Tabla 1).

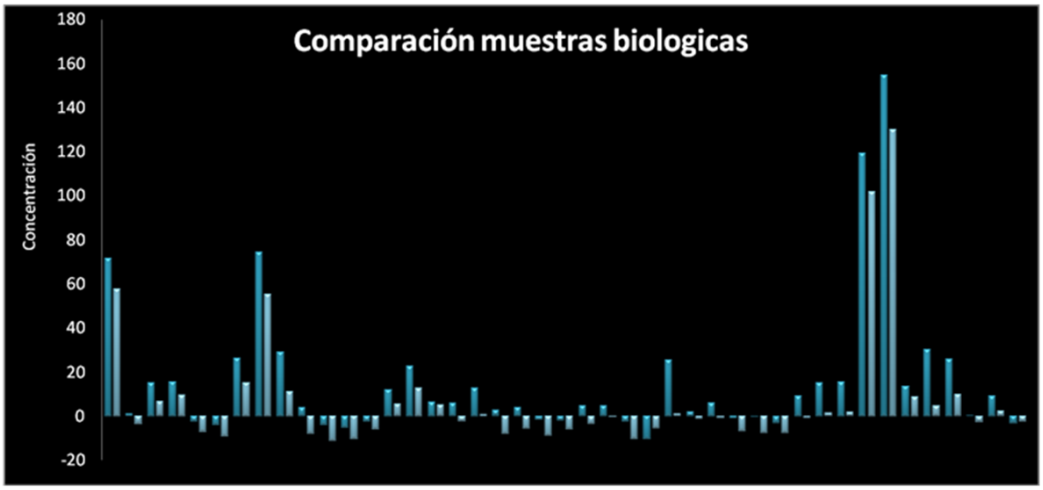


Grafica 2. Patrón de positividad de las matrices estudiadas

Suero		Saliva	
Concentración	Diagnostico	Concentración	Diagnostico
19.81	POSITIVO	18.2	POSITIVO
20.85	POSITIVO	18.2	POSITIVO
17.87	POSITIVO	18.43	POSITIVO
20.1	POSITIVO	22.66	POSITIVO
20.23	POSITIVO	18.26	POSITIVO
18.62	POSITIVO	18.33	POSITIVO
19	POSITIVO	18.84	POSITIVO
19.7	POSITIVO	18.31	POSITIVO
20.47	POSITIVO	18.79	POSITIVO
29.22	POSITIVO	18.26	POSITIVO
19.6	POSITIVO	18.36	POSITIVO
20.5	POSITIVO	18.33	POSITIVO
20.73	POSITIVO	18.31	POSITIVO
19.89	POSITIVO	18.92	POSITIVO
21.56	POSITIVO	18.34	POSITIVO
20.08	POSITIVO	18.9	POSITIVO
19.81	POSITIVO	18.26	POSITIVO
19.33	POSITIVO	17.38	POSITIVO
18.89	POSITIVO	18.38	POSITIVO
20.43	POSITIVO	18.33	POSITIVO
22.29	POSITIVO	18.28	POSITIVO
19.37	POSITIVO	19.36	POSITIVO

Tabla 1. Resultados obtenidos en las primeras muestras estudiadas

Al valorar los resultados de las ultimas 43 muestras de suero y saliva (Gráfica 3), podemos observar que existe una leve variabilidad (Tabla 2).



Gráfica 3. Comparativo de las 43 muestras de suero y saliva

Suero		Saliva	
Concentración	Diagnostico	Concentración	Diagnostico
71.66	POSITIVO	57.57838	POSITIVO
0.98	NEGATIVO	-3.842297	NEGATIVO
14.8	POSITIVO	6.475819	NEGATIVO
15.56	POSITIVO	9.403933	GRIS
-2.56	NEGATIVO	-7.118996	NEGATIVO
-4.07	NEGATIVO	-9.140789	NEGATIVO
26.28	POSITIVO	14.911576	POSITIVO
74.15	POSITIVO	55.347436	POSITIVO
28.85	POSITIVO	10.937707	POSITIVO
3.78	NEGATIVO	-7.9556	NEGATIVO
-4.07	NEGATIVO	-11.371733	NEGATIVO
-5.35	NEGATIVO	-10.535129	NEGATIVO
-2.71	NEGATIVO	-6.142958	NEGATIVO
11.7	GRIS	5.29063	NEGATIVO
22.5	POSITIVO	12.541198	POSITIVO
6.42	NEGATIVO	5.011762	NEGATIVO
5.89	NEGATIVO	-2.517674	NEGATIVO
12.54	POSITIVO	0.828742	NEGATIVO
2.57	NEGATIVO	-8.164751	NEGATIVO
4	NEGATIVO	-5.724656	NEGATIVO
-1.73	NEGATIVO	-9.001355	NEGATIVO
-2.1	NEGATIVO	-6.142958	NEGATIVO
4.76	NEGATIVO	-3.633146	NEGATIVO
4.61	NEGATIVO	-0.635315	NEGATIVO
-2.71	NEGATIVO	-10.465412	NEGATIVO
-10.64	NEGATIVO	-5.515505	NEGATIVO
25.37	POSITIVO	0.898459	NEGATIVO
1.89	NEGATIVO	-1.262768	NEGATIVO
5.97	NEGATIVO	-0.774749	NEGATIVO
-1.12	NEGATIVO	-6.770411	NEGATIVO
-0.29	NEGATIVO	-7.885883	NEGATIVO
-3.16	NEGATIVO	-7.607015	NEGATIVO
9.06	GRIS	-0.844466	NEGATIVO
15.1	POSITIVO	1.386478	NEGATIVO
15.4	POSITIVO	1.665346	NEGATIVO
119.3	POSITIVO	101.639524	POSITIVO
154.79	POSITIVO	130.08406	POSITIVO
13.21	POSITIVO	8.637046	POSITIVO
30.28	POSITIVO	4.523743	NEGATIVO
25.75	POSITIVO	9.613084	POSITIVO
0.08	NEGATIVO	-2.726825	NEGATIVO
8.91	GRIS	2.432233	NEGATIVO

Tabla 2. Comparativo de las 43 muestras de suero y saliva

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria común que produce infecciones cónicas en humanos en distintas edades; y una vez se establece, la infección persiste durante toda la vida, aunque también se ha descrito su eliminación natural. Para el diagnóstico de este microorganismo existen diferentes métodos invasivos y no invasivos y la importancia radica en conocer más sobre estos últimos donde no se presenta contacto directo con la mucosa y pueden ser menos dolorosos para todo tipo de pacientes e igual de útil.

Para el diagnóstico de la infección, la mayoría de los autores han empleado la serología, principalmente la técnica de ELISA. Es una técnica cuyas principales ventajas son su bajo costo y complejidad, presentando como inconvenientes que la sensibilidad y especificidad varían en función de diferentes factores como el punto de corte empleado, los antígenos del preparado, las diluciones del suero empleado y el método considerado de referencia. Es por tanto una prueba que precisa de su validación local, lo que generalmente no se ha hecho, y que por otra parte tiene la desventaja de que un resultado positivo, puede indicar infección activa o pasada. La validación local es un aspecto de suma importancia, pues algunos han mostrado que en ancianos se produce un descenso de la sensibilidad y especificidad, mientras que otros han encontrado lo contrario, de forma que podrían necesitarse diferentes puntos de corte según la edad para obtener una mayor eficacia de la prueba.

Hay varios equipos comerciales para la detección de H. pylori mediante serología con una precisión variable en relación a la técnica del análisis y la preparación de los anticuerpos usados. En este estudio, mediante enzimoinmunoanalisis para detectar IgG en saliva y comparándolo con suero, se observó una alta sensibilidad, pero baja especificidad.

Es por eso que hay factores que debe de tenerse en cuenta para una detección salivar razonable y precisa de H. pylori, tales como el tipo de kit para ser utilizado, fuente de antígenos, y la complejidad de los protocolos de ensayo.

En el caso de las muestras analizadas, los resultados mostraron que existe una relación en la primera parte de la muestra evaluada, ya que los resultados son muy parecidos entre ellos, dando concentraciones casi iguales, sin embargo, el caso de la segunda parte evaluada, existen varias diferencias, ya que de las 43 muestras biológicas comparadas 8 (18.6%) de ellas dieron resultados diferentes, 5 resultaron estar la zona gris y las restante 4 tuvieron resultados muy diferentes entre ellas, lo cual puede deberse a varios factores durante el procedimiento, por ejemplo, que en los pocillos no se les coloco los insumos suficientes y el anclaje entre antígeno anticuerpo no se llevó a cabo correctamente.

Por otra parte, también pudimos corroborar que efectivamente se puede utilizar la saliva como una muestra biológica en el análisis de ELISA para H.pylori, aunque se observó que existen variaciones entre las concentraciones de suero y saliva en los resultados cuantitativos; en los resultados

cualitativos se obtuvieron los mismos diagnósticos que en la muestra biológica de suero.

Se ha sugerido que las pruebas serológicas para H. pylori debe validarse localmente debido a que ensayos validados en una región pueden producir diagnósticos variables comparados con otros. Es por eso que antes de implementar una prueba en una población se realice un estudio previo para la validación, en este caso de un kit comercial, ya que puede haber variantes a la hora de ser utilizado. El kit comercial (IgG ELISA) de IBL INTERNATIONAL para suero y utilizado en muestras de saliva nos arrojó que es moderadamente preciso para la detección de H. pylori. Los resultados muestran que el kit IgG ELISA es un método sensible, y teniendo en cuenta las ventajas para la obtención de las muestras de saliva ante el suero, se puede considerar como una ayuda para el diagnóstico de la bacteria.

REFERENCIAS

1. Arbelaez P, Maire M, Fowlkes C (2009). *From Contours to Regions: An Empirical Evaluation*. In CVPR.

2. Alvarado J, Otero W, Archiva P (2007). Gastroenterologia y hepatología. Celsus, 533-539.

3. Amieva MR, El-Omar EM, (2008). Host bacterial interactions infection. Gastroenterology, 134: 306 – 23.

4. Asaka M, Takeda H, Sugiyama T (1997). What role does Helicobacter pylori play in gastric cancer? Gastroenterology; 113 (6); S56-S60.

5. Bermejo F, Boixeda D, Gisbert P (2000). Eficacia de cuatro técnicas de amplio uso para el diagnóstico de la infección por Helicobacter pylori en la enfermedad ulcerosa gástrica. Rev Clin Esp; 20 (9): 475-479.

6. Bermúdez L, Torres L, Rodríguez B (2009). Techniques used for the *Helicobacter pylori* infection detection. Journal Revista Cubana de Medicina, 48: 1.

7. Boschian, CP (2012). Helicobacter pylori: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. Anales venezolanos de nutricion-Scielo, 25 (2).

8. Blaser, MJ (1992). Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. Gastronterology 102:720-727.

9. Buckley, MJ, O´Shea J, Grace A (1998). A community-based study of the epidemiology of Helicobacter pylori infection and associated asymptomatic gastroduodenal pathology. Eur J Gastroenterol Hepatol; 10 (5): 375-379.

10. Cárdenas VM, Domínguez DC, Puentes FA (2008). Evaluation of a novel stool native catalase antigen test for Helicobacter pylori infection in asymptomatic North American children. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 46:399-402.

11. Camargo CP, Boschian ET (2012). Helicobacter pylori: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. Anales Venezolanos de Nutrición Scielo , 25 (2), 85.

12. Cavalier T (2002). The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. Int J Syst Evol Microbiol, 52: 7 – 76.

13. Chomvarin C, Kulsantiwong P, Chantarasuk Y (2006). Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsies. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 37:1163-1169.

14. Constanza CM, Lazcano PE, Torres J (2004). Determinants of Helicobacter pylori seroprevalence in Mexican adolescents Helicobacter; 9: 106 – 14.

15. Cover, TL (1997). Commentary: Helicobacter pylori transmission, host factors, and bacterial factors. Gastroenterology; 113 (suppl 1): S29-S30.

16. Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S, (1991). Detection and identification of Helicobacter pylori by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol, 44:515-516.

17. Dowsett SA, Archiva L, Segret VA (1999). Helicobacter Pylori infection in indigenous families of Centra America: Serastatus and Oral Finger nail Carriage.J. Clin Microbiol, 37: 2456-2460.

18. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE (2006). The translation of Helicobacter pylori basic research to patient care. Gastroenterology; 130 (1): 188-206.

19. Fawcett PT, Vinette KM, Gibney KM (2004). Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing H. pylori infection in pediatric patients. BMC Microbiol, 4:5-10.

20. Feu F (1998). Helicobacter pylori y linfoma gástrico tipo MALT: ¿erradicar la infección es suficiente? Gastroenterol Hepatol; 21 (supl 1): 40-44.

21. Forné M (2001). Úlcera duodenal y Helicobacter pylori. En: Boixeda de Miquel, D., Martín de Argila, C., editores. Infección por Helicobacter pylori ¿más allá del límite?. Vol 1. 2ª ed. Barcelona: Prous Science; p. 177-192.

22. Gisbert JP, Boixeda D, Martín C (1995). Infección por Helicobacterpylori y úlcera péptica. Gastroenterol Hepatol; 18 (supl 2): 44-52.

23. Gisbert JP (2000). Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por Helicobacter pylori. Gastroenterol Hepatol; 23: 135-143.

24. Gisbert JP (2005a). Prevención de la recidiva hemorrágica por úlcera péptica mediante la erradicación de Helicobacter pylori. Gastroenterol Hepatol; 28 (9): 567-575.

25. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. and *Helicobacter mustelae* com. Noc., respectively. Ins Syst Bacteriol, 39: 397.

26. Go MF (2002). Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther, 16 (Suppl 1):3-15.

27. Graham DY, Smith JL, (1988). Gastroduodenal complications of chronic NSAID therapy. Am J Gastroenterol, 83: 1081-1084.

28. Gutiérrez B, Vidal T, Valmaña CE (2005). Helicobacter pylori infection in Havana, Cuba. Prevalence and

cagA status of the strains. VacciMonitor, 2:15-19.

29. Hoang TT, Bengtsson C, Phung DC (2005). Seroprevalence of Helicobacter pylori infection in urban and rural Vietnam. Clin Diagn Lab Immunol; 12 (1): 81-85.

30. Hofman LF (2001). Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr;131:1621S-25S.

31. Houghton J, Stoicov C, Nomura S (2004). Gastric cancer originating from bone marrow derived cells. Science; 306: 1568-1571.

32. Houghton J, Wang TC (2005). Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-asociated epithelial cancers. Gastroenterology; 128 (6):1567-1578.

33. Isaacson PG, Wright DH (1983). Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer; 52: 1410-1416.

34. Kignel S, de Almeida P, André EA (2005). Occurrence of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. Oral Dis, 11:17-21.

35. Krabis S (2004). Detection of Helicobacter pylori DNA in feces and saliva by Polimerase chain reaction: a review, 9:115-23.

36. Lagunes YB (2001).Prevalencia de Helicobacter pylori en niños en edad escolar Rev Mex Patol Clin; 48: 23 – 26.

37. Lee SG, Kim C, Chul HY (1997). Successful cultivation of a potential pathogenic coccoid organim with trophism for gastric mucin. Infect

38. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K (2007). Evaluation of the Novel H. pylori ClariRes Real-Time PCR Assay for Detection and Clarithromycin Susceptibility Testing of Helicobacter pylori in Stool Specimens from Symptomatic Children. J Clin Microbiol, 45(6):1718-22.

39. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY (1999). Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol, 37:772-4.

40. Madinier IM, Fosse TM, Monteil RA (1997). Oral carriage of Helicobacter pylori a review. Journal of Periodontology, 68(1):2-6.

41. Malfertheiner P, Megraud F, O´Morain C. The European Helicobacter Pylori Study Group (2002). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection-The Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther; 16 (2): 167-180.

42. Malfertheiner P, Sipponen P, Nauman M (2005). H. pylori erradication has the potencial to prevent gastric cancer: a State-of-the-Art Critique. Am J Gastroenterol; 100 (9): 2100-2114.

43. Malfertheiner P, Megraud F, O´Morain C (2007). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection-The Maastricht III-2000 Consensus Report. Gut online: 17-01 (10.1136/gut.2006.101634).

44. Manson JD, Eley BM (1993). O meio bucal na saude e na doenca. En: Manual de Periodontia. Sao Paulo, 165.

45. Marshall B, Goodwin C (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Inf J Syst Bacteriol, 37: 68.

46. Marshall B, Warren R (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, 16:1311-1315.

47. Martín C, Boixeda D (2001). Consideraciones prácticas para el diagnóstico de la infección por Helicobacter pylori. Med Clin; 117: 386-391.

48. Martín C, Boixeda D (2004). Helicobacter pylori y enfermedades relacionadas. Epidemiología y factores de riesgo. GH continuada; 3 (6): 251-255.

49. Medina M, Gorodner L (2005). Evaluación del riesgo de infección por Helicobacter pylori en la práctica odontológica. Universidad del Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, M-018.

50. Mégraud F (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Clin Gastroenterology, 9: 507 – 18.

51. Megraud F, Lehours P (2007). Helicobacter pylori Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clin Microbiol Rev, 20:280-322.

52. Mohar A, Ley C, Guarner J (2002). Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociado a Helicobacter pylori y respuesta al tratamiento en Chiapas, México Gac Med Mex; 138: 405 – 10.

53. Monés J, Gisbert JP, Borda, F (2005). Indicaciones, métodos diagnósticos y tratamiento erradicador de Helicobacter pylori. Recomendaciones de la II Conferencia Española de Consenso. Rev Esp Enferm Dig; 97 (5): 348-374.

54. Montalbán C, Santon A, Redondo C (2005). Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with H. pylori eradication. Lack of association with translocation t (11;18): a 10 year updated follow-up of a prospective study. Ann Oncology; 16 (9): 1539-1544.

55. Nauntofte B, Tenevuo JO, Lagerlöf F (2003). Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. Dental Caries. The disease and its clinical management. Oxford. Blackwell Munksgard; p. 7-29.

56. Pajares JM (2002). Infección por Helicobacter pylori. Rev Clin Esp; 202 (2): 99-110.

57. Palli D, Masala G, Plebani M (2007). CagA+ Helicobacter pylori infection and gastric cancer risk in the EPICEURGAST study. Int J Cancer; 120 (4): 859-867.

58. Quintero E, Menacho M (2004). Helicobacter pylori y enfermedades relacionadas. Relación con la gastritis y la úlcera péptica. GH continuada; 3 (6): 20-24.

59. Raica M, Grigoras AM, Miutescu GE (1996). Clinical value of Helicobacter pylori identification by histochemical methods in patients with chronic gastritis. Rom J Morphol Embryol, 42:117-21.

60. Rico J (2006). El Nobel de Medicina 2005 a Warren y Marshall,

descubridores de Helicobacter pylori. Investig Clín; 9 (1): 78-80.

61. Rodríguez CR, Alcántara LJJ, Lagunes YB (2006). Prevalencia del Helicobacter pylori en tres poblaciones de niños, de la ciudad de Puebla, México, y sus factores de riesgo Rev Gastroenterol Mex; 71 (4): 440 – 5.

62. Sabbi T, De Angelis P, Colistro F (2005). Efficacy of noninvasive tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection in pediatric patients. Arch Pediatr Adolesc Med, 159:238-41.

63. Sáinz S (1995). Infección por Helicobacter pylori y cáncer gástrico. Gastroenterol Hepatol; 18 (supl 2): 53-57.

64. Sainz R, Borda F, Domínguez E (1999). Conferencia española de consenso sobre la infección por Helicobacter pylori. Rev Esp Enf Dig; 91 (11): 777-784.

65. Sahay P, Axon AT (1996). Reservoirs of Helicobacter pylori and modes of transmission. Helicobacter; 1 (3): 175-182.

66. Sierra F (2013). Tratamiento ideal del Helicobacter pylori: una revisión sistemática. Revista de Gastroenterología de México Elsevie, 22.

67. Smoot DT (1997). How does Helicobacter pylori cause mucosal damage? Direct mechanisms. Gastroenterology; 113 (6); S31-S34.

68. Sonmezoglu M, Baysal B, Ergen A (2005). Detection and evaluation of salivary antibodies to Helicobacter pylori in dyspeptic patients. Int J Clin Pract; 59: 433-436.

69. Stolte M, Morgner A, Alpen A (2000). Evaluation of the long-term outcome of Helicobacter pylorirelated gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. En: Hunt, R.H., Tytgat, G.N.J., editores. p. 541-548.

70. Tenovuo JO (1997). Salivary parameters of relevance for assesSing caries activity in individuals and populations. Comm Dent Oral Epidemiol, 25:82-6.

71. Thiede C, Morgner A, Alpen B (1997). What role does Helicobacter pylori eradication play in gastric MALT and gastric MALT lymphoma? Gastroenterology; 113 (6): S61-64.

72. Torres F (2007). El Ejercicio Actual de la Medicina. seminario el ejercicio actual de la medicina del Helicobacter pylori. España.

73. Torres J, Leal HY, Pérez-Pérez. (1998). A community-based sero epidemiological study of Helicobacter pylori infection in México J Infect Dis; 178: 1089 94.

74. Trakarnvanich V (2007). Methylene blue staining of gastric tissue for the identification of Helicobacter pylori. South Asian J Trop Med Public Health, 38:78-81.

75. Vaira D, Holton J, Menegatti M (1999). New immunological assays for the diagnosis of Helicobacter pylori infection. Gut; 45 (suppl 1): I23-I27.

76. Van Amsterdam K, van Vliet AH (2006). *Of microbe and man: determinants of Helicobacter pylori-related diseases.* FEMS Microbiol Rev; 30 (1): 131-156.

77. Warren JR, Marshall B (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium inactive chronic gastritis. Lancet, 1273 – 75.

78. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR (1991). Helicobacter pylori associated gastritis and primary B-cell lymphoma. The Lancet; 338: 1175-1176.