

HELICOBACTER PYLORI: AVANCES EN INMUNOGENÉTICA Y METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS

HELICOBACTER PYLORI: ADVANCES IN IMMUNOGENETICS AND DIAGNOSTIC METHODS

Marena Luz Rodríguez Ferrer*

RESUMEN

En 1982, Marshall y Warren descubrieron una bacteria que sobrevive en medio ácido y coloniza la mucosa gástrica, llamada *Helicobacter pylori*, presente en pacientes con gastritis y úlcera péptica; su prevalencia en adultos de países occidentales está entre 20 y 40% y en países en vías de desarrollo en aproximadamente 80%. El conocimiento de sus características inmunológicas, metabólicas y patogénicas, ha facilitado avanzar en el diagnóstico y prevención de enfermedades gastroduodenales relacionadas con ella. La infección se ha asociado con expresión de alelos específicos HLA-DR del tracto gastrointestinal humano, sugiriendo un papel en el desarrollo de gastritis crónica. Actualmente existen muchas pruebas para su detección, destacándose el test del aliento, por ser la más sensible y específica. El objetivo de esta revisión es el de evidenciar los conocimientos en la inmunogenética de la bacteria y los avances en las metodologías para su diagnóstico.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, Inmunogenética, Úlcera péptica.

ABSTRACT

In 1982, Marshall and Warren discovered a bacterium that survives in acid and colonizes gastric mucosa called *Helicobacter pylori*, which is present in patients with gastritis and peptic ulcer. Its prevalence in adults in western countries is between 20 and 40%, and in developing countries approximately 80%. Knowledge of immunological, metabolic and pathogenic characteristics has facilitated progress in the diagnosis and prevention of gastroduodenal diseases related with it. The infection has been associated with expression of specific alleles HLA-DR human gastrointestinal tract, suggesting a role in the development of chronic gastritis. Currently there are many tests for detection, highlighting the breath test, because the most sensitive and specific. The review aims to highlight the advances in immunogenetics and methods to diagnose this bacterium.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Immunogenetics, Peptic ulcer.

Recibido: Septiembre 22 de 2010

Aceptado: Mayo 12 de 2011

* Bacterióloga, Esp. en Biomedicina Molecular. Programa de Microbiología, Universidad Libre Seccional Barranquilla. marofe99@hotmail.com; mrodriguez@unilibrebaq.edu.co

INTRODUCCIÓN

Han pasado dos décadas desde que los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren en 1982, descubrieron una bacteria capaz de sobrevivir en un medio ácido y de colonizar la mucosa gástrica, inicialmente denominada *Campilobacter pylori* y conocida actualmente como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Ellos describieron la presencia de la infección por este microorganismo en pacientes con gastritis crónica y úlcera péptica, tanto duodenal como gástrica (1, 2). Desde entonces se han desarrollado numerosas investigaciones para conocer a este microorganismo de manera detallada, sus características inmunológicas y metabólicas, su patogenicidad, su interrelación con la mucosa gástrica, su microambiente, su mecanismo de transmisión, infección y reinfección. En los últimos 13 años se han publicado más de 6.000 trabajos sobre *H. pylori* (3), dato que expresa claramente el enorme interés que este microorganismo ha despertado en la comunidad científica mundial. El descubrimiento de la bacteria, ha implicado cambios conceptuales profundos y de gran impacto en los aspectos inmunogenéticos, en la evaluación diagnóstica y terapéutica de las enfermedades gastroduodenales. Actualmente ha sido aceptado el rol patogénico del *H. pylori* en la generación de gastritis, úlcera gástrica y úlcera duodenal, así como la relación directa entre la erradicación de la bacteria y la ausencia de complicaciones y posteriores recurrencias. El presente artículo plantea la importancia de los avances en inmunogenética y métodos diagnósticos de la infección por *H. pylori*.

Aspectos epidemiológicos básicos

La infección por *H. pylori* es una de las enfermedades infecciosas crónicas más frecuentes en la actualidad, pudiendo afectar a cualquier estrato social, raza, sexo o grupo etario, aunque evidente-

mente con distinta frecuencia. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en los adultos de cualquier edad en los países occidentales desarrollados oscila entre el 20 y el 40% y alcanza cifras del 60 al 80% en los países del tercer Mundo (4, 5).

Actualmente sabemos que *H. pylori* es el agente etiológico del 90-95% de las úlceras duodenales, 70-80% de las úlceras gástricas y tiene un protagonismo relevante en el 60-70% de los casos de cáncer gástrico, que representa una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial (6).

Se ha determinado que más del 50% de la población mundial está infectada con la bacteria *H. pylori*, su prevalencia varía entre países y poblaciones de un mismo país y con el estatus socioeconómico de la población. Es muy alta en África, Asia y muchas partes de América Central y del Sur, mientras es relativamente baja en el norte y oeste de Europa, Norteamérica y Australia (7). Los países subdesarrollados poseen tasas de prevalencia más altas que los países desarrollados, lo cual se ha asociado con el bajo nivel económico-higiénico-sanitario, cloración del agua, preparación de los alimentos, hacinamiento; observación apoyada por la aparente transmisión fecal-oral y el rol del agua en la propagación de la bacteria.

La prevalencia en los adultos de mediana edad es del 80% en los países en vías de desarrollo, mientras que en los países desarrollados, oscila entre el 20 y 50% (8). Se observan cifras bajas de un 25% en países desarrollados como Francia (9), hasta otras superiores al 80% en países como Nigeria (10). Estas diferencias parecen deberse fundamentalmente a la incidencia durante la infancia, edad en la que se infecta la gran mayoría de niños en las regiones en vías de desarrollo. En los países avanzados la prevalencia es baja en las primeras décadas de la

vida, para ir aumentando progresivamente a partir de la cuarta y quinta décadas (11), circunstancia que puede deberse al efecto generacional que se produce en relación al progreso acontecido en los últimos años en dichos países.

En Colombia, un estudio en menores del departamento de Nariño mostró 55% de prevalencia de la infección a los dos años y 80% a los ocho años de edad (12). Bravo *et al.* (13) encontraron el 96% de seroprevalencia en un grupo de 18 a 24 años en donantes de sangre sanos, en otro estudio a partir de biopsias gástricas la prevalencia fue del 69,1%. Moncayo *et al.*, informaron 86% de prevalencia en pacientes con enfermedad úlcero-péptica en el departamento de Risaralda (14). La patología gástrica asociada con la infección por *H. pylori* es una causa frecuente de morbilidad en Colombia y su distribución muestra variaciones geográficas significativas.

Característica microbiológicas del *Helicobacter pylori*

El *H. pylori* es un bacilo gramnegativo, curvado, flagelado y microaerófilico, que está especialmente adaptado para sobrevivir en la luz gástrica, coloniza la mucosa estomacal humana a nivel del antro gástrico (15), esta bacteria ha sido reconocida como el factor etiológico más importante en el desarrollo de diversas afecciones gástricas como gastritis crónica, la enfermedad ácido péptica gastroduodenal y el cáncer gástrico. Las neoplasias gástricas asociadas con la infección por *H. pylori* son fundamentalmente el adenocarcinoma de tipo intestinal, el adenocarcinoma de tipo difuso y el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica, linfoma MALT (16).

Esta bacteria es capaz de producir determinadas enzimas que le sirven para sobrevivir y colonizar la mucosa gástrica. Entre las enzimas que produ-

ce cabe citar la ureasa, proteasa, lipasa, fosfolipasa entre otras, las cuales atacan la capa de moco y el epitelio gástrico. Tiene particular importancia, la actividad de la ureasa que al descomponer la urea, genera amonio y dióxido de carbono. El amonio crea un microclima de pH neutro que permite al microorganismo protegerse del ambiente bactericida del estómago y, además, favorece la descomposición de la capa de moco, facilitando así la retrodifusión de ácido y la ulterior colonización por *H. pylori* (17).

La colonización por *H. pylori* depende de varios factores relacionados con la virulencia del microorganismo, la diversidad de la bacteria *H. pylori*, la genética del huésped, las condicionantes ambientales, así, como el nivel socioeconómico y la duración de la infección (18).

Actualmente se cree que la infección producida por *H. pylori* se adquiere en edades tempranas de la vida. La vía de transmisión más aceptada es la de persona a persona (19), al menos en los países industrializados. Sin embargo, la vía fecal-oral parece ser la más probable en los países subdesarrollados y las comunidades con ambientes socio-sanitarios deficientes. Se sugiere la posibilidad de la vía oral-oral, porque se ha aislado *H. pylori* en la saliva y la placa dental, lo que hace posible que la cavidad oral sea un reservorio natural de la bacteria.

Asociación del *Helicobacter pylori* con expresión de antígenos de HLA clase II-DR, DQ en gastritis

Los antígenos de HLA clase II se encuentran principalmente, pero no exclusivamente en la membrana de los linfocitos B, son el producto de los genes HLA-DR, DQ y DP, y están localizados en la región HLA-D (20). Son familias extremadamente polimórficas de glicopéptidos, constituidos cada uno por dos cadenas, alfa y beta. En este grupo de antígenos

nos el HLA-DR es el más estudiado; algunas de estas glicoproteínas se asocian con ciertas enfermedades, de etiología posiblemente inmune.

Se ha sugerido que la incidencia de enfermedades digestivas asociadas con el *H. pylori* está influenciada por la diversidad de este microorganismo, por factores que involucran al huésped, las condiciones del ambiente y la duración de la infección. En cuanto a la genética del huésped, se ha comprobado que la respuesta inmunológica juega un papel fundamental en el desarrollo de dichas enfermedades, pues algunos de los mecanismos que desencadenan estas patologías implican directamente a las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

Son muchos los estudios científicos reportados en otros países acerca de la relación de las patologías gástricas causadas por *H. pylori* asociadas con la expresión epitelial de HLA-DR en el tracto gastrointestinal humano. Estos resultados sugieren que el *H. pylori* puede tener un papel en la expresión de los antígenos HLA clase II en la gastritis crónica, lo que apoyaría la teoría de que este microorganismo puede ser responsable en parte de la respuesta inflamatoria.

Azuma y col. (21) estudian las posibles diferencias genéticas entre pacientes ulcerosos *H. pylori* positivos o negativos, determinando los HLA-DQA. Encontrando que los *H. pylori* negativos presentan con mayor frecuencia el alelo DQA1*0102, en tanto que la presencia del alelo DQA1*0301 es significativamente mayor entre los *H. pylori* positivos.

En las poblaciones japonesa y caucásica se han relacionado algunas moléculas del CMH con la infección por *H. pylori*. El alelo HLA-DQA1*0102 tiene frecuencia baja en pacientes con infección por *H.*

pylori y gastritis atrófica, comparado con pacientes que tienen gastritis superficial, así como controles normales. Este hallazgo parece indicar que dicho alelo puede contribuir a la resistencia para la gastritis atrófica asociada con *H. pylori* y como consecuencia, al carcinoma gástrico. Su ausencia podría considerarse como un factor de riesgo genético específico para estas enfermedades (22). Así mismo, el alelo HLA-DQB1*0401 se ha encontrado como marcador de susceptibilidad para gastritis atrófica. Los autores han informado que el antígeno HLA-DQB1*0401 juega un papel importante en el desarrollo de gastritis atrófica y cáncer gástrico de pacientes infectados con *H. pylori*, ellos lo consideran un marcador genético útil para determinar la susceptibilidad a estas patologías (23). De igual manera en estudios realizados recientemente en México, se observó una frecuencia elevada del alelo HLA-DQB1*0501 en pacientes con cáncer gástrico. Este hallazgo sugiere fuertemente que el HLA-DQB1*0501 es un alelo relevante en la susceptibilidad de la población mexicana para desarrollar cáncer gástrico (24).

Pruebas diagnósticas para detección de infección por *Helicobacter pylori*

Las técnicas diagnósticas cada vez son más eficaces para detectar la infección por *H. pylori*, se pueden dividir en dos grupos: técnicas invasivas por biopsia endoscópica de la mucosa gástrica (prueba rápida de la ureasa, tinciones histológicas, cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa) y técnicas no invasivas (la prueba del aliento de urea, pruebas serológicas y detección de antígenos en heces fecales) (25).

La exploración endoscópica es el método más sensible y específico para el diagnóstico de infección por *H. pylori*. Esta técnica permite visualizar la mucosa gástrica, cuyo aspecto puede variar desde leve

eritema a una nodularidad intensa, característica de infección por *H. pylori*, mucho más frecuente en niños que en adultos, y además, hace posible la toma de muestras de biopsia para diferentes estudios. Las técnicas invasivas son muy útiles porque permiten detectar directamente la bacteria, son altamente específicas, pero su sensibilidad está muchas veces comprometida por la heterogénea distribución de la bacteria en el estómago, lo que conlleva a obtener falsos negativos (26).

La prueba rápida de la ureasa es una técnica cualitativa que determina la actividad de la enzima ureasa en una pequeña muestra de mucosa gástrica, dicha prueba es universalmente empleada para detectar la presencia de este microorganismo. Se realiza colocando la pieza de biopsia en un tubo con urea que además contiene un indicador de cambio de pH. Si la muestra presenta actividad ureásica, se hidroliza la urea y se forman iones de amonio, los cuales aumentan el pH de la solución, produciendo el cambio de color. La especificidad de esta prueba de la ureasa es alta. Por su sencillez, rapidez y bajo costo, se considera como una técnica de elección para el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* en aquellos pacientes que se someten a endoscopia (27). Sin embargo, la sensibilidad de la prueba se ve afectada en los pacientes que han recibido tratamiento con antibióticos.

La observación de microorganismos de forma espiral en cortes histológicos con diferentes tinciones es un método sencillo para diagnosticar la infección por *H. pylori*, así como para determinar la densidad de la colonización. Entre los métodos de tinción utilizados, unos son simples y fáciles de realizar y otros son más complejos. En la actualidad se emplean las tinciones con hematoxilina-eosina, la de Warthin-Starry con nitrato de plata y la tinción con azul de metileno (28), aunque esta última ha sido

sustituida por la tinción con Giemsa, probablemente una de las más populares, por ser fácil de realizar y económica y con buenos resultados en el diagnóstico.

El cultivo es considerado el “patrón de oro”, sin embargo a pesar de ser 100% específico, tiene una sensibilidad menor del 75 al 90%. El cultivo es realizado inoculando fragmentos de biopsia en placas de agar sangre sobre condiciones microaerofílicas, con antibióticos, para evitar el crecimiento de otros microorganismos; se cultiva a 37°C por cinco a siete días, lo cual permite la identificación de cepas y la realización del antibiograma, importante en pacientes que presentan falla terapéutica, y viven en países con alta resistencia a los antibióticos.

Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es posible detectar el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *H. pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas, saliva y placa dental como muestras, para lo cual se utilizan diferentes iniciadores de secuencias (primer o cebadores) para amplificar varios genes como: el gen *ureA* que codifica para la subunidad A de la enzima ureasa, el gen *glmM* que codifica para una fosfoglucosamina mutasa (29) y secuencias altamente conservadas del gen que codifica para el ácido ribonucleico de la subunidad 16S del ribosoma (ARNr 16S). De todos los genes, el gen *glmM* ha sido el más empleado para el diagnóstico de *H. pylori*, y se reportan muy buenos valores de sensibilidad y especificidad con su uso. La mayoría de los métodos basados en esta técnica tienen 100% de sensibilidad, también varios estudios sugieren que la PCR es tan válida como el cultivo para confirmar la erradicación del microorganismo y para detectar los fallos de las múltiples terapias empleadas en la erradicación de este patógeno, además permite investigar la secuencia específica del ADN de las cepas aisladas.

En la actualidad, el método más sensible y específico para el diagnóstico de infección es el test del aliento tras la toma oral de urea marcada con C13 o C14. Este test consiste en la ingestión de una suspensión de urea marcada con C13 o C14, ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento. La cantidad de CO₂ marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *H. pylori* (30). Esta prueba detecta cualitativamente infección activa con una sensibilidad y especificidad de más del 95% (31), también podría detectar infecciones agudas o muy recientes en las que todavía no se hubiera producido la seroconversión.

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos de clases IgG o IgA contra antígenos específicos de este microorganismo (32). Las técnicas más empleadas para la detección de anticuerpos son: detección de anticuerpos séricos tipo IgG, frente al *H. pylori* mediante el ensayo inmunoenzimático de enzima ligada (ELISA), poseen una alta sensibilidad, superior al 95%, aglutinación en látex, inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (*immunoblotting*) e inmunocromatografías (ICM), entre otras. Las pruebas serológicas para *H. pylori*, por su menor costo, la mayor accesibilidad y rapidez de interpretación son ampliamente utilizadas para realizar diagnóstico en pacientes, antes de iniciar el tratamiento. Presentan una sensibilidad y especificidad similar al test de la urea, pero la limitación principal de la serología es su incapacidad para distinguir entre la infección activa y una infección previa con *H. pylori*, ya que los niveles de anticuerpos persisten alrededor de seis meses en sangre y esto puede determinar la obtención de fal-

sos positivos. No obstante, es innegable su utilidad en estudios epidemiológicos de amplios grupos de población. Recientemente se ha conseguido detectar anticuerpos de *H. pylori* en muestras de orina mediante ELISA, con la misma fiabilidad que la serología, por lo que también resulta útil y más práctico para estudios poblacionales a gran escala (33).

Las pruebas de detección de antígenos de *H. pylori* en materia fecal representan una alternativa para el test de la urea con una sensibilidad del 89-98% y una especificidad mayor al 90%. Son apropiadas para realizar seguimiento, siempre que se realice con un intervalo de ocho semanas después de realizado el tratamiento (34).

CONCLUSIÓN

Hasta ahora no existe ninguna prueba que detecte la infección en el 100% de los casos. Para elegir la forma apropiada para diagnosticar la infección por *H. pylori* es importante considerar la sensibilidad y especificidad de la técnica, y disponibilidad en términos de costo-beneficio, finalidad de la prueba (investigación, diagnóstico o evaluación del tratamiento), circunstancias clínicas que pueden afectar el resultado, así como la estrategia que se vaya a seguir con los pacientes.

La investigación orientada a conocer los mecanismos patogénicos de las lesiones inflamatorias causadas por la infección por *H. pylori* en la mucosa gastroduodenal, ha contribuido a conocer mejor las reacciones inmunológicas de la mucosa digestiva colonizada por esta bacteria. Es importante seguir desarrollando proyectos de investigación con el objetivo de identificar marcadores genéticos, serológicos e histológicos que permitan identificar cuáles pacientes con la infección por *H. pylori* van

a desarrollar gastritis atrófica, úlcera péptica o cáncer gástrico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 1:1311-5.
2. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-5.
3. Hazell SL. Isolation of *Helicobacter heilmannii* from human tissue. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15:4-9.
4. González CM. Aspectos epidemiológicos de mayor relieve de la infección por *Helicobacter pylori*. En: González-Carbajal M. y cols. *Helicobacter pylori ¿El tercer dogma?* Madrid, España: Autores Productores Asociados, S.L. Capítulo. 2003: 83-112.
5. Rautelin H y Kosunen TU. *Helicobacter pylori* infection in Finland. *Ann Med*. 2004; 36(2):82-8.
6. Taylor DN, Blaser MJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*. 1991; 13:42-59.
7. Hill M. *Helicobacter pylori*: microbiology. *Eur Cancer Prev* 1996; 26:4-5.
8. Logan RPH, Walker MM. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Br Med J*. 2001; 232:920-2.
9. Megraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbourni A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*. 1989; 27:1870-3.
10. Holcombe C, Omotara BA, Eldridge J, Jones DM. *Helicobacter pylori*, the most common bacteria infection in Africa: A random serological study. *Am J Gastroenterol*. 1992; 87: 28-30.
11. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995; 9:33-9.
12. Goodman K, Correa P, Tenganá HJ et al. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes. A population-based study of transmission pathways. *Am J Epid*. 1996; 144: 290-9.
13. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Correa P, Ordóñez N. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. *Colomb Med*. 2000; 31:122-130.
14. Moncayo JI, Santacruz JJ, Montes ML, Franco B, López M, Meissel E, et al. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en pacientes con enfermedad úlcero-péptica. *Rev Med Ris* 2002; 8:4-10.
15. Velanovich V. The spectrum of *Helicobacter pylori* in upper gastrointestinal disease. *Am Surg*. 1996; 62:60-3.
16. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002; 347:1175-86.
17. McNulty CAM, Wyatt JI. *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*. 1999; 52:338-44.
18. Sleisenger, Fordtran, Feldman, Scharschmidt, Sleisenger. *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. 7ª ed, 2004. Editorial Médica Panamericana, Vol 2.
19. Thomas JE. Epidemiology of infection. *Curr Op Gastroenterol*. 1994; 10:7-11.
20. Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell R. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1991; 12: 443-6.
21. Azuma T, Konishi J, Ito Y, Hirai M, Tanaka Y, Ito S, et al. Genetic differences between duodenal ulcer patients who were positive or negative for *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol*. 1995; 21(Suppl. 1):151-4.

22. Azuma T, Ito, Sato F, Yamasaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M. The role of the DQA1 genes in resistance to atrophic, gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer*. 1998; 15:1013-8.
23. Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yosida H, Shinoda Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M. HLA DBQ locus and the development of atrophic gastric with *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol*, 1999; 34(Suppl 11):24-7.
24. Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and -DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma Tissue Antigens. 2002; 59(1):55-7.
25. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9:489-96.
26. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002; 16 (1):16-23.
27. Megraud F. Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. *J Pediatr*. 2005; 146:198-203.
28. Trakarnvanich V. Methylene blue staining of gastric tissue for the identification of *Helicobacter pylori*. *South Asian J Trop Med Public Health*. 2007; 38:78-81.
29. Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA, Barbezat GO. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: is it worth it? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50:1-5.
30. Martínez Gómez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML et al. Test del aliento con Urea-C13 en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Ann Esp Pediatr* 1995; 69: 56-7.
31. Van KN, Van HE, de Boer WA. Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies. *Neth J Med*. 2006; 64:329-33.
32. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9:489-96.
33. Megraud F. Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. *J Pediatr*. 2005; 146:198-203.
34. Kato S, Tachikawa T, Ozawa K, Konno M, Okuda M, Fujisawa T, et al. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter* infection in children. *Pediatrics*. 2001; 107(6):E87.