

Inmunoglobulina G Anti *Helicobacter Pylori* por ELISA y Western-blot en Pacientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia

Eugenia Ma. Quintana Guzmán, Karl Schosinsky Nevermann,* Henry Davidovich Rose,** Lizeth Taylor Castillo *** y María Laura Arias Echandi****

Justificación y Objetivo: En Costa Rica el cáncer gástrico es una de las malignidades más frecuentes y de la mayor mortalidad y otros estudios han encontrado asociación entre este y el *Helicobacter pylori*. Esta bacteria es capaz de producir sustancias que alteran la mucosa gástrica, antígenos que han sido reconocidos por medio del Western-blot. El propósito de este trabajo fue realizar, por primera vez en nuestro país, un estudio de anticuerpos IgG-anti *H. pylori* por medio de Western-blot y lograr identificar los tipos de antígenos contra los cuales se desarrolla la respuesta inmunológica. Para ello se utilizaron sueros y cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes costarricenses. Asimismo, se compararon los resultados obtenidos del Western-blot con una prueba de ELISA para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, utilizando como referencia el estudio histológico de biopsia gástrica.

Métodos: Se obtuvieron muestras de biopsia gástrica y suero de 83 pacientes referidos al Servicio de Gastroscopía del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia. A cada uno se le realizó estudio histológico de biopsia gástrica y de anticuerpos IgG-anti *H. pylori*, por los métodos de ELISA y Western-blot.

Resultados y Conclusiones: Por Western-blot se observaron bandas de proteínas de diferentes pesos moleculares, con un predominio de antígenos de *H. pylori* de bajo peso molecular. El Western-blot y el ELISA presentaron sensibilidades diagnósticas del 89% y el 88% y especificidades diagnósticas del 73% y el 71%, respectivamente, comparados con el estudio histológico.

Descriptores: *H. pylori*, IgG, ELISA, Western-blot, suero.

Introducción

La detección de *H. pylori* es fundamental por ser la causa más importante de gastritis crónica.^{1,2} Además es el factor etiológico más importante en la formación de úlcera duodenal^{5,7} y úlcera gástrica.^{3,8-10} Probablemente participa en la patogénesis del cáncer gástrico,¹¹⁻¹⁷ malignidad que causa la mayor mortalidad por cáncer en Costa Rica, por lo que el estudio de *H. pylori* es muy importante en nuestra población.¹⁸⁻¹⁹

Actualmente se ha demostrado que esta bacteria infecta la mitad de la población de los Estados Unidos.⁸ En Costa Rica se describió por primera vez en 1988 y se ha reportado su presencia en un 70% de los pacientes con gastritis, en el 90% de los pacientes con úlceras pépticas y en el 20% de los pacientes asintomáticos con cáncer.^{20,21}

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

** Coordinador del Servicio de Gastroenterología, Hospital San Vicente de Paúl, Heredia.

*** Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico (ICMRT).

****Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Correspondencia: Eugenia Ma. Quintana Guzmán, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José. E-mail: eugenia_quintana@quorum.nacion.co.cr

H. pylori es capaz de elaborar diferentes sustancias que actúan sobre la mucosa gástrica, dañándola e influyendo en la patogénesis de la enfermedad. Algunas cepas producen una toxina vacuolizante²² que ha sido purificada y caracterizada como la Vac A y otra proteína cuyo gen se ha denominado Cag A.²³⁻²⁶

Las cepas que presentan la toxina Vac A y la proteína del gen Cag A se denominan tipo I y las que carecen de éstas son llamadas tipo II.²⁷⁻²⁸

La presencia de la proteína Vac A de peso molecular de 84 y 89 kDa y la de Cag A de peso molecular de 120-140 kDa están relacionadas con el potencial de *H. pylori* de producir daño gástrico.²³ De las personas que se encuentran infectadas con *H. pylori* y solo en una proporción de ellas se pueden reconocer consecuencias clínicas de la infección; además algunos pacientes son asintomáticos, mientras otros desarrollan enfermedad gástrica o duodenal.²⁴ Una posible explicación a esto podría ser la heterogeneidad que presentan las cepas de *H. pylori*, ya que solo del 60% al 80% de estas cepas expresan la proteína Vac A.^{23,24}

Actualmente se han logrado identificar algunos otros antígenos de *H. pylori*, entre los que se encuentran las flagelinas de 56 y 57 kDa,²⁹ las subunidades de ureasa de 31 y de 61 a 66 kDa,³⁰⁻³¹ una lipoproteína de membrana de 29 kDa,^{32,33} porinas de 31, 48, 49, 50, 67 y 90 kDa^{34,35} y el factor activador de neutrófilos de 150 kDa.³⁶

Se han desarrollado varios métodos serológicos para la detección de *H. pylori*,³⁷ siendo el ELISA el más sensible y más utilizado.³⁸ Este es un método diagnóstico sencillo y rápido que posibilita la realización de estudios epidemiológicos permitiendo obtener resultados cuantitativos y estableciendo distintos valores de positividad para diferentes grupos poblacionales.³⁹

El aislamiento, la identificación y la purificación de antígenos específicos han permitido desarrollar varios sistemas de ELISA, algunos de los cuales han sido incorporados a juegos de reactivos comerciales disponibles,⁴⁰⁻⁴¹ que tienen una sensibilidad y especificidad clínica superior al 90% y su valor ya ha sido comprobado en investigaciones seroepidemiológicas.³⁸

El reconocimiento serológico de la Cag A, por medio de inmunoensayos enzimáticos, se ha convertido en un indicador importante altamente específico de infección por cepas de *H. pylori* tipo I.²⁴ Asimismo, la presencia de la proteína Vac A y de anticuerpos dirigidos contra ella está altamente asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar una úlcera péptica.^{24,42-44}

El propósito del presente trabajo fue llevar a cabo un estudio de anticuerpos IgG-anti *H. pylori* por medio de Western-blot, por primera vez en Costa Rica, para identificar los tipos de antígenos que desarrollan respuesta inmunológica, utilizando tanto sueros como cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes costarricenses.

Asimismo, se compararon los resultados obtenidos del Western-blot con una prueba comercial de ELISA, y se determinó la sensibilidad y especificidad diagnóstica de ambas pruebas serológicas utilizando el estudio histológico de biopsia gástrica como referencia o regla de oro.⁴⁵

Materiales y Métodos

Muestras: se utilizaron sueros obtenidos por venopunción con material descartable de 83 pacientes referidos al Servicio de Gastroscopía del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia. Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento para participar en la investigación, que contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital. A cada paciente se le realizó un análisis histológico de 4 biopsias de antro gástrico donde se buscó la presencia de *H. pylori* y un estudio de anticuerpos IgG-anti *H. pylori* por un método comercial de ELISA y por Western-blot.

Estudio histológico: el estudio histológico de las muestras se llevó a cabo en el Servicio de Patología del Hospital México, usando la tinción de hematoxilina-eosina y azul de touillidina, que permite identificar al *H. pylori*, como parte de la rutina de trabajo del servicio.

Método de ELISA comercial: se utilizó según las recomendaciones de la casa comercial, un juego de reactivos de IgG *H. pylori* Milenia de la DPC Biermann GmbH.⁴⁶

Método de Western-blot: se empleó el equipo Mini Protean II de Bio Rad, según el procedimiento utilizado en el Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico (ICMRT).⁴⁷ Se utilizaron marcadores proteicos de peso molecular de Bio Rad (Broad Standard) y como antígeno un sonicado crudo de 41 cepas de *H. pylori* aisladas en Agar Sangre (Columbia) y sonicadas en solución salina hasta su completa lisis, cepas obtenidas previamente de biopsia gástrica de los mismos pacientes estudiados por serología. Este extracto se corrió en un gel de acrilamida al 10% transfiriéndose a nitrocelulosa, la cual se puso en contacto con el suero del paciente, y la reacción se reveló por un método enzimático. Las bandas obtenidas se compararon con un patrón de migración proteica de *H. pylori* por Western-blot de la DPC Biermann GmbH para la identificación respectiva de pesos moleculares.

Resultados

De las 83 muestras analizadas, 61 de ellas presentaron biopsia positiva por *H. pylori*, mientras que 22 fueron negativas.

En el Cuadro 1 se anotan las bandas de peso molecular más frecuentes encontradas en los 83 pacientes estudiados por IgG-anti *H. pylori* por Western-blot. Los anticuerpos más frecuentes (37 pacientes: 45%) se observaron contra antígenos de peso molecular de 10.6 y 11 kDa, siendo proteínas de *H. pylori* que aún no han sido descritas y caracterizadas en inmunoelectrotransferencias. Le siguen en orden de frecuencia

Cuadro 1
Pesos moleculares más frecuentes de antígenos de *H. Pylori* determinados en 83 sueros por el método de Western-blot

N° de muestras	%	Peso molecular KDa	Proteína
37	45	10,6 y 11	No identificada
34	41	47,50 y 67	Porinas (proteínas de superficie)
31	37	32,60 y 63	Subunidades de ureasa
25	30	34 y 35	No identificada
25	30	56	Flagelina
14	17	40 y 42	No identificada
16	20	12 y 13	No identificada
8	10	71	Ureasa
8	10	84 y 89	Vac A (toxina Vacuolizante)
6	7	8 y 9	No identificada
5	6	120	Cag A (Gen asociado a la citotoxina)

(41%) las bandas de peso molecular de 47, 50 y 67 kDa correspondiendo a porinas y proteínas de superficie de la bacteria.³⁴ Bandas de 32, 60 y 63 kDa caracterizadas como subunidades de ureasa 30-31 se presentaron en el Western-blot de 31 (37%) pacientes y otros 25 (30%) mostraron en el Western-blot bandas de 56 kDa correspondientes a la flagelina bacteriana.²⁹ Asimismo, 25 (30%) pacientes presentaron en el Western-blot bandas de 34 y 35 kDa y 14 (17%) pacientes bandas de 40 y 42 kDa en su Western-blot, proteínas aún no identificadas. Ocho (10%) pacientes presentaron en el Western-blot reacción antigénica contra una banda desconocida de 71 kDa.

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos por el método serológico de ELISA y con el Western-blot. El Cuadro 3 presenta los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica del ELISA y del Western-blot, al compararlo con el estudio histológico.

Cuadro 2
Estudio serológico de 83 sueros para IgG anti *H. Pylori* por los métodos de ELISA y Western-blot

Prueba	N° de muestra		N° de falsos	
	Positivas	Negativas	Positivos	Negativos
Elisa	63	20	13 ^a	11
Western-blot	63	20	14 ^b	12

a: 4 pacientes con tratamiento previo
b: 6 pacientes con tratamiento previo

Discusión

La serología ha encontrado su principal aplicación en los estudios epidemiológicos y ha servido para conocer la preva-

Cuadro 3
Sensibilidad y especificidad diagnóstica de ELISA y Western-blot en la determinación de IgG anti *H. Pylori*

Método	Sensibilidad diagnosticada ^a	Especificidad diagnosticada ^b
Elisa	88%	71%
Western-blot	89%	73%

a: Sensibilidad diagnosticada: $\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos + Falsos Positivos}} \times 100$

b: Especificidad diagnosticada: $\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos + Falsos Negativos}} \times 100$

lencia de *H. pylori* en varias poblaciones e investigar factores de origen geográfico, la situación socioeconómica, los antecedentes étnicos y la edad.⁴⁸

En el Cuadro 1 están anotadas las bandas de diferentes pesos moleculares más frecuentes encontradas en la prueba serológica de Western-blot. Cada una de ellas corresponde a los anticuerpos tipo IgG presentes en los sueros de los pacientes que reaccionaron ante la presencia de las diferentes proteínas del *H. Pylori*.

Contra la banda de 120 kDa descrita como el Cag A, gen asociado a la citotoxina,^{23,26} mostraron anticuerpos únicamente 5 pacientes (6%), y contra la proteína de 84 y 89 kDa denominada Vac A,²² únicamente dieron reacción inmunológica 8 pacientes (10%). Esto hace pensar que la mayoría de las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes probablemente sean tipo II, ya que muy pocas muestras evidenciaron presencia de anticuerpos tipo IgG contra las proteínas Cag A y Vac A, y ninguno presentó ambas bandas de peso molecular simultáneamente.

Al comparar los resultados obtenidos con las muestras de suero estudiadas serológicamente por ELISA y Western-blot, se pueden observar resultados semejantes entre ambos métodos.

De las 14 muestras negativas por biopsia con resultado positivo para Western-blot, 6 de ellas pertenecen a pacientes que recibieron tratamiento previo con antibióticos contra *H. pylori*, por lo que presentaron resultado positivo. De las 13 muestras negativas con resultados positivos para ELISA, 4 de ellas también pertenecen a pacientes que recibieron tratamiento. Por lo tanto estas 10 muestras no deben ser considerados como resultados falsos positivos verdaderos, pues es de esperar que dieran resultado negativo en el estudio histológico.

De los falsos negativos por ambos métodos serológicos, se podría suponer que se trata de pacientes recién infectados. La presencia de falsos positivos por serología podría obedecer a reacciones cruzadas o al efecto de parche, debido a la distribución desigual del *H. pylori* en la mucosa gástrica.^{45,49,51}

El método de ELISA como el de Western-blot presenta sensibilidad y especificidad diagnóstica semejantes, siendo la sensibilidad mayor que la especificidad, por lo que se observa mayor número de falsos positivos. Sin embargo, para este cálculo se excluyeron las 10 muestras cuyos pacientes habían recibido tratamiento. Algunos autores han informado la especificidad y la sensibilidad de las pruebas de ELISA comerciales superiores al 90%,⁴⁰⁻⁴¹ más altas que las obtenidas en nuestro estudio.

En las diversas técnicas serológicas, como ELISA y el Western-blot, desarrolladas para la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori* se han empleado diferentes preparaciones antigénicas, incluyendo organismos vivos, bacterias tratadas con formalina, sonicated bacteriano, tratados con calor, ultracentrifugado de sonicated bacteriano, antígenos termoestables, extractos antigénicos con glicerina ácida, preparaciones de ureasa bacteriana, antígeno de citotoxina, proteínas celulares de alto peso molecular y proteínas de membrana externa.⁴⁸

Con objeto de que la técnica sea lo más sensible y específica posible, el antígeno usado debe contener componentes compartidos por la mayoría de cepas de *H. pylori*, sin mostrar reacciones cruzadas con otros antígenos bacterianos. La introducción de antígenos más puros reduce la aparición de reacciones cruzadas y mejora la especificidad de la técnica.

A pesar de la alta especificidad aportada por estos antígenos parcial o altamente purificados, su empleo individual puede conllevar algunas desventajas, principalmente debidas a la reducción del nivel de sensibilidad del método.⁴⁸

Si bien la composición del antígeno ideal todavía no ha sido determinada, parece razonable pensar que la combinación de dos o más antígenos purificados podría considerarse adecuada.⁴⁸

En este estudio se utilizó un antígeno completo de *H. pylori* para llevar a cabo la inmunoelectrotransferencia y ensayo enzimático, ya que se preparó un sonicated de 41 cepas de las bacterias previamente aisladas, de los mismos pacientes a quienes se les realizó el estudio serológico. Cabe recalcar que en este estudio solamente se trabajó con un extracto crudo sonicated y que posiblemente si se utilizara un antígeno más purificado se obtendría una mayor sensibilidad y especificidad de la prueba, pero al ser el primer estudio que se realiza en Costa Rica con esta metodología para estudiar *H. pylori*, consideramos que los resultados obtenidos son muy prometedores y debería intentarse la estandarización de la metodología.

A pesar de que en el ELISA comercial se usaron cepas de *H. pylori* ajenas a nuestro medio, los resultados del desempeño clínico fueron muy semejantes a los obtenidos por Western-blot.

Si bien la aplicación de la serología aporta ventajas al diagnóstico y al mejor conocimiento a nivel epidemiológico de la infección por *H. pylori*, la interpretación de los resultados obtenidos mediante procedimientos serológicos debe ser

cautelosa y acompañarse de la historia clínica del paciente. Se recomienda realizar un estudio histológico de biopsia gástrica para un adecuado diagnóstico de la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica.

Abstract

Background and aim: In Costa Rica the gastric cancer is the malignancy that produces more deaths. In other studies their pathology it has been associated with *Helicobacter pylori*. This bacteria is able to produce substances that alter the gastric mucosa, antigens that have been characterized by Western-blot. The purpose of this study was to performed for the first time in our country a study of IgG-anti *H. pylori* by Western-blot to identify the antigens that induce an immune response, using sera and strains of *H. pylori* isolated from Costa Rican patients. Also the results obtained by Western-blot were compared with an ELISA test to determine the clinical sensibility and specificity using the gastric biopsy as reference.

Method: Samples consisted of gastric biopsies and sera from 83 patients referred to the Endoscopy Service of the San Vicente de Paul Hospital, Heredia. To each patient a histologic study of gastric biopsy was realized and antibodies study of IgG anti *H. pylori* by ELISA and Western-blot.

Results and conclusions: In the Western-blot protein bands of different molecular weight with a predominance of *H. pylori* antigens of low molecular weight were observed. The Western-blot and ELISA had a clinical sensitivity of 89% and 88% and a clinical specificity of 73% and 71% respectively, when compared with the histology.

Referencias

1. Peura D. *Helicobacter pylori*: practical guidelines for diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 1993; 1(4): 291-295.
2. Fennerty M. *Helicobacter pylori*. *Arch Intern Med* 1994; 154(7):721-727.
3. Labenz J, Borsch G. Evidence for the essential role of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut* 1994; 35(1): 19-22.
4. Fontham E, Ruiz B, Pérez A, Hunter F, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90(7): 1094-1101.
5. Rex D. An etiologic approach to management of duodenal and gastric ulcer. *J Fam Pract* 1994; 38(1): 60-67.
6. Partipilo M, Woster P. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Pharmacotherapy* 1993; 13(4): 330-339.
7. Velhuyzen S, Sherman Ph. *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer and non ulcer dyspepsia: a systematic overview. *Can Med Assoc J* 1994; 150(2): 177-185.
8. Marshall B. *Helicobacter pylori*: a primer for 1994. *Gastroenterologist* 1993; 1(4): 241-247.
9. O'Connor H. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Scand Gastroenterol Suppl* 1994; 201: 11-15.

10. Levine T, Price A. *Helicobacter pylori*: enough to give anyone an ulcer? Br J Clin Pract 1994; 47(6): 328-332.
11. Tatsuta M, Tishi H, Okuda S, Taniguchi H, Vokota Y. The association of *Helicobacter pylori* with differentiated type early gastric cancer. Cancer 1993; 2(6): 1841-1845.
12. Hu P, Mitchell H, Li Y, Zhou M, Hazell S. Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. Am J Gastroenterol 1994; 89(10): 1806-1810.
13. DeKoster E, Ruset M, Fernández E, Delteme M. *Helicobacter pylori*, the link with gastric cancer. Eur J Cancer Prev 1994; 3(3): 247-257.
14. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Research 1992; 52: 6735-6740.
15. Goh K, Parasakthi N, Peh S, Puthuchery S, Wong N. The rapid urease test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Singapore Med J 1994;35(2):161-162.
16. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. Am J Sur Pathol 1995; 19 (suppl 1): 537-543.
17. Matamoros M and Bertoli M. *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico ¿Hacia dónde dirigir nuestros esfuerzos? Sem Epidemiol 1996; 49: 1-2.
18. Bartels G, Herrera A, Salas P, Sierra R, Lomonte B. Antibodies to *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients, asymptomatic adults, and children from Costa Rica. MIS 1995; 103: 428-432.
19. Sierra R, Muñoz R, Peña A, Biemond I, Van Duijn W, Lamers C, Teuchmann S. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen level in children from Costa Rica: Comparison of two areas with different risks for stomach cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prevent 1992; 1: 449-454.
20. Hernández F, Rivera P. Infecciones por *Helicobacter pylori* en niños. Acta Ped Costarric 1995; 9 (3): 90-93.
21. Hernández F, Rivera P, Sigarán M, Miranda S., Rodríguez O, Murillo M, Con-Wong R. *Helicobacter pylori* en pacientes con úlceras pépticas y en individuos sin alteraciones gastrointestinales. Rev Cost Cienc Med 1994, 15 (1,2): 31-34.
22. Leunk R. Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*. Rev Infect Dis 1991; 13(suppl 8): S686-689.
23. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci EEUU 1993; 90: 5791-5795.
24. Tummuru M, Cover T and Blaser M. Cloning and expression of a high - molecular - mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Imm 1993; 61 (5): 1799-1809.
25. Phadnis S, Ilver D, Janson L, Normark S and Westblom U. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect Imm 1994; 62 (5): 1557-1565.
26. Husson M, Gottrand F, Vachee A, Dhaenens L, Martin E, Turck D, Houcke M, Lecler H. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the cag A gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. J Clin Microbiol 1995; 33 (12): 3300-3303.
27. Covacci A, Falkow S, Berg D, Rappuoli R. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? Trends in Microbiol 1977; 5(5): 205-208.
28. Xiang Z, Censini S, Bayeli P, Telford J, Figura n, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of Cag A and Vac A virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that Cag A is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Imm 1995; 63 (1): 94-98.
29. Kostrzynska M, Betts J, Austin J, Trust T. Identification, characterization and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagela. J Bacteriol 1991; 173: 937-946.
30. Austin J, Doig P, Stewart M, Trust T. Structural comparison of urease and a GroEL analog from *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1992; 174: 7470-7473.
31. Dunn B, Cambell G, Perezperez G, Blaser M. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1990; 254: 9464-9469.
32. Kostrzynska M, O'toole P, Taylor D, Trust T. Molecular characterization of a conserved 20 -kilodalton membrane- associated lipoprotein antigen of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1994; 176 (19): 5938-5948.
33. Doig P, Austin J, Kostrzynska M, Trust T. Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1992; 174(8): 2539-2547.
34. Exner M, Doig P, Trust T, Hancock R. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. Inf Imm 1995; 63(4): 1567-1572.
35. Doig P, Exner M, Hancock R, Trust T. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1995; 177(19): 5447-5442.
36. Evans D, Evans D, Takemura T, Nakano H, Lampert H, Graham D, Granger D, Kuitys P. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect Imm 1995; 63 (6): 2143-2220.
37. Simor A, Lin E, Saibil F, Cohen L, Louie M, Pearen S, Donhoffer H. Evaluation of enzyme immunoassay for detection of salivary antibody to *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1996; 34 (3): 550-553.
38. Newell D. The principles and practices of the serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Lab Medica International 1991; VIII (6): 7-11.
39. López-Brea M, Martín E, Alarcón T, Acuña M, Gimeno M, Sanz J. Seguimiento de la respuesta serológica cuantitativa al tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. Enf Infecc Microbiol Clin 1993; 11 (1): 33-35.
40. Gossens H, Glupczynski Y, Burette A, van den Borre C, Butzler J. Evaluation of a commercially available second-generation in immunoglobulin G enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* infection. J Clin Microbiol 1995; 30: 179-180.
41. Loffeld R, Uriese W, Stobbering E. Usefulness of several commercial enzyme- linked immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* in clinical medicine. Eur J Gastroenterol Hepatol 1993; 5: 333-337.
42. Tummuru M, Cover T and Blaser M. Mutation of the cytotoxin - Associated cag A genes does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. Infect Imm 1994; 62 (6): 2609-2613.
43. Taylor D, Eaton M, Chang N and Salama S. Construction of a *Helicobacter pylori* Genoma Map and Demonstration of Diversity at the Genoma Level. J Bacteriol 1992; 174 (21): 6800-6806.
44. Husson M, Gottran F, Vachee A, Dhaenens L, Martin E, Turcke D, et.al. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the Cag A gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3300-3303.
45. Barthel J, Everett D. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: the "Gold Standard" and the alternatives. Rev Infect Dis 1990, 12(Suppl1): 5107-5114.
46. Milenia IgG *H pylori*. DPC Biermann GmbH. Diagnostic Product Corporation. PIMKHP-C.

47. García Z, Taylor L, Arauz P. Manual de inmunoelctrotransferencia y ensayo enzimático (Western-Blot) para la determinación de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humano tipo (VIH-1). Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico (ICMRT) Agosto 1992, Tres Ríos, Cartago.
48. Sanz J, López-Brea M. Diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori*. En López-Brea M. *Helicobacter pylori*. Microbiología, clínica y tratamiento. s.ed.: Mosby/Doyma Libros, 1995; Madrid, España, 153-174.
49. Azuma T, Kato T, Hirai M, et.al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol 1996, 11(7): 662-669.
50. Kjøller M, Fischer A and Justesen T. Transport conditions and number of biopsies necessary for culture of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992, 10: 166-167.
51. Van der Hulst R, Verheul S, Weel J, Gerrits Y, tenKate F, Dankert J. Effect of specimen collection techniques, transport media and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996, 15: 211-215.