

Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* por medio de la determinación de anticuerpos IgA secretores específicos en saliva

María A. Arévalo-Rosales¹, María de los Angeles Zenón-Ramírez¹, Sandra Zerpa², Disney Rosales-Borjas³, Librado Ortiz-Ortiz⁴

¹Facultad de Bioanálisis, Universidad de Los Andes, ²Servicio de Gastroenterología y ³Laboratorio Clínico Bacteriológico del Hospital Universitario Dr. Miguel Oraá, ⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México y Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa-ULA, Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela

Recibido Marzo 20, 2009. Aceptado Marzo 26, 2009.

DIAGNOSTIC OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION BY DETERMINATION OF SPECIFIC SECRETORY IgA ANTIBODIES IN SALIVA

Resumen

Se reporta la evaluación de una prueba inmunoenzimática (ELISA) para la determinación de IgA secretora (IgAs) anti-*H. pylori* en la saliva para el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*. Se estudiaron 14 pacientes con diagnóstico de gastritis a los cuales se les realizó endoscopia y toma de biopsia de la mucosa gástrica para análisis histológico y bioquímico, que constituyen el estándar de oro del diagnóstico del padecimiento. Además, con fines de comparación, se evaluó en suero la IgG anti-*H. pylori*, utilizando un equipo comercial. La detección de IgAs anti-*H. pylori* mostró una buena correlación con los hallazgos histológicos y bioquímicos. Además, cuando se confrontó con los valores de IgG en suero, mostró una mejor correspondencia con la enfermedad. La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, así como la certeza diagnóstica de la IgAs en saliva fueron 92.8%, 100%, 100%, 93.3%, y 96.42%, respectivamente, los cuales mostraron ser superiores a los de la IgG sérica. En conclusión, la estimación de IgAs anti-*H. pylori* por el método de ELISA, es un procedimiento confiable, que puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de infecciones por *H. pylori*.

PALABRAS CLAVE: *Helicobacter pylori*, IgA secretora, IgG sérica, ELISA, endoscopia.

Abstract

In this report, we describe an immunoenzimatic assay (ELISA) for the determination of secretory IgA (IgAs) anti-*Helicobacter pylori* antibodies in saliva for the identification of infections by this microorganism. We evaluated 14 patients with a diagnosis of gastritis to whom endoscopy was performed and biopsy taken from the gastric mucosa for histologic and biochemical analysis, considered the gold standard for diagnosis of *H. pylori* infection. Furthermore, in order to compare the efficiency of the IgAs determination, we tested the IgG anti-*H. pylori* antibodies in the serum of the same patients using a commercial kit. The IgAs anti-*H. pylori* showed a good match with the histologic and biochemical analysis. In addition, the IgAs evaluation showed a better correlation with the disease than the IgG anti-*H. pylori* in serum. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, as well as the efficacy were 92.8%, 100%, 100%, 93.3, and 96.4%, respectively, which were superior to those for the IgG anti-*H. pylori* in serum. In brief, the ELISA assay in saliva for the determination of IgAs anti-*H. pylori* showed to be reliably and of great value for the diagnosis of infections by *H. pylori*.

KEY WORDS: *Helicobacter pylori*, secretory IgA, seric IgG, ELISA, endoscopy

Introducción

Las infecciones por *Helicobacter pylori* pueden ser responsables de diferentes manifestaciones clínicas, entre ellas: gastritis, úlcera péptica, dispepsia no ulcerosa, adenocarcinoma, linfoma gástrico asociado al tejido linfoide de las mucosas o tipo MALT, y manifestaciones extragástricas (1-4). Su adquisición conlleva a una inflamación crónica de la mucosa gástrica, que persiste usualmente durante toda la vida, y que gradualmente progresa hacia una atrofia en una

proporción importante de los individuos infectados. Esta progresión es probablemente multifactorial, y es influenciada, además de la infección bacteriana, por factores genéticos o ambientales (5). Sin embargo, la mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos durante el trascurso de su vida. No se conoce con certeza que causas determinan el resultado de la infección, pero la expresión variable de ciertos factores de virulencia puede ser una explicación. Entre ellos se han implicado algunas isoformas de la citotoxina vacuolizante (VacA) y la isla de la

patogenicidad (una secuencia de genes que se cree participa en la capacidad infecciosa de la bacteria), incluyendo el gen para la proteína asociada a la citotoxina (CagA), que han mostrado ser más prevalentes en cepas causantes de úlcera péptica, que en otras cepas (6, 7). Actualmente, sabemos que las infecciones por *H. pylori* constituyen un problema mundial, responsable de una prevalencia por encima del 50%. Su presencia siempre produce una respuesta inflamatoria en grado variable en los individuos infectados, lo que representa un problema de salud, no solo en los países en desarrollo donde su prevalencia alcanza valores hasta del 90%, sino en los desarrollados donde la misma varía entre el 5-10% (8). El principal factor epidemiológico de riesgo es posiblemente el bajo nivel económico-higiénico-sanitario; de ahí que la infección sea mucho más frecuente en regiones no desarrolladas.

La respuesta inmune, tanto innata como adquirida, es importante para el control de la inflamación causada por el microorganismo y la infección resultante. La infección produce una infiltración masiva de la mucosa gástrica por neutrófilos y linfocitos (9) y niveles elevados de anticuerpo específico en suero, saliva, jugo gástrico, y heces (10). A pesar de la respuesta inmune contra la infección por *H. pylori*, la bacteria es rara vez eliminada del estómago y la infección persiste de por vida. No obstante, en ratones inmunizados con ureasa de *H. pylori* se ha observado una correlación entre la IgA secretora (IgAs) de las mucosas frente a la ureasa y la protección contra la colonización con *H. felis* (11).

En relación al diagnóstico de laboratorio, no invasor, se realiza generalmente por (i) prueba del aliento de la urea marcada con carbono 13 (¹³C) (12), (ii) determinación de anticuerpos IgG o IgA anti-*H. pylori* en suero o saliva por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA) (13), y (iii) ELISA para evaluar la presencia de antígeno de la bacteria en heces (14). La saliva es fácil de obtener y a pesar de reportes en la literatura poco entusiastas con el ensayo en *H. pylori*, algunos parecer ser más prometedores (15).

El propósito de este estudio fue investigar en individuos sanos o infectados con *H. pylori*, la eficiencia diagnóstica de la determinación de IgAs anti-*H. pylori* en saliva, tomando como referencia el estándar de oro constituido por la esofagogastroduodenoscopia (endoscopia) con

biopsia para estudio histológico y bioquímico, y comparando su certeza diagnóstica con un equipo diagnóstico comercial que determina anticuerpos IgG anti-*H. pylori* en suero sanguíneo.

Material y métodos

Pacientes en estudio. Se evaluaron 14 pacientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Dr. Miguel Oraá (HUMO) de la Ciudad de Guanare, Edo. Portuguesa, con diagnóstico de úlcera duodenal o gástrica, o erosiones gástricas diagnosticadas por endoscopia. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con drogas antiinflamatorias sin esteroides, antibióticos o inhibidores de la bomba de protones, en las tres semanas previas al estudio. El 94% del grupo fue de sexo femenino y 6% de sexo masculino; la edad fluctuaba entre 18 y 53 años (promedio 34 años). Las características de la población en estudio fueron comparadas con valores obtenidos de individuos sanos, sin antecedentes de gastritis y que viven en condiciones de higiene adecuadas. Este grupo formado de 10 individuos, 70% del sexo masculino y 30% del femenino, de edades entre 15 a 40 años (promedio 29 años), no se sometieron a biopsia. La investigación que aquí se describe fue aprobada previamente por el Comité de Ética del HUMO.

Examen histológico y bioquímico. Los pacientes fueron evaluados por endoscopia y biopsia para examen histológico y bioquímico, de mucha utilidad en el diagnóstico inicial. Los cortes obtenidos de la biopsia tomada de la mucosa antral y cuerpo del estómago se fijaron en una solución de formalina al 4% por 24 h y se incrustaron en parafina. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina, así como por Giemsa modificado.

Las biopsias del estómago se usaron también para investigar la presencia indirecta de la bacteria por medio de la liberación de ureasa, utilizando un equipo comercial (UREIVIC, IVIC, Venezuela), colocando un fragmento de la misma en un tubo Eppendorf con agar que contiene rojo de fenol y urea, e incubando durante 10 a 60 min. En presencia de la bacteria en el tejido, la ureasa que posee hidroliza a la urea y se producen iones de amonio que aumentan el pH favoreciendo el desarrollo de un color rojo fucsia.

Determinación de anticuerpos. Se obtuvo de

cada uno de ellos saliva y sangre para precisar la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* de clase IgA en saliva e IgG en suero. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Determinación en saliva de IgAs frente a *H. pylori* por medio del ELISA. Se examinaron por ELISA muestras de saliva de sujetos sanos con el propósito de establecer las diluciones que no mostraran valores de densidad óptica (D.O.) elevados, debidas al ruido que generalmente se observa a concentraciones altas, no solo de saliva sino también de otros especímenes orgánicos. El procedimiento se estandarizó usando diluciones de la saliva en estudio en un amortiguador de fosfatos pH 7.4 (PBS), con 0.05% de Tween 20 (Tw), enriquecido con 1% de albúmina sérica bovina (BSA), y pozos comerciales previamente sensibilizados con un extracto de *H. pylori* (BIOLINE DIAGNOSTIC, Venezuela). En los estudios preliminares se definió que la dilución $\frac{1}{4}$ era la óptima para precisar la existencia de IgAs en saliva, y además que una dilución 1:1000 del antisuero anti-IgAs humana marcada con peroxidasa (ZYMED LABORATORIES, San Francisco, CA) en PBS-TW-BSA, era el adecuado. En breve, la saliva se adicionó en volúmenes de 100 μl , a microplacas cubiertas con antígeno de *H. pylori*. Se incluyeron controles a los cuales se les adicionó solamente el amortiguador. Después de incubar por 30 min a 37°C , se lavaron cinco veces con PBS-Tw y se incubaron con 100 μl de un antisuero anti-IgA humana-peroxidasa (1:1000) durante 30 min a 37°C . Las placas se lavaron nuevamente cinco veces con PBS-Tw y se les adicionó 100 μl del sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con H_2O_2 (TMB), incubándose durante 20 min a temperatura ambiente (t.a.). La reacción se detuvo por la adición de 100 μl de H_2SO_4 1M y se procedió a su lectura a 450 nm. El punto de corte de esta prueba se estableció usando el promedio más dos desviaciones estándar de los controles sanos, negativos para la infección.

Determinación de IgG en suero frente a *H. pylori*. La cuantificación de IgG se llevó a cabo usando un equipo comercial de ELISA (BIOLINE DIAGNOSTIC, Venezuela), donde 100 μl de suero diluido 1:21 se adicionaron a pozos de poliestireno previamente cubiertos con un extracto de *H. pylori*. Las placas se incubaron durante 20 min a t.a. A continuación, los pozos se lavaron

cinco veces con PBS-Tw, y se procedió a agregar 100 μl de un antisuero anti-IgG humana previamente marcado con la enzima peroxidasa, seguido de incubación durante 20 min a t.a. Las placas se lavaron como se indicó anteriormente, y se agregaron 100 μl del sustrato de TMB correspondiente, seguido de incubación a t.a. durante 10 min en la oscuridad, que da lugar a un producto soluble de color amarillo. La reacción enzimática se detuvo por adición de 100 μl de una solución de H_2SO_4 1M a cada pozo. Las placas se leyeron en un procesador de ELISA a 450 nm. La concentración de anticuerpos anti-*H. pylori* en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto formado (16). El equipo comercial proporciona los controles negativos, positivos, así como el punto de corte.

Análisis estadístico. La sensibilidad (SEN), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), y certeza diagnóstica (C.D.) de las pruebas de ELISA se calcularon como se describió previamente (17), donde: SEN = proporción de individuos con una prueba positiva por ELISA (IgG o IgAs) entre los sujetos con un resultado positivo por histología y bioquímica; ESP = número de individuos con una prueba negativa de ELISA (IgG o IgAs) entre el número total de sujetos con histología y bioquímica negativas; VPP = número de positivos por histología y bioquímica entre todos los casos positivos por ELISA (IgG o IgAs); VPN = número de casos negativos por histología y bioquímica entre todos los negativos por ELISA (IgG o IgAs). La C.D. es el número de casos correctamente diagnosticados (verdaderos positivos y verdaderos negativos) entre el número total de casos. Los datos obtenidos se analizaron por medio de la prueba de Fisher para determinar la homogeneidad de varianzas entre grupos. Cuando dichas varianzas fueron homogéneas se usó la prueba *t* de Student, y cuando fueron heterogéneas la prueba *U* de Mann-Whitney. Los valores de *P* corresponden a pruebas de dos colas, y un valor crítico de $P < 0.05$ se consideró significativo (18).

Resultados

Los pacientes clínicamente seleccionados en el Servicio de Gastroenterología mostraron en el estudio histológico de la biopsia obtenida del antro

y cuerpo gástrico, una gastritis microerosiva activa (infiltración de neutrófilos) y crónica (infiltración de linfocitos y células plasmáticas). Los grados de alteración encontrados alcanzaron diferentes magnitudes, en algunos casos con marcada lesión celular e intenso infiltrado intraepitelial. Además, en biopsias teñidas con Giemsa modificado se observó la presencia de la bacteria. Asimismo, la determinación de la producción de ureasa por el tejido obtenido fue positiva en todos los casos. Los controles sanos no se sometieron a este procedimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los individuos en estudio y examen de las biopsias obtenidas

Grupo	n	Sexo		Edad (rango)	Histología	Ureasa
		F	M			
Pacientes	14	13	1	18-53	+	+
Normales	10	3	7	15-40	NSH*	NSH

*NSH, no se hizo.

La saliva de los sujetos en estudio se sometió a la determinación de anticuerpos IgAs anti-*H. pylori*. El punto de corte obtenido a partir de las salivas normales a una dilución de 1/4 fue de 0.463 (promedio ± 2 D.E.). En estas condiciones, las muestras de saliva diluidas 1/4 de 14 pacientes infectados con *H. pylori*, y 10 individuos sanos no infectados se analizaron para establecer la presencia de anticuerpos específicos por ELISA. Los pacientes infectados con *H. pylori* mostraron niveles significativos de anticuerpos IgAs anti-*H. pylori* en la saliva de 13 de los 14 pacientes estudiados, mientras que los sujetos no infectados no mostraron anticuerpos por encima del punto de corte (Tabla 2).

El suero sanguíneo de los pacientes y controles sanos se evaluaron para definir la presencia de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*. El ensayo reveló que 9/14 pacientes mostraron títulos de anticuerpos frente a *H. pylori*. Por otra parte, 2/10 individuos sanos presentaron anticuerpos por encima del punto de corte establecido (Tabla 3).

En estas condiciones, la SEN y ESP de la determinación de IgAs anti-*H. pylori* en las salivas en estudio, cuando se comparan con los estudios histológicos y bioquímicos es de 92.85% y 100%, respectivamente, mientras que el VPP es de 100% y el VPN de 93.3%, con una certeza diagnóstica del 96.42%. Por otra parte, los valores obtenidos

de IgG anti-*H. pylori* en suero, mostraron al confrontarse con el estándar de oro, valores menores en todos los rubros (Tabla 4).

Tabla 2. Determinación de IgAs en saliva de pacientes infectados con *H. pylori* y en controles sanos

Pacientes*			Controles sanos*		
n	Absorbancia (D.O.)	Resultado	n	Absorbancia (D.O.)	Resultado
1	0.557	+	1	0.338	-
2	0.492	+	2	0.298	-
3	0.526	+	3	0.309	-
4	0.710	+	4	0.413	-
5	0.731	+	5	0.289	-
6	2.467	+	6	0.156	-
7	1.000	+	7	0.260	-
8	2.913	+	8	0.435	-
9	0.853	+	9	0.281	-
10	2.793	+	10	0.286	-
11	1.352	+			
12	1.877	+			
13	0.352	-			
14	1.226	+			

*La diferencia entre los grupos estudiados fue significativa ($P < 0.001$) Punto de corte: Se obtuvo a partir del promedio de las salivas de los controles sanos ± 2 desviaciones estándar, el cual fue de 0.473.

Tabla 3. Determinación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* en el suero de pacientes y de individuos sanos

Sujetos en estudio	Positivos* (D.O., rango)	Negativos (D.O., rango)
Pacientes	9 (0.681-1.148)	5 (0.337-0.535)
Sanos	2 (1.09-1.409)	8 (0.123-0.477)

*Punto de corte: 0.599. D.O., densidad óptica.

Discusión

Los resultados que aquí se presentan, en un número limitado de muestras obtenidas de pacientes con el diagnóstico clínico de gastritis debidas a infecciones por *H. pylori*, y comprobado por estudios histológicos y bioquímicos, indican que la determinación de IgAs en saliva puede ser una prueba de gran utilidad en el diagnóstico de las

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, así como la certeza diagnóstica de los ensayos de ELISA para la determinación de IgAs en saliva o IgG en suero

ELISA	SEN*	ESP*	VPP*	VPN*	C.D.*
<i>Anti-H. pylori</i>					
IgAs en saliva	92.85	100	100.0	93.30	96.42
IgG en suero	61.28	80	81.8	61.53	70.83

*SEN, sensibilidad; ESP, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo, y C.D., certeza diagnóstica

infecciones por *H. pylori*, ya que muestran una gran SEN, ESP, VPP, VPN y C.D. superiores a los obtenidos por evaluación de IgG en el suero sanguíneo (Tabla 4). Además, la vida media corta de 5.9 días de la IgAs (19) permite con más certeza predecir que se trata de una infección activa o reciente, y que podría inclusive ser utilizada para el monitoreo del tratamiento específico del padecimiento. En apoyo de lo anterior podemos mencionar que, la IgAs es la clase de inmunoglobulina predominante en el sistema de las mucosas y por lo tanto en el tracto gastrointestinal, jugando un papel importante como primera línea de defensa contra diferentes patógenos. En consecuencia, la mejor respuesta de IgAs que se observa durante la infección por *H. pylori* puede ser el resultado de la estimulación que ocasiona el microorganismo sobre el MALT, y predomina en las secreciones externas, las cuales brindan una protección específica al bloquear a este nivel la penetración de agentes patógenos (20). Al igual que otros microorganismos, *H. pylori* requiere de un proceso de adhesión tisular que le permite acceder a los órganos y tejidos (21). Es, en este proceso inicial donde posiblemente pueda participar como un mecanismo importante de defensa la IgAs anti-*H. pylori*. Por otra parte, la vida media de la IgG (IgG₁, IgG₂, e IgG₄) de casi 21 días (22), le facilita su permanencia en circulación por más tiempo, lo que puede impedir una mejor C.D., particularmente después del tratamiento específico.

El análisis histológico y bioquímico, estándar de oro para la detección de *H. pylori*, requieren de una endoscopia y toma de biopsia, procedimientos invasivos que no siempre son accesibles para el paciente. Aunque existe un método no invasor altamente específico, que es la prueba del aliento

con urea marcada con carbono radioactivo (12), su costo es elevado y el equipo necesario no se encuentra disponible en la gran mayoría de los laboratorios de nuestro país. En consecuencia, los estudios para el diagnóstico de esta infección se orientan en la búsqueda de métodos no invasivos y que a la vez tengan una especificidad y sensibilidad aceptable, y además, que sean económicos. En este sentido, se han enfocado en la búsqueda de anticuerpos en sangre (23), o saliva (24), y antígeno en heces (14) de los individuos infectados.

Debido a la facilidad de colección, particularmente en niños, se ha usado la saliva para determinar la presencia de anticuerpos IgG usando equipos comerciales con resultados variables. La sensibilidad reportada varía desde el 61% (25) hasta el 88% (26) y la ESP desde 58% (27) hasta 81% (28). En cuanto a la determinación de IgAs, solo encontramos algunos informes, a pesar de que la infección induce una respuesta humoral vigorosa tanto sistémica como a nivel de las mucosas. Durante la infección con *H. pylori*, el número de células productoras de IgA aumentan. Las células productoras de IgM e IgG también se detectan, junto con complemento activado (29). Veenendaal y col. (30) encuentran una importante correlación clínica entre IgA e IgG local y sistémica; los autores determinan anticuerpos IgAs anti-*H. pylori* de la mucosa, los cuales muestran una SEN del 98.5%, y ESP de 91.7%, mientras que los de IgG indican 88.3% y 98.6%, respectivamente, resultados que fueron comparables con los obtenidos por cultivos e histología.

En Venezuela se ha reportado que la IgAs en la saliva de niños puede jugar un papel importante en la inmunidad gástrica frente a la infección por

H. pylori, asociado a la cronicidad y fase activa de la gastritis (31). Los datos que aquí se presentan utilizando saliva y determinación de IgAs, pueden ser de utilidad en estudios epidemiológicos ya que la prueba que se describe muestra una SEN, ESP, VPP, VPN, y C.D. (Tabla 2), que le auguran resultado prometedores y que pueden ser de utilidad para el desarrollo de una prueba diagnóstica a través de la selección de antígenos más específicos.

Conclusiones

Existen numerosas técnicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, sin embargo, es necesario mejorar los diferentes ensayos existentes. Las áreas actualmente en desarrollo son las inmunológicas no invasoras, particularmente la definición de anticuerpos en saliva o suero, y de antígeno en heces, el despliegue de técnicas rápidas que puedan ser realizadas cerca del paciente, y el perfeccionar inmunoensayos de ADN para la determinación de *H. pylori* sensible y resistente a los antibióticos. En nuestro estudio la evaluación de IgAs anti-*H. pylori* en saliva evidenció una mayor ESP, SEN, VPP, VPN y C.D. superior a la del equipo comercial de IgG anti-*H. pylori* en suero, tomando como referencia el estándar de oro de endoscopia con estudios histológicos y bioquímicos. Este reporte demuestra que entre las pruebas no invasoras y fácilmente aplicables, destaca la búsqueda de IgAs en saliva por su facilidad de obtención, sensibilidad, especificidad y que además muestra una alta certeza para tamizar pacientes positivos para *H. pylori*.

Correspondencia: Dr. Librado Ortiz-Ortiz
e-mail: orlizfl@hotmail.com

Referencias

1. Blaser, M.J. 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 102:720-727.
2. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., et al. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.*

325:1127-1131.

3. Thiboutot, D.M. 2000. Acne and rosácea. *New and emerging therapies. Dermatol. Clin.* 18:63-71.
4. Greaves, M. 2000. Chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:664-672.
5. Sipponen, P., Hyvärinen. 1993. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 196:3-6.
6. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., et al. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270:17771-17777.
7. Weel, J.F., van der Hulst, R.W., Gerrits, Y., et al. 1996. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J. Infect. Dis.* 173:1171-1175.
8. Pounder, R.E., Ng, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9, suppl. 2:33-39.
9. Wyatt, J.I., Rathbone, B.J. 1988. Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 142:44-49.
10. Luzzza, F., Imeneo, M., Maletta, M., et al. 1995. Isotypic analysis of specific antibody response in serum, saliva, gastric and rectal homogenates of *Helicobacter pylori*-infected individuals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10:285-288.
11. Lee, C.K., Weltzin, R., Thomas, W.D., et al. 1995. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. Dis.* 172:161-172.
12. Ohara, S., Kato, M., Asaka, M., Toyota, T. 1998. Studies of ¹³C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J. Gastroenterol.* 33:6-13.
13. Bode, G., Marchildon, P., Peacock, J., et al. 2002. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: comparison of a salivary immunoglobulin G antibody test with the (¹³C) urea breath test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:493-495.
14. Oderda, G., Rapa, A., Ronchi, B., et al. 2000. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by non-invasive antigen enzyme immunoassays in children: multicentre italian study. *Brit. Med. J.* 320:347-348.

15. Simor, A.E., Lin, E., Saibil, F., et al. 1996. Evaluation of enzyme immunoassay for detection of salivary antibody to *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 34:550-553.
16. Butler, J.E. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay. *En*, G.C. Howard, ed. *Methods in Nonradioactive Detection*. Appleton & Lange.
17. Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Wagner, E.H. 1988. *Clinical epidemiology: the essentials*. 2nd Ed. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 42-75.
18. Dowdy, S., Wearden, S., Chilko, D. 2004. *Statistics for Research*. 3rd Ed. Wiley-Interscience. New Jersey. pp. 179-211
19. Morell, A., Skvaril, F., Nosedá, G., Brandun, S. 1973. Metabolic properties of human IgA subclasses. *Clin. Exp. Immunol.* 13:521-528.
20. Corthesy, B., Spertin, F. 1999. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol. Chem.* 380:1251-1262.
21. Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:449-490.
22. Morell, A., Terry, W.D., Waldmann, T.A. 1970. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J. Clin. Invest.* 49:673-680.
23. de Oliveria, A.M.R., Rocha, G.A., Queiroz, D.M.M., et al. 1999. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 28:157-161.
24. Reilly, T.G., Poxon, V., Sanders, D.S., et al. 1997. Comparison of serum, salivary, and rapid whole blood diagnostic test for *Helicobacter pylori* and their validation against endoscopy based test. *Gut* 40:454-458
25. Huelin, J., Sánchez-Galdón, S., Cárdenas, A., et al. 1996. Estudio comparativo entre Helisal T.M. Rapid Blood y ELISA, Jatrox y anatomía patológica en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 88:825-827.
26. Christie, J.M., McNulty, C.A., Shepherd, N.A., Valori, R.M. 1996. Is saliva serology useful for the diagnosis of *Helicobacter pylori*? *Gut* 39:27-30.
27. Loeb, M.B., Riddell, R.H., James, C., et al. 1997. Evaluation of salivary antibodies to detect infection with *Helicobacter pylori*. *Canad. J. Gastroenterol.* 11:437-440.
28. Fallone, C.A., Elizov, M., Cleland, P., et al. 1996. Detection of *Helicobacter pylori* infection by saliva IgG testing. *Am. J. Gastroenterol.* 91:1145-1149.
29. Velin, D., Michetti, P. 2006. Immunology of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion* 73:116-123.
30. Veenendaal, R.A., Götz, J.M., Schroyen, V., et al. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by specific gastric mucosal IgA and IgG *pylori* antibodies. *J. Clin. Pathol.* 48:990-993.
31. Cavazza, M.E., Correnti, M., Ortiz, D., et al. 2005. Evaluación de los niveles de IgA secretora anti-*Helicobacter pylori* en población infantil venezolana. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 25:24-28.