



REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

Asociación de cepas de *Helicobacter pylori* *cagA*+ con alta actividad de ureasa y dispepsia en adultos mexicanos



M.F. Moreno-Ochoa^a, M.E. Valencia^b, G.G. Morales-Figueroa^b y S.Y. Moya-Camarena^{a,*}

^a Departamento de Nutrición y Metabolismo, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México

^b Departamento de Nutrición Pública y Salud, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México

Recibido el 24 de junio de 2019; aceptado el 9 de septiembre de 2019

Disponible en Internet el 26 de marzo de 2020

PALABRAS CLAVE

Prueba de la ureasa en aliento;
Genotipo *cagA*;
Dispepsia;
Helicobacter pylori

Resumen

Introducción y objetivos: La *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está asociada con un mayor riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico. La presencia de la bacteria no es un factor determinante para el desenlace clínico, sino que la cepa y otros factores del huésped interactúan para determinar el riesgo a adquirir la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue investigar la asociación entre la carga bacteriana, el tipo de cepa y los síntomas gástricos en personas con positividad a *H. pylori*.

Materiales y métodos: En una encuesta dirigida a la comunidad se contactaron 302 voluntarios que no estuvieran tomando antibióticos, antiácidos ni inhibidores de la bomba de protones un mes antes del diagnóstico de *H. pylori* utilizando la prueba de la ureasa en aliento. Se seleccionaron 25 sujetos con edades entre los 25 y los 74 años, positivos a *H. pylori*, para una encuesta de síntomas gástricos y determinar la presencia del genotipo *cagA* en el jugo gástrico obtenido con Entero-test®. La carga bacteriana se determinó como medida de la actividad de la ureasa utilizando el valor ¹³C-delta sobre el valor basal obtenido en la prueba de aliento.

Resultados: El 48% de los sujetos positivos a *H. pylori* fueron *cagA*+. Se encontró una asociación positiva entre el estado de *cagA* y la alta actividad de la ureasa gástrica ($p < 0.0001$), que además resultó significativamente asociada con la presencia de síntomas ($p < 0.0001$).

Conclusión: La actividad de la ureasa gástrica está fuertemente asociada con los síntomas de dispepsia y la presencia de *H. pylori cagA*+. Los valores elevados de ¹³C-delta sobre el valor basal pudieran ser usados como indicadores de mayor riesgo de enfermedad gástrica.

© 2020 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo E. Astiazarán, No. 46, La Victoria, Hermosillo, Sonora, México. C. P. 83304. Teléfono: +52 662 2892400, ext. 322. Fax: +52 662 2800094.

Correo electrónico: moyas@ciad.mx (S.Y. Moya-Camarena).

KEYWORDS

Urea breath test;
cagA genotype;
 Dyspepsia;
Helicobacter pylori

Association of *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains with high urease activity and dyspepsia in Mexican adults

Abstract

Introduction and aims: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is associated with a higher risk of peptic ulcer and gastric cancer. The sole presence of the bacterium is not a determinant of clinical outcome, but rather the interaction of strain type and host factors determines the risk of disease. Our aim was to study the association between bacterial load, strain type, and gastric symptoms in *H. pylori*-positive subjects.

Materials and methods: In a community survey, a diagnostic ¹³C-urea breath test for *H. pylori* was performed on 302 volunteers that were not taking antibiotics, antacids, or proton pump inhibitors one month prior to the test. The breath test produced 25 *H. pylori*-positive subjects, between 25-74 years of age, who then took a gastric symptoms survey and were tested for the presence of the *cagA* genotype in gastric juice, using the Entero-test®. Bacterial load was determined as a measure of urease activity, utilizing the delta over baseline value, obtained in the ¹³C-urea breath test.

Results: A total of 48% of the *H. pylori*-positive subjects were *cagA*+. A positive association was found between *cagA* status and high gastric urease activity ($P < .0001$) and the latter was significantly associated with the presence of symptoms ($P < .0001$).

Conclusion: Gastric urease activity was strongly associated with dyspeptic symptoms and *cagA*+ *H. pylori*. Elevated ¹³C-delta over baseline values could be used as indicators of a higher risk for gastric disease.

© 2020 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción y objetivos

La colonización de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de enfermedades gástricas en el estómago humano¹⁻³, aunque la mayoría de las personas infectadas permanecerá asintomática durante toda su vida. La seroprevalencia de la infección por *H. pylori* reportada en México fue del 66% y la edad fue el factor de riesgo de infección más fuerte⁴. Según el cuarto consenso mexicano sobre *H. pylori*¹, la asociación entre dispepsia funcional e infección por *H. pylori* es controvertida. Varios estudios han evidenciado que la variabilidad genética de *H. pylori* y el huésped⁵, al igual que factores medioambientales, determinan el desenlace clínico⁶. La *H. pylori* es genéticamente diversa, y las cepas de tipo I, las cuales son positivas al gen A asociado a citotoxicidad (*cagA*+) y secretan la citotoxina vacuolizante *VacA*, son las más virulentas^{7,8} y están asociadas con ulceración duodenal^{9,10}, dolor abdominal, sangrado, gastritis activa¹¹, síntomas de dispepsia^{12,13}, daño de ADN en la mucosa gástrica¹⁴ y carcinoma gástrico^{15,16}.

Atherton et al. encontraron evidencia histológica de mayor densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica colonizada por cepas *cagA*+ que en el epitelio colonizado por cepas *cagA*-¹⁷. Otros autores también han encontrado una relación significativa entre la densidad de colonización de *H. pylori* y la presencia de cepas *cagA*+ y *vacAs1*¹⁸⁻²⁰, lo cual demuestra la importancia de la determinación de la carga bacteriana como un predictor de enfermedad gástrica. Perri et al. y Zagari et al. propusieron el uso de ¹³C-delta sobre el valor basal (DOB) como predictor de carga

bacteriana intragástrica y gravedad de gastritis por *H. pylori* en pacientes referidos para endoscopia^{21,22}. Matthews et al. también encontraron que los valores de ¹³C-DOB eran significativamente más altos en sujetos sintomáticos con gastritis antral moderada y grave que en aquellos con gastritis leve o sin inflamación²³. Sin embargo, no encontraron correlación entre la carga de *H. pylori* medida por medio de cultivo bacteriano y los valores ¹³C-DOB²³. Machado et al. reportaron que en niños con síntomas dispépticos, el ¹³C-DOB no señala la gravedad de las medidas histológicas de colonización bacteriana²⁴. La falta de correlación puede ser debida a la diferencia de virulencia entre cepas de *H. pylori* o debido a los estimados de densidad bacteriana (por medio de cultivo bacteriano²² o estimación histológica²⁴), los cuales no son indicativos de la carga real de *H. pylori* en la mucosa.

La prueba del aliento con urea marcada con ¹³C es la más sensible y específica para determinar la presencia de *H. pylori*¹. Utiliza el valor ¹³C-DOB como el criterio de corte, el cual es indicativo de la actividad de la ureasa y, en consecuencia, de la carga bacteriana. La determinación de la virulencia de la cepa de *H. pylori* es posible por medio de análisis moleculares e inmunológicos complementarios. Planteamos la hipótesis de que un valor ¹³C-DOB más alto, además de indicar la carga bacteriana, podría también indicar la presencia del genotipo *cagA*+. Así, el objetivo principal de nuestro estudio fue investigar la asociación entre la actividad de la ureasa gástrica (¹³C-DOB), los síntomas de dispepsia y la *cagA*+ *H. pylori* en una población abierta. También exploramos la relación entre las variables sociodemográficas con la presencia de *H. pylori* y determinamos las variables que explicaban mejor el valor de ¹³C-DOB.

Materiales y métodos

Poblaciones de estudio

Se seleccionó a 302 personas que no estaban tomando anti-bióticos, antiácidos o inhibidores de la bomba de protones por medio de una encuesta comunitaria en el norte de México (Hermosillo, Sonora) para que hicieran una prueba de la ureasa en aliento para *H. pylori* (dentro del marco temporal de junio a noviembre del 2004). Veinticinco de dichos individuos dieron positivo para *H. pylori*, con un rango de edad de 25-74 años (media de 34 años), y fueron elegidos aleatoriamente para completar una encuesta sobre síntomas gástricos y proporcionar una muestra de jugo gástrico utilizando el Entero-test® (Enterotest HP, HDC Corporation, San Jose, CA, EE. UU.).

Los sujetos eran clínicamente sintomáticos, presentando 2 o más síntomas de enfermedad péptica, tales como dolor epigástrico, ardor epigástrico, pesadez posprandial, saciedad precoz, inflamación, eructos, náuseas y vómitos. La cronicidad, la variedad o la intensidad de los síntomas no fueron considerados en el cuestionario.

Datos sociodemográficos

Se evaluó el nivel educativo de acuerdo con la siguiente escala: 1, primaria; 2, secundaria; 3, preparatoria; 4, semi-profesional; 5, profesional; 6, posgrado. El ingreso familiar fue expresado en unidades de salario mínimo mensual. Con base en los datos de la literatura relevante, se calculó una puntuación para el riesgo de presentar *H. pylori* con relación a la condición socioeconómica. El nivel educativo, el empleo, el ingreso familiar, las características de la vivienda (material de construcción de la vivienda, techo y piso, presencia y tipo de sistema de drenaje y agua potable en el hogar), el hacinamiento (3 o más personas compartiendo una habitación), la presencia de animales domésticos dentro o fuera de la casa y la crianza de animales fueron considerados para la puntuación. Las características asociadas con un alto riesgo de presentar *H. pylori* fueron codificadas numéricamente (sin riesgo: 0-2; riesgo moderado: 3-5; riesgo alto > 5).

Detección del estatus de *Helicobacter pylori*

El estatus de *H. pylori* fue determinado por medio de la prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C . Se obtuvieron muestras de aliento antes, 30 y 45 min después de la administración de 50 mg de ureasa etiquetada ^{13}C , en conjunto con jugo natural de naranja, para obtener condiciones gástricas de acidez. La prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C tiene un 98% de sensibilidad. La ureasa secretada por la *H. pylori* en el estómago hidroliza la urea para liberar $^{13}\text{CO}_2$ de la urea etiquetada ingerida, la cual entra en el bicarbonato corporal y se excreta en el aliento. Medimos la razón de $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ por medio de espectrometría de masas de razón de isótopos (BreathMAT Plus, 1998, Finnigan MAT GmbH, Bremen, Alemania) y expresamos los resultados en razones de intensidad ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, 45/44). La ^{13}C -DOB fue considerada positiva cuando *H. pylori* era $\geq 3.5\%$.

Identificación de cepas *cagA+* de *Helicobacter pylori*

Las muestras de jugo gástrico fueron obtenidas de los sujetos *H. pylori* positivos después de un ayuno nocturno, utilizando una prueba del hilo (Entero-test® prueba pediátrica, Entero-test HP, HDC Corporation, San Jose, CA, EE. UU.). La prueba consistió en la ingestión de 90 cm de fibra de nailon en una cápsula de gelatina de 2.5 cm de largo que se disuelve en el estómago. El hilo permaneció en el estómago durante una hora, después de la cual fue recuperada por vía oral y colocada en 15 ml de solución salina para aislamiento de ADN.

El hilo fue sacudido vigorosamente en solución salina y centrifugado para la extracción del ADN del pellet resultante utilizando un Mini Kit QIAamp® DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA, EE. UU.). El ADN se sometió a amplificación mediante PCR de los genes *glmM* y *cagA*, utilizando los siguientes primers: *cagA*-F: 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'; *cagA*-R: 5'-AGAAACAAAAGCAATACGATCATTC-3'; tamaño de producto: 120 bp²⁵; *glmM*-F: 5'-GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG-3'; *glmM*-R: 5'-GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC-3'; tamaño de producto: 300 bp²⁶.

Se utilizaron gránulos PCR PuReTaq Ready-To-Go™ (Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EE. UU.) para la amplificación de PCR. Cada gránulo PCR reconstituido a 25 μl contenía 10 pmol de primadores *cagA*-F y *cagA*-R o *glmM*-F y *glmM*-R (Sigma-Genosys, Spring, TX, EE. UU.), 200 μM de desoxi nucleósidos trifosfatos, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl y aproximadamente 100 ng de ADN genómico. Se realizaron 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C. Los productos PCR fueron visualizados por medio del procedimiento estándar de electroforesis en 2% de geles de agarosa²⁷.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el Windows Number Cruncher Statistical System (Kaysville, UT, EE. UU.). La estadística descriptiva fue utilizada para caracterizar a la población estudiada. Se realizó un análisis de correlación para encontrar asociaciones entre las variables sociodemográficas y los marcadores de infección con *H. pylori*, ajustando por sexo (mujer, 0; hombre, 1) y edad. Para determinar las variables que explicaron mejor la carga bacteriana (^{13}C -DOB), desarrollamos un modelo que incluyó las siguientes variables en el proceso de selección: ingreso familiar, hacinamiento, características de casa habitación, cepa *cagA+* *H. pylori* (ausente, 0; presente, 1) y la presencia de síntomas (ausentes, 0; presentes, 1), ajustados por sexo y edad.

Resultados

En la [tabla 1](#) se muestran las características sociodemográficas de los participantes. Solo uno de los 25 participantes identificados como positivos por medio de la prueba del aliento dio negativo en la amplificación PCR para *glmM*, el marcador genético de *Helicobacter*.

Tabla 1 Características sociodemográficas de los sujetos

Edad (años)	34.5
Rango	25-74
Sexo, n	
Femenino	7
Masculino	18
Nivel educativo ^a	6
Ingreso mensual familiar (salario mínimo)	5-10
Porcentaje de participantes en riesgo de presentar <i>H. pylori</i> relacionado con condición socioeconómica ^b	
Sin riesgo	44
Riesgo moderado	44
Riesgo alto	12

^a El nivel educativo fue evaluado utilizando la siguiente escala: 1, primaria; 2, secundaria; 3, preparatoria; 4, semiprofesional; 5, profesional; 6, posgrado.

^b Calculado en la forma descrita en la sección de Materiales y métodos, considerando el nivel educativo, empleo, ingreso familiar, características de casa habitación, hacinamiento, la presencia de animales dentro o fuera de la casa, y la crianza de animales. Las características asociadas con un alto riesgo de presentar *H. pylori* fueron codificadas numéricamente (los valores finales fueron: sin riesgo, 0-2; riesgo moderado, 3-5; y riesgo alto > 5).

Se encontraron cepas *cagA*+ de *H. pylori* en el 48% de los sujetos. Al dividir por presencia de síntomas, el 66% de los sujetos sintomáticos tenía cepas *cagA*+ *H. pylori* frente al 33% de los sujetos asintomáticos. La presencia de cepas *cagA*+ *H. pylori* estuvo significativamente asociada con los síntomas de dispepsia ($r=0.42$; $p=0.003$) y asociada negativamente con el nivel educativo ($r=-0.44$; $p=0.001$) (tabla 2).

Una actividad alta de la ureasa estuvo asociada con síntomas, dado que el 87.5% de los participantes positivos para *H. pylori* con alta actividad gástrica de ureasa (valores $^{13}\text{C-DOB} > 20\%$) tenían síntomas de dispepsia, frente al 35% de los sujetos positivos para *H. pylori* con ureasa gástrica baja (valores $^{13}\text{C-DOB} < 20\%$) y el 12% de los sujetos negativos para *H. pylori*.

La actividad gástrica de la ureasa, la cual es un marcador de carga de *H. pylori*, mostró una asociación significativa con la presencia de dispepsia ($r=0.55$; $p<0.0001$) y cepas de *cagA*+ *H. pylori* ($r=0.53$; $p<0.0001$) (tabla 2).

Las variables que explicaron mejor el valor $^{13}\text{C-DOB}$ fueron la presencia de síntomas ($p=0.0003$), la cepa *cagA*+ *H. pylori* ($p=0.0004$) y el ingreso familiar ajustado por edad y sexo ($p<0.01$) (tabla 3).

Discusión y conclusiones

La presencia de cepas *cagA*+ *H. pylori* estuvo asociada con el *cagA*+ y el nivel educativo ($r=-0.44$; $p=0.001$). En otras palabras, los portadores de *cagA*+ *H. pylori* tenían un nivel educativo más bajo que los portadores de *cagA*- *H. pylori*.

El gen *cagA* es un marcador de la isla de patogenicidad *cag* y su presencia está asociada con enfermedades más graves^{11,28,29}. La inyección de proteína *cagA* en células epiteliales gástricas afecta su proliferación, migración y adhesión, al igual que a otras vías de transducción de señales relacionadas con respuestas proinflamatorias, e induce la interleucina-8 vía señales de NF- κ B²⁹. Encontramos una asociación entre la colonización *cagA*+ *H. pylori* y la presencia de síntomas. Loffeld et al. encontraron resultados similares en pacientes con *cagA*+ *H. pylori* que presentaban más síntomas de dispepsia que pacientes con cepas de *cagA*- *H. pylori*³⁰.

Al utilizar la actividad de la ureasa gástrica como indicador de intensidad de colonización o de carga bacteriana²², encontramos que una mayor actividad gástrica estaba correlacionada con más síntomas, coincidiendo con resultados reportados por otros¹⁷⁻²².

La principal limitación del presente estudio fue su tamaño de muestra pequeño. Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, es el primer análisis que investiga y muestra una asociación positiva entre $^{13}\text{C-DOB}$ y cepas *cagA*+ *H. pylori*, lo cual evidencia que un valor elevado de $^{13}\text{C-DOB}$ podría ser indicativo de patogenicidad. Otra limitación de nuestro estudio fue el hecho de que la cronicidad, la variedad o la intensidad de los síntomas dispépticos no fueron incluidos, lo cual no permitió hacer un examen a mayor

Tabla 2 Coeficientes de correlación y valores p del análisis de correlación (ajustado por edad y sexo) para asociaciones entre variables sociodemográficas y marcadores de infección por *H. pylori*

	<i>cagA</i> +	Actividad de ureasa gástrica ($^{13}\text{C-DOB}$)	Nivel educativo	Ingreso familiar	<i>H. pylori</i> +
Síntomas dispépticos	0.42 $p=0.003$	0.55 $p<0.0001$	-0.29 $p=0.04$	0.33 $p=0.02$	0.51 $p=0.0003$
<i>cagA</i> +		0.53 $p<0.0001$	-0.44 $p=0.001$	0.21 NS	0.50 $p=0.0002$
Actividad de ureasa gástrica ($^{13}\text{C-DOB}$)			-0.19 NS	-0.08 NS	0.81 $p<0.0001$
Nivel educativo				-0.34 $p=0.016$	-0.20 NS
Ingreso familiar					0.12 NS

DOB: delta sobre el valor basal; NS: no significativo.

Tabla 3 Análisis de regresión multivariante para evaluar la actividad de la ureasa gástrica

Variable dependiente	Variable independiente	$\beta \pm EE$	p
Actividad de ureasa gástrica (^{13}C -DOB)	Intercept	-3.02 ± 5.06	0.55
	Síntomas	10.93 ± 2.7	0.0003
	Cepa <i>cagA+</i> <i>H. pylori</i>	11.63 ± 3.02	0.0004
	Ingreso familiar	-3.99 ± 1.45	0.0090
	Sexo	-3.24 ± 2.38	0.1809
	Edad	0.23 ± 0.12	0.0719

DOB: delta sobre el valor basal; $\beta \pm EE$: coeficiente de regresión \pm error estándar. $R^2 = 0.5396$ ($p < 0.0001$).

profundidad de la asociación entre la actividad de la ureasa, la cepa *H. pylori* y los síntomas.

En conclusión, nuestros datos apoyan la asociación entre la alta actividad de la ureasa (valores elevados de ^{13}C -DOB), la colonización *cagA+* y la presencia de síntomas gástricos. Los valores altos de ^{13}C -DOB en los pacientes podría ser un criterio para realizar la identificación del genotipo de *H. pylori* y tomar la decisión de iniciar tratamiento clínico. Se requieren más estudios que ayuden a establecer un posible valor de corte para el riesgo de enfermedad.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Nuestro estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., con base en los estándares internacionales manifestados en la Declaración de Helsinki y en la Regulación Legal General de Salud relacionada con la Investigación en materia de Salud del estado de Sonora, México.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que trataron la información de todos los pacientes con confidencialidad y anonimidad, siguiendo los protocolos de su centro de trabajo.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Todos los participantes firmaron consentimientos informados escritos con anterioridad a la participación en el estudio. Se garantizó la estricta confidencialidad de los datos y los autores declaran que la información contenida en el presente estudio no permite la identificación de los participantes.

Financiación

El presente trabajo fue apoyado por el Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología en América Latina-Organismo Internacional de la Energía Atómica (ARCAL-OIEA), beca# ARCAL-RLA/6/042. MFMO recibió financiación de CONACYT No. de registro 42473 (México).

Autoría

M.F. Moreno-Ochoa participó en la recogida, análisis e interpretación de datos y aprobó la versión final del manuscrito. M.E. Valencia participó en la concepción y el diseño del estudio, el análisis y la interpretación de los datos, la realización del borrador del manuscrito y aprobó la versión final del

manuscrito. G.G. Morales-Figueroa participó en el análisis y la interpretación de los datos y aprobó la versión final del manuscrito. S.Y. Moya-Camarena participó en la concepción y el diseño del estudio, el análisis y la interpretación de los datos, el borrador del manuscrito y aprobó la versión final del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los participantes del estudio, a Bertha Isabel Pacheco Moreno, Ana Cristina Gallegos Aguilar y María Guadalupe Galaz Sánchez por su excelente asistencia técnica, y a la Dra. María Gloria Domínguez-Bello por sus contribuciones clave para la preparación del estudio.

Referencias

- Bosques-Padilla FJ, Remes-Troche JM, Gonzalez-Huezo MS, et al. The fourth Mexican consensus on *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol Mex.* 2018;83:325–41.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100:1–441.
- Moller H, Heseltine E, Vainio H, Working group report on schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* 1995;60:587–9.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis.* 1998;178:1089–94.
- Martinez-Campos C, Torres-Poveda K, Camorlinga-Ponce M, et al. Polymorphisms in IL-10 and TGF-beta gene promoter are associated with lower risk to gastric cancer in a Mexican population. *BMC Cancer.* 2019;19:453.
- Argent RH, Thomas RJ, Aviles-Jimenez F, et al. Toxigenic *Helicobacter pylori* infection precedes gastric hypochlorhydria in cancer relatives, and *H. pylori* virulence evolves in these families. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2227–35.
- Bravo LE, van Doorn LJ, Realpe JL, et al. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the African enigma? *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2839–42.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14648–53.

9. Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, et al. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1496–500.
10. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, et al. Characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:41–5.
11. Yahav J, Fradkin A, Weisselberg B, et al. Relevance of CagA positivity to clinical course of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3534–7.
12. Jiménez F, Demaria JL, Ahumada C, et al. [Seroprevalence of *Helicobacter pylori*, anti-cagA antibodies and its relationship with epidemiologic factors in Santa Fe] Spanish. *Acta Gastroenterol Lationam.* 2004;34:16–20.
13. Noyan V, Apan TZ, Yucel A, et al. Cytotoxin associated gene A-positive *Helicobacter pylori* strains in dyspeptic pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;116:186–9.
14. Ladeira MS, Rodrigues MA, Salvadori DM, et al. Relationships between cagA, vacA, and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. *Environ Mol Mutagen.* 2004;44:91–8.
15. Pormohammad A, Ghotaslou R, Leylabadlo HE, et al. Risk of gastric cancer in association with *Helicobacter pylori* different virulence factors: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2018;118:214–9.
16. Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, et al. Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer.* 1998;78:298–300.
17. Atherton JC, Tham KT, Peek RM Jr, et al. Density of *Helicobacter pylori* infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology. *J Infect Dis.* 1996;174:552–6.
18. Lv YP, Teng YS, Mao FY, et al. *Helicobacter pylori*-induced IL-33 modulates mast cell responses, benefits bacterial growth, and contributes to gastritis. *Cell Death Dis.* 2018;9:457.
19. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol.* 2001;158:647–54.
20. Raghavan S, Holmgren J. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44:121–7.
21. Perri F, Clemente R, Pastore M, et al. The 13C-urea breath test as a predictor of intragastric bacterial load and severity of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998;58:19–27.
22. Zagari RM, Pozzato P, Martuzzi C, et al. 13C-urea breath test to assess *Helicobacter pylori* bacterial load. *Helicobacter.* 2005;10:615–9.
23. Matthews GM, Cummins AG, Lawrence A, et al. 13C-urea breath test: Reproducibility and association with the severity of *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:270–4.
24. Machado RS, Kawakami E, da Silva Patricio FR, et al. Urease activity does not reflect the degree of colonization by *Helicobacter pylori* in children. *Pediatr Int.* 2006;48:398–402.
25. Rugge M, Busatto G, Cassaro M, et al. Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer.* 1999;85:2506–11.
26. Kansau I, Raymond J, Bingen E, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol.* 1996;147:661–9.
27. Sambrook JE, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
28. Auttajaroon J, Chotivitayatarakorn P, Yamaoka Y, et al. CYP2C19 genotype, CagA genotype and antibiotic resistant strain of *Helicobacter pylori* infection. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20:1243–7.
29. Brandt S, Kwok T, Hartig R, et al. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:9300–5.
30. Loffeld RJ, Werdmuller BF, Kusters JG, et al. Functional dyspepsia is associated with cagA-positive *Helicobacter pylori* strains. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36:351–5.