



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE**

**UNIDES – MANAGUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**Coinfección por virus del Epstein Barr y H. pylori en trastornos  
gastroduodenales: Una revisión sistemática y metaanálisis.**

**AUTORES:**

**Br. Ramsés Alí Dávila Collado**

**Br. Oscar Antonio Jarquín Durán**

**TUTOR:**

**Dr. José Luis Espinoza, MD, PhD.**

**Managua, Nicaragua, mayo 2020**

# INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>OPINIÓN DEL TUTOR</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ACRÓNIMOS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>2</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<i>Objetivo primario</i> .....	<i>6</i>
<i>Objetivos específicos</i> .....	<i>6</i>
<b>VI. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
BIOLOGÍA Y ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN POR H. PYLORI AND EBV.....	7
ASOCIACIÓN CLÍNICA .....	10
MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL EBV .....	13
<i>Prueba serológica</i> .....	<i>13</i>
<i>Detección basada en PCR / PCR en tiempo real</i> .....	<i>14</i>
MÉTODOS DE DETECCIÓN PARA HELICOBACTER PYLORI .....	15
<i>Prueba serológica</i> .....	<i>15</i>
<i>Prueba de aliento de urea (UBT)</i> .....	<i>16</i>
<i>Prueba de antígeno en heces (SAT)</i> .....	<i>16</i>
<i>Infección por EBV a células epiteliales gástricas</i> .....	<i>16</i>
PATOGENIA DE LA INFECCIÓN .....	17
<i>Bajo tropismo de la infección por EBV a través de la ruta oral a Boca de células epiteliales orofaríngeas.</i> .....	<i>17</i>
<i>La liberación lítica de EBV de las células B tiene un alto tropismo para infectar otras células epiteliales.</i> .....	<i>18</i>

	<i>Infeción por Helicobacter Pylori en células epiteliales gástricas</i> .....	18
	<i>Metilación</i> .....	19
	FACTORES EBV Y H. PYLORI QUE CONTRIBUYEN AL DESARROLLO DE GC.....	21
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
	REVISIÓN SISTEMÁTICA NARRATIVA .....	23
	<i>Selección de estudios y extracción de datos</i> .....	24
	METAANÁLISIS DE PROPORCIÓN PARA ESTIMAR LA PREVALENCIA DE COINFECCIÓN .....	25
	<i>Selección de estudios y extracción de datos</i> .....	25
	<i>Estudios incluidos</i> .....	25
<b>VIII.</b>	<b>OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES</b> .....	<b>27</b>
<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
	PRINCIPALES RESULTADOS DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA NARRATIVA (ARTÍCULO I) .....	30
	RESULTADOS DEL METANÁLISIS (ARTÍCULO II).....	30
	<i>Prevalencia de la población con trastornos gastroduodemales</i> .....	30
	<i>Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales premalignos</i> . ....	31
	<i>Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales malignos</i> . ....	31
<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>35</b>
<b>XII.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y FUTURAS LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>XIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXO</b>	.....	<b>50</b>
	ARTÍCULOS ORIGINALES .....	50
	TABLE 1. SEROLOGICAL PARAMETERS AND INTERPRETATION FOR ASSESSING EPSTEIN–BARR VIRUS (EBV) INFECTION STATUS	51
	TABLE 2. PREVALENCE OF EBV AND HP CO-INFECTION (SEROLOGICAL STUDIES). ....	52
	TABLE 3. PREVALENCE OF EBV AND H. PYLORI CO-INFECTION (MICROBE DETECTION IN GASTRIC TISSUES). ....	49
	TABLE 5. TEST FOR HETEROGENEITY IN THE POPULATION WITH GASTRODUODENAL DISORDERS .....	51
	TABLA 6. ESTIMATES OF PREVALENCE AND HETEROGENEITY ACCORDING TO BENIGN GASTRODUODENAL DISORDERS .....	52
	TABLE 7. TEST FOR HETEROGENEITY IN THE POPULATION WITH BENIGN GASTRODUODENAL DISORDERS .....	52
	TABLE 8. ESTIMATES OF PREVALENCE AND HETEROGENEITY ACCORDING TO PREMALIGNANT GASTRODUODENAL DISORDERS ...	53
	TABLE 9. TEST FOR HETEROGENEITY IN THE POPULATION WITH PREMALIGNANT GASTRODUODENAL DISORDERS .....	53
	TABLE 10. ESTIMATES OF PREVALENCE AND HETEROGENEITY ACCORDING TO MALIGNANT GASTRODUODENAL DISORDERS .....	54
	TABLE 11. TEST FOR HETEROGENEITY IN THE POPULATION WITH MALIGNANT GASTRODUODENAL DISORDERS .....	54

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradecemos a nuestro tutor, doctor José Luis Espinoza, por su apoyo incondicional, guiarnos en este proceso, brindarnos la oportunidad de publicar nuestro primer artículo en una revista médica con alto impacto científico.*

*Agradecemos a todas las personas involucradas en nuestra formación académica, que contribuyeron a nuestro crecimiento profesional y personal, de igual manera el apoyo incondicional de nuestra familia que fueron piezas claves en la culminación de este proceso de aprendizaje.*



## RESUMEN

A partir de la evidencia publicada en la literatura científica se ha hipotetizado que en una proporción considerable de pacientes que presentan trastornos gastroduodenales y que luego desarrollan lesiones premalignas y malignas, estaba presente la coexistencia de EBV y H. pylori. Sin embargo hasta la fecha realmente se desconoce la verdadera prevalencia de dicha coinfección en este tipo de pacientes. Por lo tanto el objetivo de esta tesis fue documentar la evidencia disponible en la literatura de la frecuencia de coinfección por EBV y H. pylori y estimar su prevalencia en pacientes adultos con trastornos gastrointestinales. Esta tesis está conformada a partir de los resultados de dos artículos. El primero fue una revisión sistemática narrativa de publicación científicas en revistas indexadas en las principales bases datos internacionales, a partir de la cual se identificaron 679 artículos publicados hasta el 30 de agosto del 2019 y de estos se seleccionaron 9 artículos cumplieron con la principal finalidad de presentar la frecuencia de la coinfección del EBV y H. pylori en los trastornos gastroduodenales no malignos. En un segundo momento se realizó actualización de la primera revisión sistemática evaluándose artículos publicados hasta el 17 de abril del 2020, llevándose a cabo un metaanálisis para estimar la prevalencia de coinfección, seleccionándose 6 estudios que cumplieron con los criterios de selección. A partir de la primera revisión se documentó una frecuencia considerable de la coexistencia de ambos patógenos. En todos los estudios que se indagó coinfección se detectó algún porcentaje de dicha coinfección, la cual varió entre cerca del 2% hasta el 34% de la población investigada en los diversos estudios. El metaanálisis estimó una prevalencia de coinfección por EBV y H. pylori en cualquier tipo de trastornos gastroduodenal del 23% (IC95% 20.8%-25.3%), en trastornos gastroduodenales benignos de 17.9% (IC95% 15.1-20.9), en premalignos de 61.2% (IC 95% 52.5-69.4) y malignos de 20% (IC16.9-23.6). Es necesario llevar estudios a nivel comunitario para confirmar la prevalencia estimada y realizar estudios analíticos que permitan establecer la asociación causal entre la coinfección por EBV y H. pylori y el desarrollo de trastornos gastroduodenales premalignos y malignos.

## OPINIÓN DEL TUTOR

Autores: Ramsés Dávila-Collado y Oscar Jarquín-Durán

Estudios a nivel clínico y experimental han demostrado que el cáncer es un proceso que se desarrolla gradualmente, a lo largo de un período que puede ser de varios meses o años, dependiendo del tipo de tumor. Durante ese proceso que culmina con el desarrollo del cáncer la ocurrencia de un proceso inflamatorio crónico y persistente parece ser un evento común que antecede a la etapa de “malignización” en varios tipos de cáncer. Debido a que el virus de Epstein-Barr (EBV) y *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) son dos agentes patógenos que causan procesos inflamatorios en el estómago y que ambos microorganismos han sido asociados con el desarrollo de varios cánceres, incluyendo el cáncer de estómago, en el presente estudio se realizó una revisión sistemática mediante la cual se revisó y analizó exhaustivamente múltiples artículos publicados en la literatura internacional en los que se había documentado la presencia de los dos patógenos (EBV y *H. pylori*) en pacientes con trastornos gastroduodenales no cancerosos, incluyendo gastritis, enfermedad de úlcera péptica y dispepsia.

La fortaleza de este estudio radica en la amplia búsqueda de referencias que se realizó, así como en la utilización de criterios de selección bien definidos y el diseño de un instrumento de recolección de datos que permitió estratificar los estudios seleccionados y analizar apropiadamente los datos relevantes.

Durante el curso de este estudio los estudiantes han podido ejercitar sus conocimientos sobre investigación científica y clínica. Además, el estudio ha sido un excelente instrumento para profundizar en los aspectos científicos relacionados con las patologías en cuestión y los patógenos involucrados y sobre todo ha sido una autopista para entrar en el fascinante mundo de la publicación de artículos científicos ya que, habiendo sido evaluado por expertos internacionales en la materia, el artículo ha sido publicado en una revista científica internacional.

Atentamente

Jorge Luis Espinoza, Hematología y Oncología

## LISTA DE ACRÓNIMOS

EBV	Epstein-Barr virus
NMGDs	non-malignant gastroduodenal disorders
PUD	Peptic ulcer disease
GERD	gastroesophageal reflux disease
NSAIDS	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
FD	functional dyspepsia
BabA	blood group antigen binding adhesion
OipA	outer inflammatory protein A
SabA	sialic acid-binding adhesion
VacA	vacuolating cytotoxin A
CagA	cytotoxin associated gene A
CTL	cytotoxic T lymphocytes
NK	natural killer cells
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alfa
IFN- $\alpha$	interferon-alfa
TLR9	toll-like receptor 9
MMP-1	matrix metalloprotease-1
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
EBER	EBV-encoded RNA
EBNA	Epstein–Barr nuclear antigens
VCA	viral capsid antigen



EA	early antigen
PMNC	Polymorphonuclear cells
MNC	mononuclear cells
NAG	Non-atrophic gastritis
BZLF1	BamHI Z Leftward reading Frame 1
BARF1	means BamHI A rightward open-reading frame-1
HCMV	human cytomegalovirus

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resultados serológicos e interpretación.....	14
Tabla 2. Respuesta celular.....	20
Tabla 3. Interacción gene - huesped.....	21
Figura 1. Coinfección por EBV y H. pylori en el estómago. Estómago infectado con EBV y H. pylori. Algunas de las células epiteliales gástricas coinfectadas con EBV y H. pylori. Además, esta coinfección se convierte en un desarrollo agresivo de carcinoma.....	13

## I. INTRODUCCIÓN

Varios estudios han documentado la presencia simultánea de EBV y H. pylori en muestras de cáncer gástrico (que van del 6% al 12%) y la importancia de la coinfección con ambos patógenos en el cáncer gástrico también se ha evaluado en un metaanálisis previo [10-13].

Teniendo en cuenta que la inflamación persistente está asociada con el desarrollo de cáncer [14], se puede especular que las personas que desarrollan cáncer gástrico en asociación con EBV o H. pylori pueden presentar algún grado de inflamación de la mucosa.

De hecho, varios estudios han investigado el papel potencial de la coinfección por H. pylori y EBV en el desarrollo de gastritis y otros trastornos gastroduodenales no malignos (NMGD), incluidos PUD, dispepsia y ERGE, aunque hasta ahora se han informado resultados variables.

A partir de la evidencia publicada en la literatura científica se ha hipotetizado que en una proporción considerable de pacientes que presentan trastornos gastroduodenales y que luego desarrollan lesiones premalignas y malignas, estaba presente la coexistencia de EBV y H. pylori. Sin embargo hasta la fecha realmente se desconoce la verdadera prevalencia de dicha coinfección en este tipo de pacientes.

Por lo tanto el objetivo de esta tesis fue documentar la evidencia disponible en la literatura de la frecuencia de coinfección por EBV y H. pylori y estimar su prevalencia en pacientes adultos con trastornos gastrointestinales.

Esta tesis está conformada a partir de los resultados de dos artículos. El primero fue una revisión sistemática narrativa de publicación científicas en revistas indexadas en las principales bases datos internacionales y en un segundo momento se realizó actualización de la primera revisión sistemática evaluándose artículos publicados hasta el 17 de abril del 2020, llevándose a cabo un metaanálisis para estimar la prevalencia de coinfección.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta abril del año 2020 no había publicaciones en la que se estimara la prevalencia de coinfección por virus del Epstein Barr y H. pylori en trastornos gastroduodenales. La información disponible procede de estudios de casos hospitalarios, por lo tanto nos planteas dos preguntas de investigación:

¿Existe evidencia de coinfección por virus del Epstein Barr y H. pylori en trastornos gastroduodenales?

¿Cuál es la prevalencia global y según tipo de trastorno gastroduodenal de coinfección por virus del Epstein Barr y H. pylori?

### III. ANTECEDENTES

La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en todo el mundo es aproximadamente del 50%, tan alta como 80% –90% en los países en vía de desarrollo, y cerca del 35% –40% en países desarrollados. Aproximadamente el 20% de las personas infectadas con *H. pylori* desarrollan trastornos gastroduodenales relacionados durante su vida. *H. pylori* es un agente etiológico de la enfermedad de úlcera péptica, gastritis primaria, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica y adenocarcinoma gástrico. La incidencia anual de infección por *H. pylori* es 4% a 15% en países en desarrollo, en comparación con aproximadamente 0.5% en países industrializados. Los factores de riesgo documentados incluyen un bajo nivel socioeconómico, hacinamiento, saneamiento o higiene deficientes y vivir en un país en desarrollo.

Además, la tasa de infección de los niños en los países en desarrollo es más alta que en los países avanzados, 80% en comparación con el 10%, a la edad de 20 años, mientras que las personas mayores en ambos tipos de países tienen alrededor del 50% de infección a los 60 años de edad.

En el conjunto de datos Global Burden of Disease 2010 para determinar la carga global de cada neoplasia maligna atribuible a EBV en hombres y mujeres en 20 grupos de edad diferentes y 21 regiones del mundo desde 1990 hasta 2010. El análisis mostró que la carga global combinada de muertes en 2010 de todas las neoplasias malignas atribuibles al VEB fueron 142.979, lo que representa el 1,8% de todas las muertes por cáncer. Esta carga ha aumentado en un 14,6% en un período de 20 años. Los 5 tumores malignos atribuibles al EBV fueron más comunes en hombres en todas las regiones geográficas (proporción de 2.6: 1). El cáncer gástrico y el carcinoma nasofaríngeo representaron el 92% de todas las muertes por cáncer atribuibles al VEB. Casi el 50% de los tumores malignos atribuidos a EBV ocurrieron en el este de Asia. Esta región también tuvo las tasas de mortalidad estandarizadas por edad más altas tanto para carcinoma nasofaríngeo como para GC. Aproximadamente 143,000 muertes en 2010 fueron atribuidas a neoplasias

asociadas con EBV. Es probable que esta cifra sea una subestimación ya que algunas de las neoplasias malignas asociadas al EBV menos prevalentes no se han incluido. Además, el aumento global de la población y la esperanza de vida aumentarán aún más la carga general de las muertes por cáncer asociadas al VEB.

El cáncer gástrico (GC) o cáncer de estómago es el quinto más incidente de cáncer común y la tercera causa principal de mortalidad asociada al cáncer, contribuyendo con 6.8% del total de casos de cáncer y 8.8% del total de muertes asociadas con cáncer en todo el mundo. Se estima que en 2013 se contabilizaron 984,000 casos nuevos (proporción 2: 1, hombres versus mujeres) y 841,000 muertes relacionadas con GC. Aproximadamente, el 77% de los casos relacionados con GC y la muerte ocurren en países en desarrollo, particularmente en Asia Oriental, mientras que 23 % ocurre en naciones desarrolladas.

H. pylori y EBV representan aproximadamente el 80% y el 10%, respectivamente, de GC en todo el mundo. La GC asociada al EBV se encuentra en el cardias (58%), no cardíaca (42%), mientras que la GC asociada con solo H. pylori es en su mayoría adenocarcinoma de tipo no cardíaco. H. pylori es ahora una causa conocida y primaria de GC, específicamente cáncer no cardíaco, y se declara como carcinógeno I para los humanos. Ahora se sabe que H. pylori está relacionado con el cáncer de estómago en muchos estudios junto con el VEB.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Estudios a nivel clínico y experimental han demostrado que el cáncer es un proceso que se desarrolla gradualmente, a lo largo de un período que puede ser de varios meses o años, dependiendo del tipo de tumor. Durante ese proceso que culmina con el desarrollo del cáncer la ocurrencia de un proceso inflamatorio crónico y persistente parece ser un evento común que antecede a la etapa de “malignización” en varios tipos de cáncer.

Aunque hasta la fecha se han publicado algunos metaanálisis que evalúan la asociación de H. pylori o EBV con cáncer gástrico, e incluso una revisión sistemática que revisó los artículos que informan sobre la tasa de coinfección con ambos patógenos en el cáncer gástrico de los pacientes [12, 27,59].

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que revisa sistemáticamente la literatura que prueba la asociación entre H. pylori o coinfección por EBV con NMGD.

## V. OBJETIVOS

En este contexto nos planteamos un objetivo primario y dos objetivos secundarios:

### ***Objetivo primario***

Estimar la prevalencia de coinfección por virus del Epstein Barr y H. pylori en trastornos gastroduodenales

### ***Objetivos específicos***

1. Identificar las principales áreas geográficas de procedencia de las publicaciones disponibles
2. Comparar la prevalencia estimada de coinfección según subtipo de trastorno gastroduodenal.



## VI. MARCO TEÓRICO

### **Biología y asociación de la infección por H. pylori and EBV**

H. pylori es una bacteria gramnegativa en forma de espiral que ha desarrollado varios mecanismos para Sobrevive en el ambiente ácido del estómago humano. Más del 50% de la población mundial. Tiene H. pylori en su tracto gastrointestinal superior, con variaciones geográficas considerables, con una mayor prevalencia en países de bajos ingresos.

Se adquiere la infección con H. pylori (típicamente durante la primera infancia) por la ingestión de alimentos o agua contaminados y es asintomático en al 90% de las personas, sin embargo, algunas personas desarrollan gastritis aguda, que puede espontáneamente resolver o puede progresar a gastritis crónica, PUD, o conducir a lesiones premalignas como gastritis atróficas. El riesgo de por vida de desarrollar cáncer gástrico en individuos infectados con H. pylori es del 2% y, por lo tanto, este patógeno se ha clasificado como carcinógeno de clase I.

H. pylori expresa varios factores que permiten que la bacteria colonice e induzca una infección persistente en el estómago. Por ejemplo, las proteínas de membrana de adhesión, como las lipoproteínas A y B (AlpA / B), la adhesión de unión al antígeno del grupo sanguíneo (BabA), la proteína inflamatoria externa A (OipA) y la adhesión de unión al ácido siálico (SabA), permiten que la bacteria adherirse al epitelio gástrico a través de mecanismos de adhesión mediados por el receptor.

La presencia de flagelos y la enzima ureasa, que hidroliza la urea liberando amoníaco, neutralizando así el ambiente gástrico ácido, también contribuye a la colonización del estómago por H. pylori. Además, H. pylori expresa varios factores de virulencia que pueden inducir daño celular predominantemente a través de los efectos de las toxinas secretoras, incluida la citotoxina A (VacA) y el gen A asociado a citotoxina (CagA).

El VEB es un virus del herpes y que infecta a casi el 90% de los adultos de todo el mundo y está etiológicamente asociado con varias neoplasias linfoides, incluido el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt, un subconjunto de linfomas difusos de células B grandes y linfomas nasales de células T / NK. El virus, que se adquiere con mayor frecuencia durante la infancia por contacto con la saliva de individuos infectados, primero infecta las células epiteliales de la nasofaringe y luego se propaga a los linfocitos B, y finalmente establece una infección latente de por vida en las células B de memoria.

La infección aguda por EBV generalmente es asintomática o puede causar una infección febril benigna, sin embargo, en algunas personas, especialmente cuando se infecta por primera vez durante la adolescencia, el virus causa el síndrome de mononucleosis infecciosa típico con fiebre, malestar y linfadenopatía. La latencia de EBV se clasifica en tres tipos: latencia I, latencia II y latencia III, basada en la matriz de genes virales que se expresan. La respuesta inmune del huésped, mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos (CTL), juega un papel esencial en la prevención de la infección de las células infectadas, cambio a una etapa lítica con replicación viral productiva.

Esto se ilustra con la reactivación frecuente de las infecciones por EBV observadas en condiciones de inmunodeficiencia, como la enfermedad linfoproliferativa posterior al trasplante, en la cual las células B infectadas con EBV proliferan debido a la inmunosupresión terapéutica después del trasplante de órganos.

El VEB también puede infectar células epiteliales, incluidas las células de la mucosa gástrica, donde puede inducir gastritis aguda o crónica, y la acumulación de evidencia parece vincular el virus con el desarrollo de cáncer gástrico. *H. pylori*, donde la presencia de uno de estos microorganismos puede promover el crecimiento del otro y viceversa, y también podría aumentar su virulencia.

La interacción sinérgica no se conoce por completo, varias líneas de evidencia sugieren que durante el curso de la coinfección con *H. pylori* y EBV, el reclutamiento de células inmunes al sitio de infección aumenta considerablemente, lo que potencia la inflamación gástrica y el daño tisular. Por ejemplo, la monocloramina, un oxidante

producido en el estómago en presencia de infección por *H. pylori*, puede inducir la conversión del EBV de la fase latente a la lítica. Por otro lado, las citocinas proinflamatorias que surgen en el curso de la inflamación gástrica inducida por *H. pylori* pueden contribuir a la proliferación del VEB. Por ejemplo, la secreción de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inducida por *H. pylori* promueve un medio inflamatorio que exagera la gravedad de la enfermedad, y esta citocina, junto con IL-6 e IL-13, promueve la proliferación de EBV y niveles más altos de citocinas pro inflamatorias, incluyendo IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-8, se ha informado que promueven la gastritis severa asociada con el EBV y la coinfección por *H. pylori*.

En línea con estas observaciones, los niveles de IFN- $\gamma$  en el plasma de pacientes con cánceres gástricos se correlacionan positivamente con el grado de reactivación del VEB.

Además, la activación persistente de las células Th17 parece estar implicada con la inflamación gástrica asociada con la infección por *H. pylori* y EBV. Las células Th17 son un subconjunto de células T CD4 + auxiliares con propiedades proinflamatorias que activan las células inmunes innatas, regulan las respuestas de las células B y participan en las respuestas inmunes antimicrobianas y la cicatrización de heridas.

Las células Th17 y su citocina clave, IL-17A, están implicadas en la patogénesis de la gastritis inducida por *H. pylori*. Por ejemplo, los estudios en animales han demostrado que el VEB induce directamente la secreción de la citocina proinflamatoria IL17 y una mayor infiltración de neutrófilos dentro de la submucosa y la lámina propia del estómago en el tipo salvaje infectado por *H. pylori* en comparación con su IL-17A infectada por *H. pylori* - / - contrapartes, lo que sugiere que se requiere IL-17A para la infiltración de neutrófilos.

De manera similar, se observaron niveles aumentados de IL-17A e IL-8 en la mucosa gástrica de pacientes infectados con úlcera gástrica y sin úlcera *H. pylori* en comparación con pacientes no infectados sin úlcera, y tanto IL-17A como IL-8 son muy fuertes. correlacionado con un aumento en la infiltración de neutrófilos en pacientes infectados. Curiosamente, los niveles séricos de IL-17 se correlacionan directamente con la carga de ADN del VEB en individuos con artritis reumatoide,

que no se observó en los controles, y esta mejora de IL-17, en el curso de la infección por VEB, está mediada por el receptor tipo Toll 9 (TLR9).

IL-21 es una citocina proinflamatoria pleiotrópica secretada por las células Th17, así como por las células T foliculares auxiliares y las células NK o Th1. Los ratones con deficiencia de IL-21 mostraron una infiltración de células inmunes deteriorada en la mucosa gástrica en respuesta a *H. pylori* y los estudios en humanos han demostrado que la IL-21 se produce en la mucosa gástrica en respuesta a la infección por *H. pylori* y su nivel de expresión parece correlacionarse con la gravedad de la inflamación gástrica. Curiosamente, IL-21 fue capaz de activar directamente las células epiteliales gástricas que conducen a la regulación positiva de la metaloproteasa 1 de la matriz (MMP-1) y MMP-3 en las células AGS de la línea celular gástrica y en los sinoviocitos tipo fibroblastos, lo que puede contribuir al daño tisular.

En particular, la IL-21 se expresó en células T CD4 + y CD8 + circulantes en un paciente con trastorno linfoproliferativo asociado con infección por EBV, que se asoció con daño tisular severo.

## **Asociación clínica**

### Lesiones benignas

- Gastritis: es un término general para un grupo de enfermedades con un punto en común, la inflamación de la mucosa gástrica.
- Enfermedad por reflujo gastroesofágica: es una afección en la cual el contenido gástrico es regurgitado hacia el esófago lo que produce irritación del revestimiento interno del esófago.

- Dispepsia funcional: la dispepsia se refiere a un espectro de síntomas que incluyen dolor recurrente o molestias en región epigástrica, distensión epigástrica posprandial y náuseas o vómitos.

#### Lesiones premalignas

- Enfermedad por úlcera Péptica: se refiere a la erosión de un segmento de la mucosa digestiva, principalmente del estómago y de la primera porción del duodeno que penetra la muscular de la mucosa.
- Displasia de la mucosa gástrica: lesión neoplásica epitelial no invasiva
- Metaplasia de la mucosa gástrica: hallazgo histológico frecuente en pacientes adultos, generalmente relacionado con infección por *Helicobacter Pylori*.

#### Lesiones malignas

- Cáncer Gástrico: es un crecimiento descontrolado de las células que recubren la superficie interna del estómago. Estas células pueden invadir el resto de la pared gástrica y luego diseminarse a otros órganos y sistemas.

GC surge principalmente en la mucosa, la capa más interna en el estómago y lentamente crece hacia las otras capas externas. GC crece lentamente durante muchos años y rara vez muestra síntomas y, a menudo, pasa desapercibido. *H. pylori* es una bacteria en forma de espiral que crece en la capa de moco que recubre el interior del estómago humano, causando finalmente una inflamación en el estómago llamada gastritis.

Además, se convierte en úlceras, anemia de larga duración y crecimientos en el estómago, que tienen más probabilidades de contraer cáncer. *H. pylori* se transmite principalmente a través del agua contaminada, los alimentos, la saliva o los contactos boca a boca y posiblemente se transmite sexualmente a través del contacto oral-genital.

Además, el 95% de la población tiene el virus de Epstein-Barr. (EBV) en etapa latente y la mayoría del riesgo de GC aumenta con la coinfección por *H. pylori* y

EBV. EBV es un virus del herpes  $\gamma$  con un tamaño del genoma de 184 kbp. El VEB puede iniciar la mononucleosis en humanos durante la infección primaria.

El EBV se propaga principalmente por vía oral a través del contacto con la saliva; después de la infección, el VEB establece una infección latente que es un estado portador de virus, que es de tres tipos (latencia I, latencia II y latencia III). Durante la latencia, se limita un número limitado de genes virales expresan que mantienen el episoma viral.

Las tasas de infección por EBV en adultos y niños varían entre naciones similares a *H. pylori*. Las personas en los países subdesarrollados tienen tasas de infección mucho más altas que los países desarrollados y las infecciones generalmente se adquieren en la primera infancia.

El EBV está asociado con GC en todo el mundo (11% hombres, 6% mujeres) y tumores humanos generalizados. Algunos de estos tumores están asociados con el estilo de vida y el comportamiento del virus en el sistema linfóide B, que es un nicho natural del VEB, incluida la enfermedad linfoproliferativa B en el individuo inmunocomprometido, el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt y un subconjunto de células B grandes difusas.

Otros tumores se producen a través de la entrada viral en los diferentes tejidos o sistemas de órganos del huésped. Estos incluyen el linfoma nasal de células T / NK, un grupo de carcinomas nasofaríngeos no diferenciados (NPC) y carcinomas gástricos, un tipo de tumor que está relacionado con la infección crónica por *H. pylori* durante muchos años. (Figura 1).

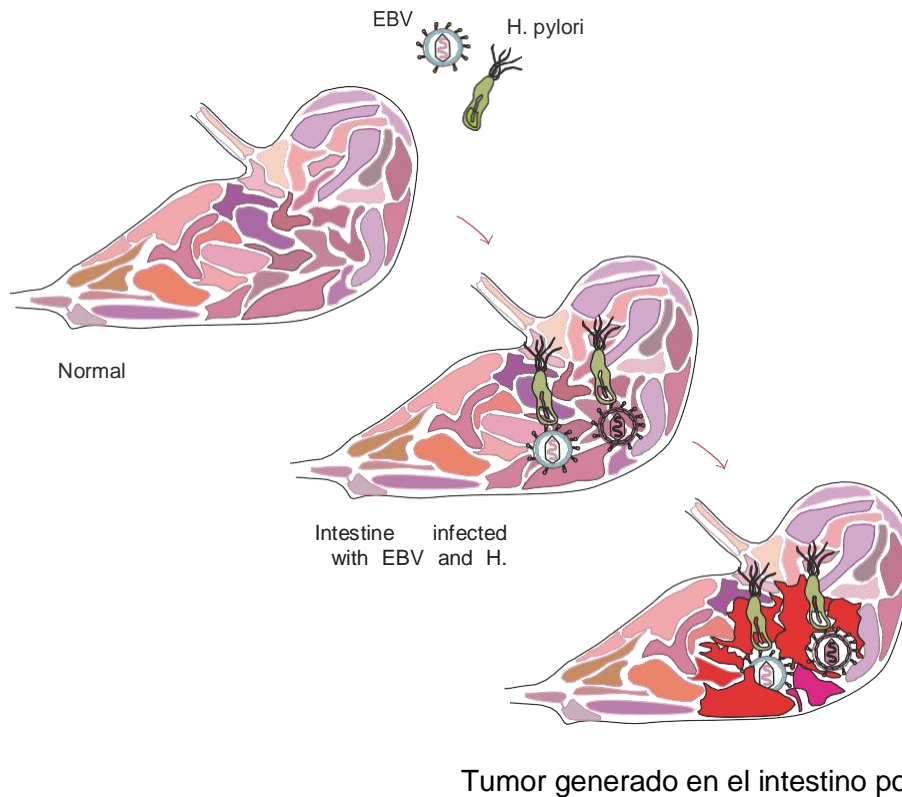


Figura 1. Coinfección por EBV y H. pylori en el estómago. Estómago infectado con EBV y H. pylori. Algunas de las células epiteliales gástricas coinfectadas con EBV y H. pylori. Además, esta coinfección se convierte en un desarrollo agresivo de carcinoma.

## Métodos de detección del EBV

### Prueba serológica

Las pruebas serológicas para EBV son pruebas específicas de anticuerpos con antígenos EBV y se utilizan para definir el estado de infección. Tres pruebas de anticuerpos específicos son las siguientes: (1) Anticuerpos antivirales (VCA) anticuerpos IgM e IgG: IgM se puede detectar en la etapa temprana La infección por EBV y en 4 a 6 semanas desaparece [107-109], mientras que para los picos de IgG se pueden detectar dentro de 2 a 4 semanas que disminuyen ligeramente y permanecer detectable durante toda la vida. (2) Anticuerpo anti-temprano (EA) IgG: la IgG se puede detectar en la etapa aguda de la infección,

como la mononucleosis o NPC, y desaparece después de 3 a 6 meses. La detección de IgG anti-EA representa una infección por EBV activa o reactivada. Casi en el 20% de las personas, la IgG anti-EA puede detectarse durante años después de la resolución de la infección activa por EBV. (3) Antígeno del Antígeno Nuclear Anti-EBV (EBNA) 1, IgG: IgG puede detectarse después de 2 a 4 meses de infección primaria por EBV y permanecer detectable durante toda la vida. Por ejemplo, la detección de Anti-VCA IgG e IgM indica infección aguda activa si no se detecta Anti-EBNA 1, mientras que la detección de Anti-VCAIgG y Anti-EBNA IgG sin la presencia de Anti-VCA IgM representa una infección pasada. Durante la reactivación del EBV, pueden detectarse simultáneamente IgG anti-VCA, anti-EBNA 1 y IgG anti-EA (D). Los resultados serológicos y la interpretación se enumeran en la Tabla 1.

*Tabla 1. Resultados serológicos e interpretación*

Anti-VCA IgM	Anti-VCA IgG	Anti-EBNA 1 IgG	Anti-EA (D) IgG	Interpretation
-	-	-	-	No infection
+	+	-	-	An early and primary infection
- or +	+	-	+	active infection
-	+	+	-	A past infection
-	+	+	+	May indicate reactivation of virus, lytic

Serological results and most likely interpretation: VCA: Viral Capsid Antigen, IgM: immunoglobulin type M, IgG: Immunoglobulin type G, EBNA 1: Epstein-Barr nuclear antigens 1, EA (D): Early Antigen D.

### ***Detección basada en PCR / PCR en tiempo real***

EBV DNA y La carga viral puede detectarse mediante métodos de PCR / PCR en tiempo real. Son más sensibles y específicos que los métodos serológicos, ya que la respuesta inmunológica al EBV aparece después de varios días de infecciones. Después de 15 días de inicio de la infección por EBV, el 100% del ADN del EBV es detectable en el plasma. Varios informes sugirieron que el ADN del EBV está presente en casi todas las células de carcinoma en casos positivos para EBV. Después de la infección primaria por EBV debido a la respuesta inmune, el ADN del EBV disminuye lentamente en PBMC, rápidamente en plasma o suero, y más de 3



a 4 semanas, se vuelve indetectable. Curiosamente, el EBV puede permanecer latente en las células de memoria durante un período prolongado en la sangre o tomar más tiempo antes de que alcance una etapa pequeña y estable. Se puede detectar un rango de número de copias de 1 a 50 del ADN del EBV en una persona sana infectada con EBV en los glóbulos blancos. La sensibilidad y especificidad de la PCR y la PCR en tiempo real varían según los métodos de detección y la práctica de laboratorio a laboratorio.

### **Métodos de detección para *Helicobacter pylori***

Se han desarrollado varios métodos para detectar la infección por *H. pylori*, mientras que la detección del patrón oro sigue siendo discutible. En el estudio de epidemias de *H. pylori*, la sensibilidad de las pruebas varía para la prueba directa (histopatología / IHC o prueba rápida de ureasa); Se desarrollan muchas pruebas no invasivas que se denominan pruebas indirectas (serología, UBT y SAT) para determinar el estado de la infección.

#### ***Prueba serológica***

Se han desarrollado pruebas serológicas utilizando técnicas de ELISA y sangre de los pacientes para detectar IgG, IgM e IgA para *H. pylori*. Las pruebas serológicas tienen una sensibilidad uniformemente alta (90 a 100%), especificidad variable (76 a 96%) y el rango de precisión entre 83 y 98%; sin embargo, no discrimina entre infección actual o exposiciones recientes.

Las pruebas serológicas requieren validación a nivel local, lo que no es práctico en la práctica habitual. Además, los hallazgos serológicos tanto en niños como en adultos son contradictorios, y el punto de corte no se muestra exacto en muchos estudios. Las pruebas serológicas son precisas en regiones de baja prevalencia donde menos del 20% de la población se ve afectada. En aquellos pacientes donde el revestimiento gástrico no ha cambiado a la forma precancerosa de metaplasia

intestinal, ni la biopsia ni las pruebas de aliento con urea se pueden usar ya que hay muy pocas bacterias presentes. Además, la serología en serie de las concentraciones de anticuerpos se puede usar como seguimiento después de tratamiento de *H. pylori*.

#### ***Prueba de aliento de urea (UBT)***

UBT mide el dióxido de carbono C13 en la respiración después de ingerir urea marcada con C-13. Esta prueba está aprobada por la FDA, EE. UU. Esto puede usarse para las personas de 3 años o más. El costo de la TUB es más que la prueba de antígeno serológico o de heces y la UBT puede usarse tanto como una herramienta de diagnóstico como en la eficacia de los tratamientos.

#### ***Prueba de antígeno en heces (SAT)***

Los antígenos liberados de la pared del estómago se pueden detectar en SAT mediante ELISA. La detección del antígeno solo ocurre si *H. pylori* está presente y esto muestra una infección activa. Al igual que el UBT, el SAT se puede utilizar como herramienta de diagnóstico y como eficacia de los tratamientos. También es una prueba aprobada por la FDA y el ACG y el AGA recomiendan el SAT.

#### ***Infección por EBV a células epiteliales gástricas***

La latencia y la reactivación son las características del EBV, que es un virus del herpes humano ubicuo y potencialmente oncogénico. El VEB se descubrió en 1964 en pacientes con linfoma de Burkett (BL). Inicialmente, se suponía que infectaba solo las células B; más tarde, también se encontró en células epiteliales nasofaríngeas, células hepáticas, células epiteliales del estómago, células cerebrales, etc.

## **Patogenia de la infección**

### ***Bajo tropismo de la infección por EBV a través de la ruta oral a Boca de células epiteliales orofaríngeas.***

Debido a dificultades en establecer una infección reproducible y robusta in vitro, es muy difícil simular una comprensión real de la patología del VEB. La mayoría de los estudios sugirieron que el EBV se puede transitar a través del complejo EBV + IgA a través del epitelio oral, orofaringe bidireccional, desde las membranas apicales hasta la basolateral y viceversa. Esta transmigración de EBV contribuye potencialmente a la penetración inicial de EBV en las células B que inicia la infección sistémica. La secreción de EBV puede ocurrir en la saliva en individuos infectados con EBV. Sin embargo, el EBV no pudo detectarse en orofaríngeo en la etapa primaria de infección en el proceso de transcitosis.

El VEB tiene un alto tropismo para los linfocitos B. EBV interactúa con linfocitos B ingenuos o de memoria en el anillo de Waldeyer. El anillo de Waldeyer está situado en tejido linfoide y rodea la orofaringe. EBV tiene una alta afinidad por la célula B y el receptor del complemento tipo 2 (CR2) o CD21 presente en la superficie de la célula B facilita la unión de EBV envoltura glicoproteína gp350 / 220 a células B. Después del apego, la internalización del EBV ocurre en las células a través de la endocitosis. Además, esta fusión de proteínas de envoltura de EBV y B cells desencadena la interacción de otras glicoproteínas de envoltura, es decir, gp42. Gp42 interactúa con HLA clase II que está presente en las células B y forma un núcleo de complejo de fusión gh / gL / gp42 y realiza aún más la internalización proceso.

Las células B infectadas alcanzan la circulación, y algunas células B también pueden ir a la transformación. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos ocurre para las células B y principalmente este proceso se debe a la infección latente de

las células B. Sin embargo, la diferenciación terminal de las células B ocurre a través de la respuesta inmune. Las células B de memoria infectada pueden llegar al sitio de respuesta inmune y dividirse aún más en células de plasma y memoria. Este proceso inicia la reactivación del EBV en el ciclo lítico en las células B y esto causa más infección a las células B no infectadas y, por lo tanto, repone el depósito latente de las células B infectadas con EBV, lo que establece un ciclo de persistencia en la vida de un portador sano. Se supone que la liberación lítica del virus tiene un alto tropismo a las células epiteliales que las células B. Los estudios in vitro sugirieron que las células B o los fragmentos de células B cargadas con EBV tienen una alta tasa de infectividad para las células epiteliales.

***La liberación lítica de EBV de las células B tiene un alto tropismo para infectar otras células epiteliales.***

La diferenciación terminal de las células de memoria infectadas desencadena la replicación lítica del EBV. Esto puede ocurrir en cualquier parte / órgano del huésped donde viajan las células de memoria infectadas y el EBV se propaga a través del contacto de célula a célula. Un estudio sugirió que las células epiteliales basales indiferenciadas apoyan la infección latente por EBV, mientras que la diferenciación de las células epiteliales promueve la reactivación lítica.

***Infección por Helicobacter Pylori en células epiteliales gástricas***

Se pueden encontrar dos tipos de H. pylori en el revestimiento gástrico o mucoso: tipo cocoide y tipo helicoidal. El tipo helicoidal de H. pylori puede transformarse en tipo cocoide. El tipo cocoide es menos vulnerable con baja antigenicidad y menos vulnerable en el revestimiento gástrico con baja producción de productos proteicos citotóxicos (CagA), arginasa RocF, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otros. Esto hace que H. pylori escape de la respuesta inmune con mayor facilidad. Casi el 20% de H. pylori en el revestimiento del estómago se adhiere a la superficie de las células epiteliales, mientras que el resto se une a través de la unión de la célula a

la célula. Pocos números de bacterias *H. pylori* también se encuentran en el espacio intercelular más profundo.

Las proteínas del autotransportador presentes en la superficie de *H. pylori*, BabA, SabA, AlpA, AlpB, HopZ, OipA y otras, facilitan la adherencia a la superficie epitelial, sin embargo, no se encuentra ninguna proteína individual esencial. Además, la expresión diferencial de estas proteínas se produce entre cepas y dentro de una sola cepa. Por lo tanto, con el tiempo, *H. pylori* adquiere una adaptación dinámica por alteración en la expresión génica, inactivación o recombinación

## ***Metilación***

### *EBV y metilación*

La hipermetilación de la región promotora en ciertos genes se ve con frecuencia en GC positivo para EBV en comparación con GC negativo para EBV. GC y otros cánceres más comunes ocurren por los cambios genéticos y epigenéticos durante un período prolongado. La metilación es común en el cáncer y se puede dividir en dos categorías: hipometilación del genoma completo que causa cáncer debido a razones genéticas e hipermetilación regional que son causadas principalmente por infección o inflamación a largo plazo. La maquinaria celular del huésped juega un papel más importante e induce metilación aberrante que los factores virales. Las células hospedadoras inician una metilación densa para silenciar los genes EBV, pero en este proceso los genes hospedadores se metilan ampliamente. *H. pylori* se consideran factores importantes de GC, y la metilación aberrante es también el sello distintivo de GC relacionado con *H. pylori*. La hipermetilación se ha relacionado con la gastritis e inflamación relacionadas con *H. pylori*. Se desconocen los mecanismos de la hipermetilación inducida por *H. pylori* y también se cree que existe una posible participación de ROS / NOS.

En un estudio sobre vías de señalización relacionadas con el cáncer en GC asociada a EBV, genes de regulación del ciclo celular (IGFBP3, CDKN2A, ID2, HSP70, CCND1 e ID4), reparación de ADN (BRCA1, TFF1), adhesión celular (ICAM1), angiogénesis (HIF1A) y la inflamación (COX2) se encontraron desreguladas. Se observaron patrones específicos de EBV en la metilación y desmetilación del ADN de la isla CpG para alguna secuencia promotora. También se observa la pérdida de 3 genes supresores tumorales críticos, CDH1 (E-cadherina), p73 y CDKN2A (p16), en GC asociada a EBV. La metilación y desmetilación de la isla CpG específica de EBV se observó mediante secuenciación de ADN con bisulfito. Sin embargo, el EBV está asociado con cambios epigenéticos de apoptosis (DAPK, BNIP3, FAM3B HRK, IL15RA, MINT31, p16, p73, PTEN y RASSF1A), regulación del ciclo celular (APC, p15, p16, p57 y p73), proliferación celular (E-Cadherin, HRASLS, IL15RA, MINT31, NKX3.1, RUNX3, TIMP2 y TIMP3), señalización celular (14-3-3 Sigma, CSPG2, MINT1, MINT2 y PLXND1), adhesión celular (EPHB6, FLNC, FSD, REC8 y CSPG2) , migración (EPHB6), interacción (MDGA2, THBS1), reparación de ADN (HMLH1, MGMT) y muchos otros cambios epigenéticos (BCL7A, BLU, CHFR, CXXC4, GSTP1, HLTF, HOXA10, IHH, MARK1, MINT25, PAX5- $\beta$  , SCARF2, SSTR1, THBD y WNT5A). Las asociaciones de factores de VEB con diferentes máquinas huésped y metilación se enumeran en las Tablas 2 y 3.

*Tabla 2. Respuesta celular*

EBV gene	Cellular response
EBNAs, BALF1, EBERs, BARTs	Tumor growth and metastasis
LMP 1, EBNAs	Angiogenesis
LMP1, BARTs	Invasion, metastasis
BARTs, EBNAs, LMPs	ECM remodelling
EBNAs, LMPs, EBERs, BARTs	Cell migration
EBNAs, LMPs, Zta, BARTs	Stemness

EBNAs: Epstein-Barr nuclear antigens, BALF1: LMP1: latent membrane protein 1, EBERs: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs, BARTs: Bam HI A rightward transcripts, LMPs: latent membrane proteins, and Zeta: protein encoded by BZLF1.

Tabla 3. Interacción gene - huésped

EBV gene	Host gene interaction
LMP 1	CDH1
LMP2A	PTEN, STAT3
EBERs	IGF-I
LMP1, LMP2A	DNMT1, DNMT3b
BARF1	Cyclin D, NFκB
Zta	Acetyl-transferase protein CBP, EGR1

LMP: latent membrane protein, EBERs: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs, BARF1: Bam HI-A rightward frame 1, CDH1: Cadherin 1, PTEN: phosphatase and tensin homolog, IGF1: insulin-like growth factor 1, DNMT1: DNA methyltransferase 1, DNMT3b: DNA methyltransferase 3b, and EGR 1: early growth response gene 1.

## Factores EBV y *H. pylori* que contribuyen al desarrollo de GC

La interacción entre EBV y *H. pylori* en el revestimiento del estómago del huésped puede tener algunos efectos sinérgicos en el desarrollo de GC. Se encontraron muchos genes metilados en EBV y adenocarcinomas gástricos coinfectados por *H. pylori*. Los genes hipermetilados más frecuentemente incluyen COX 2, DAPK, CDH1, CDKN2A y hMLH1.

Estos genes se encuentran comúnmente alterados en varios tipos de cáncer, incluido GC. Además, los individuos positivos para *H. pylori* muestran una carga de ADN de EBV significativamente mayor, lo que sugiere el papel de *H. pylori* en la conversión de EBV en fase lítica. Además, la carga de ADN del EBV fue mayor en pacientes con *H. pylori* positivo que en aquellos no infectados con GC.

Otro estudio sobre coinfección sugiere que el VEB con *H. pylori* induce respuestas inflamatorias severas en el individuo y, por lo tanto, aumenta el riesgo de desarrollar el tipo intestinal GC. Se cree que existen dos mecanismos posibles, primero una respuesta inflamatoria adicional en la coinfección y un aumento del daño en los tejidos por *H. pylori* y EBV.

En este escenario, se observó una elevación significativa en IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL- 8. Un estudio en pacientes pediátricos demostró que la infección por H. pylori no era sino la presencia de EBV, un factor esencial de inflamación severa. El segundo mecanismo basado en la interacción de productos genéticos, que es más significativo entre EBV y H. pylori. Un estudio in vitro descubrió que la reactivación del EBV se produce por la vía de señalización PLC $\gamma$  y la toxina H. pylori CagA activa fuertemente PLC $\gamma$  y también activa varias quinasas. Una expresión ectópica en ratones transgénicos apoya la naturaleza oncoproteica de CagA.

Los pacientes con H. pylori positivo muestran un aumento en el título de IgG anti-EBV, lo que sugiere el papel de H. pylori en el aumento de la carga de ADN del EBV y mayores respuestas inmunes. Sin embargo, también hay algunos estudios disponibles que sugieren que H. pylori atenúa la expresión de TGF- $\beta$  que reactiva la fase lítica del VEB y podría desempeñar un papel en la prevención del VEB reactivación lítica y prevención de GC. Por lo tanto, el mecanismo de coexistencia para H. pylori y EBV debe estudiarse para encontrar los roles patógenos probables y potenciales para ambos microorganismos.



## VII. METODOLOGÍA

Esta tesis está conformada a partir de los resultados de dos artículos. El primero fue una revisión sistemática narrativa de publicación científicas en revistas indexadas en las principales bases datos internacionales, a partir de la cual se identificaron 679 artículos publicados hasta el 30 de agosto del 2019 y de estos se seleccionaron 9 artículos cumplieron con la principal finalidad de presentar la frecuencia de la coinfección del EBV y H. pylori en los trastornos gastroduodenales no malignos. En un segundo momento se realizó actualización de la primera revisión sistemática evaluándose artículos publicados hasta el 17 de abril del 2020, llevándose a cabo un metaanálisis para estimar la prevalencia de coinfección, seleccionándose 6 estudios que cumplieron con los criterios de selección.

### **Revisión sistemática narrativa**

Este estudio se realizó siguiendo la declaración PRISMA (Elementos de informes preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis). Utilizamos la base de datos PubMed para buscar artículos enumerados antes del 30 de septiembre de 2019, utilizando los siguientes términos de búsqueda "Virus Epstein Barr, helicobacter pylori y gastritis", "EBV, helicobacter pylori y gastritis", "Virus Epstein Barr, helicobacter pylori y duodenitis ", " EBV, helicobacter pylori y duodenitis ", " Virus Epstein Barr, helicobacter pylori e inflamación gastrointestinal ", " EBV, helicobacter pylori e inflamación gastrointestinal ", " Virus Epstein Barr, helicobacter pylori y enfermedad péptica no ulcerosa ", " EBV , helicobacter pylori y enfermedad péptica no ulcerosa ", " Virus Epstein Barr, enfermedad helicobacter pylori y úlcera péptica ", " EBV, enfermedad helicobacter pylori y úlcera péptica ", " Virus Epstein Barr y coinfección por helicobacter pylori ", " EBV y helicobacter pylori " coinfección ", " Virus Epstein Barr, coinfección por helicobacter pylori y trastornos gastrointestinales "" EBV, coinfección por helicobacter pylori y gastrointestinal trastornos nasales ", "

Virus Epstein Barr, coinfección helicobacter pylori e inflamación gastroduodenal "" EBV, coinfección helicobacter pylori e inflamación gastroduodenal "," Virus Epstein Barr, coinfección helicobacter pylori y gastritis "" EBV, coinfección helicobacter pylori y gastritis "".

Además, las referencias enumeradas en los artículos elegibles se examinaron más a fondo para identificar los estudios omitidos en la evaluación primaria.

### ***Selección de estudios y extracción de datos***

Los estudios prospectivos fueron seleccionados por tres investigadores independientes (JLE, RDC y OJD). Los títulos y los resúmenes se examinaron durante una selección primaria y los estudios potencialmente elegibles estuvieron sujetos a revisión de texto completo.

Las discrepancias con respecto a la inclusión o exclusión del estudio se resolvieron mediante una revisión y discusión adicionales. Los criterios de elegibilidad para la inclusión fueron

- (1) la búsqueda se limitó a estudios en humanos;
- (2) los estudios deben haber determinado el estado del VEB del tejido gastroduodenal utilizando EBER (ARN codificado con EBV) EBER, hibridación in situ, PCR o métodos serológicos para detectar la infección por EBV; y
- (3) estudios que informaron positividad de H. pylori en muestras gastroduodenales. Los ítems extraídos incluyeron características generales del estudio (año, país, diseño del estudio), características de las poblaciones del estudio (tamaño, sexo, edad, factores relacionados con la enfermedad) y tipos de mediciones (tipos de muestras, procedimientos analíticos). El número de casos se extrajo de todas las publicaciones o, en algunos casos, se calculó a partir del porcentaje informado de casos.

## **Metaanálisis de proporción para estimar la prevalencia de coinfección**

Este estudio se realizó siguiendo la declaración PRISMA (Elementos de informes preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis). Utilizamos la base de datos PubMed para buscar artículos listados hasta antes del 17 de abril de 2020.

Tres revisores (SNC.), (OJD) y (RDC.) Buscaron de forma independiente en PubMed estudios que informaran sobre la aparición de coinfección por EBV y H. Pylori utilizando los siguientes términos de búsqueda: "(coinfección por Epstein-Barr-Virus y Helicobacter Pylori), (Epstein-Barr-Virus y Helicobacter Pylori en pacientes con cáncer gástrico) Y (La coexistencia de Epstein-Barr-Virus y Helicobacter Pylori en trastornos gastroduodenales)".

### ***Selección de estudios y extracción de datos***

Para calificar para la inclusión, los estudios debían ser originales, escritos en inglés y disponibles en forma de texto completo. La llamada literatura gris (es decir, documentos de conferencias, informes, etc.) no se incluyó. Los títulos y los resúmenes se examinaron durante una selección primaria y los estudios potencialmente elegibles se sometieron a una revisión de texto completo. Las discrepancias con respecto a la inclusión o exclusión del estudio se resolvieron mediante una revisión y discusión adicionales. Se excluyeron los estudios escritos en otros idiomas además del inglés y aquellos que no informaron la coinfección por EBV y H. Pylori.

### ***Estudios incluidos***

Se identificaron un total de 679 títulos y 255 de ellos fueron rápidamente excluidos porque se consideraron irrelevantes. Después de revisar los títulos y los resúmenes, 377 artículos se excluyeron aún más porque algunos se consideraron irrelevantes, algunos fueron informes de casos, otros fueron artículos de revisión y en algunos estudios no se estudió la coinfección. Los 47 artículos restantes fueron sometidos a

revisión de texto completo y finalmente, nueve artículos cumplieron con los criterios de inclusión y luego fueron revisados sistemáticamente.

## VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Población/pacientes	Identifique el número de pacientes o individuos que participaron en el estudio, especifique el país o región donde se realizó el estudio
Intervención	Identifique el tipo de intervención que se realizó (por ejemplo, terapia triple para la erradicación de H. pylori) En estudios observacionales la intervención será: ninguna, porque no hay intervención.
Comparador	Por ejemplo, En los estudios de control de casos, el comparador de casos serán los controles (individuos sin la enfermedad).  En algunos estudios, el comparador será gastritis causada por H. pylori versus gastritis causada por EBV + H. pylori o solo por EBV.  En estudios aleatorizados, la intervención será fármaco experimental versus fármaco placebo  Algunos estudios no incluyen un comparador; solo describen los hallazgos en una población específica.
Resultados	Describa aquí los principales resultados del estudio.

	<p>Algunos estudios incluidos en este metaanálisis analizaron las características clínicas de pacientes con gastritis inducida por VEB.</p> <p>Algunos estudios analizaron solo hallazgos patológicos observados en biopsias gástricas de pacientes con gastritis inducida por VEB</p> <p>Algunos estudios solo informaron la frecuencia de coinfección con EBV y H. pylori en individuos con gastritis</p> <p>Por lo tanto, los hallazgos frecuentes informados en estos estudios pueden ser:</p> <p>La gastritis causada por EBV era clínicamente indistinguible de la gastritis causada por H. pylori</p> <p>Algunos estudios pueden informar gastritis más grave (clínica y patológicamente) cuando se detectaron tanto EBV como H. pylori en el estómago de pacientes con gastritis</p> <p>algunos estudios pueden informar la presencia de lesiones premalignas (displasia, metaplasia) en el estómago de pacientes con gastritis causada por EBV y H. pylori</p>
<p>Diseño de estudio</p>	<p>Describa aquí el tipo de estudio que se realizó:</p> <p>Esta información se puede encontrar en el resumen del artículo o en la sección de materiales y métodos.</p> <p>Generalmente se realizan los siguientes diseños de estudio:</p> <p>Retrospectivo</p>

	<p>Estudios transversales</p> <p>Estudios de cohortes (estudios de casos y controles)</p> <p>Ensayos controlados aleatorios (muy raro en este tema)</p> <p>Ensayos controlados no aleatorios.</p> <p>La mayoría de los estudios realizados hasta ahora son estudios observacionales en los que los autores informaron solo hallazgos clínicos y patológicos y no se realizó ninguna intervención.</p>
--	---

## IX. RESULTADOS

### **Principales resultados de la revisión sistemática narrativa (artículo I)**

Después de una extensa revisión, identificamos nueve estudios que cumplían los criterios de selección.

Entre los estudios seleccionados, el VEB se detectó directamente en tejidos gástricos en seis estudios y, en tres estudios, se utilizaron métodos serológicos que detectan la infección por VEB.

En particular, a excepción de un estudio realizado en Hungría, todos los estudios se realizaron en América Latina (México, Perú, Paraguay y Brasil) o en India (tres estudios).

En total, 1611 individuos con NMGD fueron incluidos en la presente revisión sistemática. Entre ellos, 662 provenían de estudios que evaluaban la infección activa por EBV por métodos serológicos y 949 provenían de estudios en los que la infección por EBV se documentaba directamente en tejidos gástricos.

Se documentó una frecuencia considerable de la coexistencia de ambos patógenos. En todos los estudios que se indagó coinfección se detectó algún porcentaje de dicha infección, la cual varió entre cerca del 2% hasta el 34% de la población investigada en los diversos estudios.

### **Resultados del metanálisis (artículo II)**

#### ***Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales***

En total, se incluyeron 6 estudios en el análisis cuantitativo, con una prevalencia general del 23% (IC 95%: 20.8% -25.3%) en 1402 participantes evaluados.

Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales benignos.



Los 6 estudios, incluidos 700 individuos con trastornos gastroduodenales benignos, arrojaron una prevalencia colectiva del 17,9% (IC 95%: 15,1% -20,9%)

***Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales premalignos.***

Tres estudios informaron sobre la prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales premalignos, lo que arroja una prevalencia del 61,2% (IC 95%: 52,5% -69,4%) en 135 individuos evaluados. Este es el único resultado que no es estadísticamente significativo ( $p = 0.973$ ) probablemente porque el tamaño de la muestra es pequeño.

***Prevalencia de la población con trastornos gastroduodenales malignos.***

Hubo cinco estudios que informaron sobre trastornos gastroduodenales malignos en 567 individuos, se estimó una prevalencia del 20.1% (IC 95%: 16.9% -23.6%).

## X. DISCUSIÓN

A través del presente estudio identificamos solo nueve estudios clínicos y epidemiológicos que cumplían con nuestros criterios de inclusión y entre ellos, tres estudios evaluaron la tasa de infección por EBV mediante la detección de anticuerpos anti-EBV en muestras de sangre y seis estudios detectaron positividad de EBV directamente en tejidos gástricos, principalmente mediante métodos de PCR.

Se observó una alta variabilidad en la prevalencia de VEB y *H. pylori* en pacientes con NMGD entre los estudios incluidos en esta revisión, que está directamente relacionada con los métodos de detección utilizados para determinar el estado de la infección.

Como se esperaba, se observó un aumento en la tasa de infección por EBV en los NMGD cuando el virus fue detectado por marcadores serológicos en muestras de sangre y, aunque estos métodos pueden ser útiles para evaluar la exposición acumulativa de por vida y la reactivación de la infección viral, cuando la seropositividad se evalúa solo por detectar anticuerpos contra el VEB que no distinguen la infección activa de la infección de por vida (generalmente adquirida desde la infancia), determinar el estado de la infección por VEB es un desafío.

En este caso, la comparación de los títulos de anticuerpos contra el VEB entre pacientes con NMGD con aquellos en controles asintomáticos podría proporcionar datos más confiables para juzgar la asociación de la infección por EBV con los NMGD. De manera similar, también se informó un aumento de la positividad del EBV en estudios en los que el virus se detectó en los tejidos gástricos mediante métodos de PCR. Es bien sabido que, mientras que los métodos de PCR son más sensibles que el método estándar de oro ISH para detectar EBV, también están asociados con una especificidad más baja. Además, el método de PCR no puede distinguir el ADN del EBV presente en las células epiteliales del que se encuentra en los linfocitos infectados que se infiltran en las muestras de tejido afectadas. Por

lo tanto, dado que una posible contaminación cruzada por EBV detectada por los métodos de PCR no puede descartarse por completo, el aumento de la positividad de EBNA-1 detectado por PCR, particularmente en muestras de gastritis crónica, en lugar de reflejar la infección de las células epiteliales, podría indicar la gravedad de una respuesta inflamatoria.

Una limitación importante de los estudios publicados es que se centraron principalmente en determinar una posible correlación entre el EBV y la coinfección por *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico y, por lo tanto, los pacientes con trastornos benignos se incluyeron como controles. No se encontraron estudios que compararan la prevalencia de coinfección por EBV y *H. pylori* en NMGD con la de sujetos sanos. Esto se debe en parte a los problemas técnicos y éticos asociados con la inclusión de individuos asintomáticos como grupo de control para determinar la tasa precisa de coinfección en individuos sanos, porque la obtención de muestras gástricas requiere el uso de métodos invasivos (endoscopia), que no son rutinarios realizado en esta población. Teniendo en cuenta que tanto *H. pylori* como EBV son microorganismos ubicuos que infectan a una amplia proporción de la población mundial, y aunque varios estudios han sugerido que existe una asociación potencial entre la coinfección con estos agentes y el desarrollo de un daño de la mucosa gástrica más grave, Es un tanto sorprendente encontrar que, con la excepción de un pequeño estudio de Hungría, todos los estudios que investigan este tema se han llevado a cabo en países en desarrollo, incluidos tres estudios de la India y cinco de América Latina. Además, la carcinogénesis gástrica es un proceso de varios pasos que muy a menudo, si no siempre, se inicia con inflamación crónica, que no solo promueve la iniciación del tumor sino que también juega un papel crítico en el crecimiento y la metástasis del tumor. Por lo tanto, dilucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de infección aguda o crónica en el contexto de una coinfección con EBV y *H. pylori* es crucial para diseñar estrategias de prevención del cáncer. Además, la posible asociación de ambos patógenos en el desarrollo de los NMGD también debe investigarse en otras poblaciones, incluidos los caucásicos, asiáticos y africanos.



## XI. CONCLUSIONES

1. A partir de la primera revisión se documentó una frecuencia considerable de la coexistencia de ambos patógenos. En todos los estudios que se indagó en el continente americano (Brazil,México,Paraguay,Perú) la coinfección se detectó en un rango del 2.4% - 77.7%. En Hungría un país de Europa Central, se realizó un estudio que mostró una frecuencia de coinfección del 30%. Por otro lado, estudios realizados en el continente asiático (India, Singapur,Japón) la coinfección varió entre 28% a 46% de la población investigada.
2. El metaanálisis estimó una prevalencia de coinfección por EBV y H. pylori en cualquier tipo de trastornos gastroduodenal del 23% (IC95% 20.8%-5.3%), en trastornos gastroduodenales benignos de 17.9% (IC95% 15.1-20.9), en premalignos de 61.2% (IC 95% 52.5-69.4) y malignos de 20% (IC16.9-23.6).



## **XII. RECOMENDACIONES Y FUTURAS LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

La evidencia clínica y epidemiológica respalda la contribución de varios virus, incluidos EBV, virus de la hepatitis, citomegalovirus con gastritis y cáncer gástrico inducido por *H. pylori* [67], y varios estudios han demostrado que la microbiota gástrica puede regular la infección por *H. pylori* y viceversa; Esta bacteria puede modificar la composición de la microbiota gástrica [68-70]. Por otro lado, la composición de microbiota en varios nichos corporales ejerce efectos directos o indirectos sobre las infecciones virales, incluidos el VEB y el virus del papiloma humano [71]. Por lo tanto, probar la posible diafonía entre EBV y *H. pylori* con microbiota gástrica es una línea de investigación interesante para futuros estudios.

En necesario llevar estudios a nivel comunitario para confirmar la prevalencia estimada y realizar estudios analíticos que permitan establecer la asociación causal entre la coinfección por EBV y *H. pylori* y el desarrollo de trastornos gastroduodenales premalignos y malignos

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stanghellini, V.; Chan, F.K.; Hasler, W.L.; Malagelada, J.R.; Suzuki, H.; Tack, J.; Talley, N.J. Gastroduodenal Disorders. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1380-1392, doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011.
2. Koduru, P.; Irani, M.; Quigley, E.M.M. Definition, Pathogenesis, and Management of That Cursed Dyspepsia. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2018**, *16*, 467-479, doi:10.1016/j.cgh.2017.09.002.
3. Masuy, I.; Van Oudenhove, L.; Tack, J. Review article: treatment options for functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* **2019**, *49*, 1134-1172, doi:10.1111/apt.15191.
4. Talley, N.J.; Ford, A.C. Functional Dyspepsia. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 1853-1863, doi:10.1056/NEJMra1501505.
5. Stanghellini, V. Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome: Beyond Rome IV. *Dig Dis* **2017**, *35 Suppl 1*, 14-17, doi:10.1159/000485408.
6. Tomita, T.; Oshima, T.; Miwa, H. New Approaches to Diagnosis and Treatment of Functional Dyspepsia. *Curr Gastroenterol Rep* **2018**, *20*, 55, doi:10.1007/s11894-018-0663-4.
7. Chang, K.L.; Estores, D.S. Upper Gastrointestinal Conditions: Nonmalignant Conditions of the Stomach. *FP Essent* **2017**, *458*, 18-24.
8. Smolka, A.J.; Schubert, M.L. Helicobacter pylori-Induced Changes in Gastric Acid Secretion and Upper Gastrointestinal Disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 227-252, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_10.
9. Falkeis-Veits, C.; Vieth, M. Non-malignant Helicobacter pylori-Associated Diseases. *Adv Exp Med Biol* **2019**, doi:10.1007/5584\_2019\_362.



10. Watari, J.; Chen, N.; Amenta, P.S.; Fukui, H.; Oshima, T.; Tomita, T.; Miwa, H.; Lim, K.J.; Das, K.M. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 5461-5473, doi:10.3748/wjg.v20.i18.5461.
11. Lanas, A.; Chan, F.K.L. Peptic ulcer disease. *Lancet* **2017**, *390*, 613-624, doi:10.1016/S0140-6736(16)32404-7.
12. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Carreón-Talavera, R.; Camorlinga-Ponce, M.; Gomez-Delgado, A.; Torres, J.; Fuentes-Pananá, E.M. Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS One* **2013**, *8*, e62850, doi:10.1371/journal.pone.0062850.
13. Martínez-López, J.L.; Torres, J.; Camorlinga-Ponce, M.; Mantilla, A.; Leal, Y.A.; Fuentes-Pananá, E.M. Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses* **2014**, *6*, 301-318, doi:10.3390/v6010301.
14. Zong, L.; Seto, Y. CpG island methylator phenotype, Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, and microsatellite instability and prognosis in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2014**, *9*, e86097, doi:10.1371/journal.pone.0086097.
15. Kim, J.Y.; Bae, B.N.; Kang, G.; Kim, H.J.; Park, K. Cytokine expression associated with Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. *APMIS* **2017**, *125*, 808-815, doi:10.1111/apm.12725.
16. Rugge, M.; Genta, R.M.; Di Mario, F.; El-Omar, E.M.; El-Serag, H.B.; Fassan, M.; Hunt, R.H.; Kuipers, E.J.; Malfertheiner, P.; Sugano, K., et al. Gastric Cancer as Preventable Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2017**, doi:10.1016/j.cgh.2017.05.023.

17. Del Moral-Hernández, O.; Castañón-Sánchez, C.A.; Reyes-Navarrete, S.; Martínez-Carrillo, D.N.; Betancourt-Linares, R.; Jiménez-Wences, H.; de la Peña, S.; Román-Román, A.; Hernández-Sotelo, D.; Fernández-Tilapa, G. Multiple infections by EBV, HCMV and Helicobacter pylori are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico: An observational study. *Medicine (Baltimore)* **2019**, *98*, e14124, doi:10.1097/MD.00000000000014124.
18. Hooi, J.K.Y.; Lai, W.Y.; Ng, W.K.; Suen, M.M.Y.; Underwood, F.E.; Tanyingoh, D.; Malfertheiner, P.; Graham, D.Y.; Wong, V.W.S.; Wu, J.C.Y., et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 420-429, doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022.
19. Crowe, S.E. Infection. *N Engl J Med* **2019**, *380*, 1158-1165, doi:10.1056/NEJMc1710945.
20. Chmiela, M.; Gonciarz, W. Molecular mimicry in Helicobacter pylori infections. *World J Gastroenterol* **2017**, *23*, 3964-3977, doi:10.3748/wjg.v23.i22.3964.
21. Mejías-Luque, R.; Gerhard, M. Immune Evasion Strategies and Persistence of Helicobacter pylori. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 53-71, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_3.
22. Salama, N.R.; Hartung, M.L.; Müller, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 385-399, doi:10.1038/nrmicro3016.
23. Espinoza, J.L.; Takami, A.; Trung, L.Q.; Kato, S.; Nakao, S. Resveratrol Prevents EBV Transformation and Inhibits the Outgrowth of EBV-Immortalized Human B Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e51306, doi:10.1371/journal.pone.0051306.

24. Quoc Trung, L.; Espinoza, J.L.; Takami, A.; Nakao, S. Resveratrol Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Malignant NK Cells via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *PLoS One* **2013**, *8*, e55183, doi:10.1371/journal.pone.0055183.
25. Taylor, G.S.; Long, H.M.; Brooks, J.M.; Rickinson, A.B.; Hislop, A.D. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol* **2015**, *33*, 787-821, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326.
26. Yanai, H.; Murakami, T.; Yoshiyama, H.; Takeuchi, H.; Nishikawa, J.; Nakamura, H.; Okita, K.; Miura, O.; Shimizu, N.; Takada, K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol* **1999**, *29*, 39-43.
27. Ryan, J.L.; Morgan, D.R.; Dominguez, R.L.; Thorne, L.B.; Elmore, S.H.; Mino-Kenudson, M.; Lauwers, G.Y.; Booker, J.K.; Gulley, M.L. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* **2009**, *89*, 80-90, doi:labinvest2008103 [pii] 10.1038/labinvest.2008.103.
28. Chen, X.Z.; Chen, H.; Castro, F.A.; Hu, J.K.; Brenner, H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94*, e792, doi:10.1097/MD.0000000000000792.
29. Choi, M.G.; Jeong, J.Y.; Kim, K.M.; Bae, J.M.; Noh, J.H.; Sohn, T.S.; Kim, S. Clinical significance of gastritis cystica profunda and its association with Epstein-Barr virus in gastric cancer. *Cancer* **2012**, *118*, 5227-5233, doi:10.1002/cncr.27541.
30. de Souza, C.R.T.; Almeida, M.C.A.; Khayat, A.S.; da Silva, E.L.; Soares, P.C.; Chaves, L.C.; Burbano, R.M.R. Association between. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 4928-4938, doi:10.3748/wjg.v24.i43.4928.
31. Minoura-Etoh, J.; Gotoh, K.; Sato, R.; Ogata, M.; Kaku, N.; Fujioka, T.; Nishizono, A. Helicobacter pylori-associated oxidant monochloramine

- induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *J Med Microbiol* **2006**, *55*, 905-911, doi:10.1099/jmm.0.46580-0.
32. Allison, C.C.; Ferrand, J.; McLeod, L.; Hassan, M.; Kaparakis-Liaskos, M.; Grubman, A.; Bhathal, P.S.; Dev, A.; Sievert, W.; Jenkins, B.J., et al. Nucleotide oligomerization domain 1 enhances IFN- $\gamma$  signaling in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection and exacerbates disease severity. *J Immunol* **2013**, *190*, 3706-3715, doi:10.4049/jimmunol.1200591.
  33. JL, E.; A, T.; LQ, T.; S, K.; S, N. Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells. *PloS one* **2012**, doi:10.1371/journal.pone.0051306.
  34. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Sánchez-Zauco, N.; Gómez-Delgado, A.; Camorlinga-Ponce, M.; Maldonado-Bernal, C.; Fuentes-Pananá, E.M. Elevated Levels of Interferon-. *J Immunol Res* **2017**, *2017*, 7069242, doi:10.1155/2017/7069242.
  35. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* **2009**, *6*, e1000097, doi:10.1371/journal.pmed.1000097.
  36. Buzás, G.M.; Konderák, J. Co-infection with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in benign upper digestive diseases: An endoscopic and serologic pilot study. *United European Gastroenterol J* **2016**, *4*, 388-394, doi:10.1177/2050640615610265.
  37. Buzás, G.M.; Lotz, G.; Schneider, F.; Józán, J. [Changing prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the 9th district of Budapest. A retrospective endoscopic study, 1997-2012]. *Orv Hetil* **2013**, *154*, 900-907, doi:10.1556/OH.2013.29630.

38. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Flores-Luna, L.; Camorlinga-Ponce, M.; Carreón-Talavera, R.; Gomez-Delgado, A.; Kasamatsu, E.; Fuentes-Pananá, E.M. Case-control study of Epstein-Barr virus and *Helicobacter pylori* serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 1866-1873, doi:10.1038/bjc.2015.175.
39. Saxena, A.; Nath Prasad, K.; Chand Ghoshal, U.; Krishnani, N.; Roshan Bhagat, M.; Husain, N. Association of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus with gastric cancer and peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* **2008**, *43*, 669-674, doi:10.1080/00365520801909660.
40. Kattoor, J.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Ding, S.; Eizuru, Y.; Abraham, E.K.; Chandralekha, B.; Amma, N.S.; Nair, M.K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in southern India: A comparison with a large-scale Japanese series. *J Med Virol* **2002**, *68*, 384-389, doi:10.1002/jmv.10215.
41. Herrera-Goepfert, R.; Akiba, S.; Koriyama, C.; Ding, S.; Reyes, E.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Eizuru, Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population. *World J Gastroenterol* **2005**, *11*, 6096-6103, doi:10.3748/wjg.v11.i39.6096.
42. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Singh, A.; Saxena, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Epstein-Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. *Braz J Infect Dis* **2011**, *15*, 583-590.
43. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Expression profile of latent and lytic transcripts of Epstein-Barr virus in patients with gastroduodenal diseases: a study from northern India. *J Med Virol* **2012**, *84*, 1289-1297, doi:10.1002/jmv.23322.
44. de Souza, C.R.; de Oliveira, K.S.; Ferraz, J.J.; Leal, M.F.; Calcagno, D.Q.; Seabra, A.D.; Khayat, A.S.; Montenegro, R.C.; Alves, A.P.; Assumpção, P.P.,

- et al. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol* **2014**, *14*, 179, doi:10.1186/1471-230X-14-179.
45. Yoo, Y.; Lee, Y.; Lee, Y.M.; Choe, Y.H. Co-Infection with Cytomegalovirus and *Helicobacter pylori* in a Child with Ménétrier's Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **2013**, *16*, 123-126, doi:10.5223/pghn.2013.16.2.123.
46. Crespo, P.; Dias, N.; Marques, N.; Saraiva da Cunha, J. Gastritis as a manifestation of primary CMV infection in an immunocompetent host. *BMJ Case Rep* **2015**, *2015*, doi:10.1136/bcr-2014-206991.
47. Hokama, A.; Taira, K.; Yamamoto, Y.; Kinjo, N.; Kinjo, F.; Takahashi, K.; Fujita, J. Cytomegalovirus gastritis. *World J Gastrointest Endosc* **2010**, *2*, 379-380, doi:10.4253/wjge.v2.i11.379.
48. Castaneda, C.A.; Castillo, M.; Chavez, I.; Barreda, F.; Suarez, N.; Nieves, J.; Bernabe, L.A.; Valdivia, D.; Ruiz, E.; Dias-Neto, E., et al. Prevalence of. *J Glob Oncol* **2019**, *5*, 1-9, doi:10.1200/JGO.19.00122.
49. Yoshiwara, E.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Chirinos, J.L.; Watanabe, J.; Takano, J.; Miyagui, J.; Hidalgo, H., et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J Exp Clin Cancer Res* **2005**, *24*, 49-54.
50. Mendoza, D.; Herrera, P.; Gilman, R.H.; Lanfranco, J.; Tapia, M.; Bussalleu, A.; Tenorio, J.H.; Guillén-Rodríguez, C.E.; Arróspide, M.T.; Piscoya, A., et al. Variation in the prevalence of gastric cancer in Perú. *Int J Cancer* **2008**, *123*, 414-420, doi:10.1002/ijc.23420.
51. Cavalcante, M.Q.; Silva, C.I.; Braga-Neto, M.B.; Fialho, A.B.; Nunes Fialho, A.; Barbosa, A.M.; Cruz, F.W.; Rocha, G.A.; Queiroz, D.M.; Braga, L.L. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern

- Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 561-563, doi:10.1590/s0074-02762012000400021.
52. Asgeirsdottir, G.A.; Kjartansdottir, I.; Olafsdottir, A.S.; Hreinsson, J.P.; Hrafnkelsson, H.; Johannsson, E.; Björnsson, E.S. Helicobacter pylori infection in Icelandic children. *Scand J Gastroenterol* **2017**, *52*, 686-690, doi:10.1080/00365521.2017.1304986.
53. Kusano, C.; Gotoda, T.; Ishikawa, H.; Moriyama, M. The administrative project of Helicobacter pylori infection screening among junior high school students in an area of Japan with a high incidence of gastric cancer. *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 16-19, doi:10.1007/s10120-017-0688-7.
54. Inoue, M. Changing epidemiology of Helicobacter pylori in Japan. *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 3-7, doi:10.1007/s10120-016-0658-5.
55. Wang, C.; Nishiyama, T.; Kikuchi, S.; Inoue, M.; Sawada, N.; Tsugane, S.; Lin, Y. Changing trends in the prevalence of H. pylori infection in Japan (1908-2003): a systematic review and meta-regression analysis of 170,752 individuals. *Sci Rep* **2017**, *7*, 15491, doi:10.1038/s41598-017-15490-7.
56. Burucoa, C.; Axon, A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* **2017**, *22 Suppl 1*, doi:10.1111/hel.12403.
57. Watanabe, M.; Ito, H.; Hosono, S.; Oze, I.; Ashida, C.; Tajima, K.; Katoh, H.; Matsuo, K.; Tanaka, H. Declining trends in prevalence of Helicobacter pylori infection by birth-year in a Japanese population. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 1738-1743, doi:10.1111/cas.12821.
58. Corral, J.E.; Mera, R.; Dye, C.W.; Morgan, D.R. Helicobacter pylori recurrence after eradication in Latin America: Implications for gastric cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol* **2017**, *9*, 184-193, doi:10.4251/wjgo.v9.i4.184.

59. Bae, J.M.; Kim, E.H. Epstein-Barr Virus and Gastric Cancer Risk: A Meta-analysis With Meta-regression of Case-control Studies. *J Prev Med Public Health* **2016**, *49*, 97-107, doi:10.3961/jpmp.15.068.
60. Ohnishi, N.; Yuasa, H.; Tanaka, S.; Sawa, H.; Miura, M.; Matsui, A.; Higashi, H.; Musashi, M.; Iwabuchi, K.; Suzuki, M., et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 1003-1008, doi:10.1073/pnas.0711183105.
61. Yong, X.; Tang, B.; Li, B.S.; Xie, R.; Hu, C.J.; Luo, G.; Qin, Y.; Dong, H.; Yang, S.M. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun Signal* **2015**, *13*, 30, doi:10.1186/s12964-015-0111-0.
62. Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 306-316, doi:10.1016/j.chom.2014.02.008.
63. Dixon, B.R.E.A.; Hossain, R.; Patel, R.V.; Algood, H.M.S. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: a Dichotomy of Help and Harm. *Infect Immun* **2019**, *87*, doi:10.1128/IAI.00363-19.
64. Rahal, E.A.; Hajjar, H.; Rajeh, M.; Yamout, B.; Abdelnoor, A.M. Epstein-Barr Virus and Human herpes virus 6 Type A DNA Enhance IL-17 Production in Mice. *Viral Immunol* **2015**, *28*, 297-302, doi:10.1089/vim.2014.0129.
65. Shiomi, S.; Toriie, A.; Imamura, S.; Konishi, H.; Mitsufuji, S.; Iwakura, Y.; Yamaoka, Y.; Ota, H.; Yamamoto, T.; Imanishi, J., et al. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter* **2008**, *13*, 518-524, doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00629.x.
66. Salloum, N.; Hussein, H.M.; Jammaz, R.; Jiche, S.; Uthman, I.W.; Abdelnoor, A.M.; Rahal, E.A. Epstein-Barr virus DNA modulates regulatory T-cell



- programming in addition to enhancing interleukin-17A production via Toll-like receptor 9. *PLoS One* **2018**, *13*, e0200546, doi:10.1371/journal.pone.0200546.
67. Carbo, A.; Olivares-Villagómez, D.; Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J.; Chaturvedi, R.; Piazuelo, M.B.; Delgado, A.; Washington, M.K.; Wilson, K.T.; Algood, H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4<sup>+</sup> T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio* **2014**, *5*, e01243-01214, doi:10.1128/mBio.01243-14.
68. Caruso, R.; Fina, D.; Peluso, I.; Fantini, M.C.; Tosti, C.; Del Vecchio Blanco, G.; Paoluzi, O.A.; Caprioli, F.; Andrei, F.; Stolfi, C., et al. IL-21 is highly produced in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis. *J Immunol* **2007**, *178*, 5957-5965, doi:10.4049/jimmunol.178.9.5957.
69. Bagheri, N.; Azadegan-Dehkordi, F.; Shirzad, M.; Zamanzad, B.; Rahimian, G.; Taghikhani, A.; Rafieian-Kopaei, M.; Shirzad, H. Mucosal interleukin-21 mRNA expression level is high in patients with *Helicobacter pylori* and is associated with the severity of gastritis. *Cent Eur J Immunol* **2015**, *40*, 61-67, doi:10.5114/ceji.2015.50835.
70. Lebre, M.C.; Vieira, P.L.; Tang, M.W.; Aarrass, S.; Helder, B.; Newsom-Davis, T.; Tak, P.P.; Screaton, G.R. Synovial IL-21/TNF-producing CD4. *J Leukoc Biol* **2017**, *101*, 775-783, doi:10.1189/jlb.5A0516-217RR.
71. Ortega, C.; Estévez, O.A.; Fernández, S.; Aguado, R.; Rumbao, J.M.; Gonzalez, T.; Pérez-Navero, J.L.; Santamaría, M. Interleukin-21 overexpression dominates T cell response to Epstein-Barr virus in a fatal case of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. *Clin Vaccine Immunol* **2013**, *20*, 765-771, doi:10.1128/CVI.00002-13.
72. Sanaii, A.; Shirzad, H.; Haghghian, M.; Rahimian, G.; Soltani, A.; Shafigh, M.; Tahmasbi, K.; Bagheri, N. Role of Th22 cells in *Helicobacter pylori*-related

- gastritis and peptic ulcer diseases. *Mol Biol Rep* **2019**, doi:10.1007/s11033-019-05004-1.
73. Matsusaka, K.; Funata, S.; Fukayama, M.; Kaneda, A. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 3916-3926, doi:10.3748/wjg.v20.i14.3916.
74. Wu, W.K.; Yu, J.; Chan, M.T.; To, K.F.; Cheng, A.S. Combinatorial epigenetic deregulation by *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infections in gastric tumorigenesis. *J Pathol* **2016**, *239*, 245-249, doi:10.1002/path.4731.
75. Fukayama, M.; Kunita, A.; Kaneda, A. Gastritis-Infection-Cancer Sequence of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1045*, 437-457, doi:10.1007/978-981-10-7230-7\_20.
76. Saju, P.; Murata-Kamiya, N.; Hayashi, T.; Senda, Y.; Nagase, L.; Noda, S.; Matsusaka, K.; Funata, S.; Kunita, A.; Urabe, M., et al. Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16026, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.26.
77. Pandey, S.; Jha, H.C.; Shukla, S.K.; Shirley, M.K.; Robertson, E.S. Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by. *MBio* **2018**, *9*, doi:10.1128/mBio.00649-18.
78. Cui, H.; Jin, Y.; Chen, F.; Ni, H.; Hu, C.; Xu, Y.; Xuan, H.; Hu, D.; Deng, W.; Zhang, Y., et al. Clinicopathological evidence of Hepatitis B Virus infection in the development of gastric adenocarcinoma. *J Med Virol* **2019**, doi:10.1002/jmv.25584.
79. Espinoza, J.L.; Matsumoto, A.; Tanaka, H.; Matsumura, I. Gastric microbiota: An emerging player in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancies. *Cancer Letters* **2018**, *414*, 147-152, doi:10.1016/j.canlet.2017.11.009.

80. Coker, O.O.; Dai, Z.; Nie, Y.; Zhao, G.; Cao, L.; Nakatsu, G.; Wu, W.K.; Wong, S.H.; Chen, Z.; Sung, J.J.Y., et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* **2018**, *67*, 1024-1032, doi:10.1136/gutjnl-2017-314281.
81. Alarcón, T.; Llorca, L.; Perez-Perez, G. Impact of the Microbiota and Gastric Disease Development by *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 253-275, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_11.
82. Wakabayashi, R.; Nakahama, Y.; Nguyen, V.; Espinoza, J.L. The Host-Microbe Interplay in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Microorganisms* **2019**, *7*, doi:10.3390/microorganisms7070199.

## ANEXO

### Artículos originales

Esta tesis se basa en los siguientes artículos:

- I. Dávila-Collado, R., Jarquín-Durán, O., Dong, L. T., & Espinoza, J. L. (2020). Epstein–Barr Virus and Helicobacter Pylori Co-Infection in Non-Malignant Gastroduodenal Disorders. *Pathogens*, 9(2), 104.
- II. Jarquín Durán O, Dávila Collado R & Cuadra SN. (2020). Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori co-infection prevalence in gastroduodenal disorders: A proportion meta-analysis (*Manuscript Submitted*)

**Table 1. Serological parameters and interpretation for assessing Epstein–Barr Virus (EBV) infection status**

<u>Antibody</u>	<u>Active infection</u>	<u>Past infection</u>	<u>Reactivation</u>
VCA IgM	positive	negative	negative
VCA IgG	positive	positive	positive
EBNA IgM	positive	negative	positive
EBNA IgG	negative	positive	positive
EA-D IgG	negative	negative	positive

**Table 2. Prevalence of EBV and HP co-infection (serological studies).**

Study/Country	Method	Disease	No. Tested	EBV Positivity	<i>H. pylori</i> Positivity	Co-Infection Positivity	Key Findings
Buza's et al. 2015 [43] Hungary	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV viral capsid protein (VCA)	PUD	40	75%	72.5%	60%	Higher prevalence of <i>H. pylori</i> + EBV co-infection along with higher anti-IgG levels found in duodenal ulcer. Could be attributed to an increased viral load or a stronger immune response
		FD	33	51.2%	33.3%	18.1%	
		GERD	31	51.6%	25.8%	12.9%	
	<i>H. pylori</i> : -Giemsa stain -IgG-chemiluminescence	Overall	104	70.1%	56.7%	30%	
Cárdenas-Mondragón et al. 2012 [10]. México	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV VCA	Non-atrophic gastritis (NAG)	333 Pediatric patients (median age 10.1 ± 3.7)	64.3% (11.8)	53.4%	1.8 (1–2.4%)	EBV + <i>H. pylori</i> co-infection: significantly associated with severe gastritis. 2.4% (1%–9.7%)
Cárdenas-Mondragón et al. 2015 [45] México and Paraguay	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV VCA	Non-atrophic gastritis (NAG)	225 Patients (median age 30)	32 (14.3%)	18 (8%)	175 (77.7%)	EBV collaborates with <i>H. pylori</i> to induce severe inflammation, increasing the risk of malignant transformation
	<i>H. pylori</i> : ELISA test (IgG) against <i>H. pylori</i> whole-cell extracts and against CagA protein						

**Table 3. Prevalence of EBV and *H. pylori* co-infection (microbe detection in gastric tissues).**

Reference/ Country	Tissue/Method	Disease	No. Tested	EBV (%) Positivity	<i>H. pylori</i> Positivity	Co-Infection Positivity	Caga Positivity
[49] Castaneda et.al. Peru	Gastric biopsy specimens	Chronic gastritis	165	4 (2.4)	112 (67.9)	2 (1.2)	
	<i>H. pylori</i> : qPCR detection of hspA And Urea genes	Comparative samples: GC	375	72 (19.2)	228 (60.8)	40 (10.7)	
		Overall	540	76 (14.1)	340 (63.0)	42 (7.8)	
	EBV: PCR detection of BNRF1 gene						
[15] Moral-Hernández et al.2019. México.	Gastric biopsy specimens	Chronic gastritis	106	74 (69.8)	51 (48.1)	27 (25.4)	
	<i>H. pylori</i> : 16S rRNA gene detection by PCR	Comparative samples: gastric cancer	32	30 (87.5)	13 (40.6)		12 (37.5)
		Overall	138	104 (75.4)	64 (46.4)		39 (28.2)
	EBV: PCR detection of EBNA1 gene						
[50] De Souza et al.2014. Brazil	Gastric biopsy specimens	Juvenile patients with upper gastrointestinal symptoms	62	2 (3.2)	31 (50)	1 (1.6)	20 (32.3)
	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR	Comparative samples: adults with similar symptoms	39	2 (5.1)	27 (69.2)	2 (5.1)	20 (51.3)
		Comparative samples 2: adults with Gastric cancer	125	12 (9.6)	110 (88)	12 (9.6)	84 (67.2)
EBV: Eber1 detection by ISH							
[51] Shukla et al.  2012. India	Gastric biopsy specimens	Non-ulcer dyspepsia	120	36 (30)	Unreported	Unreported	Unreported
	<i>H. pylori</i> :						

	Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	30	19 (63.3)	Unreported	Unreported	Unreported
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene and also BZLF1, BARF1 and BcLF1 genes	Comparative samples: gastric cancer	50	40 (80)	Unreported	Unreported	Unreported
		Overall	200	95 (47.5)	105 (52.5)	56 (28)	Unreported
	Gastric biopsy specimens	Non-ulcer dyspepsia	100	37 (37)	46 (46)	23 (23)	
[52] Shukla et al. 2011. India	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	50	35 (70)	41 (82)	31 (62)	
		Comparative samples: gastric cancer	50	45 (90)	31	27	
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene	Overall	200	117 (58.5)	118 (59)	81 (40.5)	
	Gastric biopsy specimens	Non ulcer dyspepsia	241	90 (37.3)	133 (55.2)	71 (29.5)	
[46] Saxena et al. 2008. India	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	45	34 (75.6)	36 (80)	28 (62.2)	
		Comparative samples: gastric cancer	62	51 (82.3)	35 (56.5)	29 (46.8)	
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene	Overall	348	175 (50.3)	204 (58.6)	128 (36.8)	
	<i>H. pylori</i> Ureasa test						
	PCR						

<sup>1</sup> PUD: peptic ulcer disease; GERD: gastroesophageal reflux disease; NAD: Non-atrophic gastritis; FD: functional dyspepsia; GC: Gastric Cancer, CG: Chronic gastritis, NUD (non-ulcer dyspepsia).



**Table 4. Estimates of prevalence and heterogeneity according to gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	540	7,7	5,6 to 10,3	38,42	17,16
Fasciana Teresa, 2019	72	30,5	20,2 to 42,5	5,18	15,97
Sanket kumar, 2011	200	40,5	33,6 to 47,6	14,28	16,83
Oscar del Moral Hernández, 2017	138	28,2	20,9 to 36,5	9,87	16,61
Ashish Saxena, 2009	348	36,7	31,7 to 42,0	24,79	17,05
György M Buza's, 2016	104	32,6	23,8 to 42,5	7,46	16,37
Total (fixed effects)	1402	23	20,8 to 25,3	100	100
Total (random effects)	1402	28,5	15,2 to 44,0	100	100

**Table 5. Test for heterogeneity in the population with gastroduodenal disorders**

Q	171,81
DF	5
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	97,09%
95% CI for I <sup>2</sup>	95,45 to 98,14

**Tabla 6. Estimates of prevalence and heterogeneity according to benign gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	165	1,212	0,147 to 4,310	23,51	17,41
Fasciana Teresa, 2019	24	29,167	12,6 to 51,0	3,54	14,43
Sanket kumar, 2011	100	23	15,1 to 32,4	14,31	17,01
Oscar del Moral Hernández, 2017	106	25,4	17,5 to 34,8	15,16	17,06
Ashish Saxena, 2009	241	29,4	23,7 to 35,6	34,28	17,61
Gyo`rgy M Buza's, 2016	64	15,6	7,7 to 26,8	9,21	16,47
Total (fixed effects)	700	17,9	15,1 to 20,9	100	100
Total (random effects)	700	18,9	7,8 to 33,4	100	100

**Table 7. Test for heterogeneity in the population with benign gastroduodenal disorders**

Q	91,84
DF	5
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	94,56%
95% CI for I <sup>2</sup>	90,65 to 96,83

**Table 8. Estimates of prevalence and heterogeneity according to premalignant gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Sanket kumar, 2011	50	62	47,1 to 75,3	36,96	36,96
Ashish Saxena, 2009	45	62,2	46,5 to 76,2	33,33	33,33
György M Buza's, 2016	40	60	43,3 to 75,1	29,71	29,71
Total (fixed effects)	135	61,2	52,5 to 69,4	100	100
Total (random effects)	135	61,2	52,9 to 69,1	100	100

**Table 9. Test for heterogeneity in the population with premalignant gastroduodenal disorders**

Q	0,05
DF	2
Significance level	P = 0,97
I <sup>2</sup> (inconsistency)	0,00%
95% CI for I <sup>2</sup>	0,00 to 0,00

**Table 10. Estimates of prevalence and heterogeneity according to malignant gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	375	10,6	7,7 to 14,2	65,73	21,16
Fasciana Teresa, 2019	48	31,25	18,6 to 46,2	8,57	19,78
Sanket kumar, 2011	50	54	39,3 to 68,1	8,92	19,84
Oscar del Moral Hernández, 2017	32	37,5	21,1 to 56,3	5,77	19,09
Ashish Saxena, 2009	62	46,7	33,9 to 59,8	11,01	20,12
Total (fixed effects)	567	20,1	16,9 to 23,6	100	100
Total (random effects)	567	34,7	15,3 to 57,2	100	100

**Table 11. Test for heterogeneity in the population with malignant gastroduodenal disorders**

Q	81,6
DF	4
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	95,10%
95% CI for I <sup>2</sup>	91,22 to 97,27

Review

# Epstein–Barr Virus and *Helicobacter Pylori* Co-Infection in Non-Malignant Gastroduodenal Disorders

Ramsés Dávila-Collado <sup>1</sup>, Oscar Jarquín-Durán <sup>1</sup>, Le Thanh Dong <sup>2</sup> and J. Luis Espinoza <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, UNIDES University, Managua 11001, Nicaragua

<sup>2</sup> Faculty of Medical Technology, Hanoi Medical University, Hanoi 116001, Vietnam

<sup>3</sup> Faculty of Health Sciences, Kanazawa University, Kodatsuno 5-11-80, Kanazawa 920-0942, Ishikawa, Japan

\* Correspondence: luis@staff.kanazawa-u.ac.jp

Received: 20 January 2020; Accepted: 5 February 2020; Published: 6 February 2020

**Abstract:** Epstein–Barr virus (EBV) and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are two pathogens associated with the development of various human cancers. The coexistence of both microorganisms in gastric cancer specimens has been increasingly reported, suggesting that crosstalk of both pathogens may be implicated in the carcinogenesis process. Considering that chronic inflammation is an initial step in the development of several cancers, including gastric cancer, we conducted a systematic review to comprehensively evaluate publications in which EBV and *H. pylori* co-infection has been documented in patients with non-malignant gastroduodenal disorders (NMGDs), including gastritis, peptic ulcer disease (PUD), and dyspepsia. We searched the PubMed database up to August 2019, as well as publication references and, among the nine studies that met the inclusion criteria, we identified six studies assessing EBV infection directly in gastric tissues (total 949 patients) and three studies in which EBV infection status was determined by serological methods (total 662 patients). Due to the substantial methodological and clinical heterogeneity among studies identified, we could not conduct a meta-analysis. The overall prevalence of EBV + *H. pylori* co-infection in NMGDs was 34% (range 1.8% to 60%). A higher co-infection rate (EBV + *H. pylori*) was reported in studies in which EBV was documented by serological methods in comparison with studies in which EBV infection was directly assessed in gastric specimens. The majority of these studies were conducted in Latin-America and India, with most of them comparing NMGDs with gastric cancer, but there were no studies comparing the co-infection rate in NMGDs with that in asymptomatic individuals. In comparison with gastritis caused by only one of these pathogens, EBV + *H. pylori* co-infection was associated with increased severity of gastric inflammation. In conclusion, only relatively small studies testing EBV and *H. pylori* co-infection in NMGDs have been published to date and the variable report results are likely influenced by geographic factors and detection methods.

**Keywords:** Epstein-Barr virus; gastritis; non-ulcerous peptic disease; peptic ulcer disease; *helicobacter pylori*

## 1. Introduction

Symptoms associated with upper gastrointestinal disorders such as epigastric pain and dyspepsia are common in general practice and represent a source of substantial morbidity, mortality, and health care cost [1]. Dyspepsia refers to a spectrum of symptoms that include recurrent pain or discomfort in the epigastric region, postprandial epigastric distension, and nausea or vomiting. These symptoms may be acute or chronic and account for a large number of doctor visits in primary care [2]. Etiologically, dyspepsia can be linked to various underlying disorders, such as gastroesophageal

reflux disease (GERD), gastritis, peptic ulcer disease (PUD) or gallbladder diseases, however, for nearly one-third of cases, routine diagnostic procedures, including an upper endoscopy, do not identify an underlying organic or biochemical abnormality, and these cases are categorized as functional dyspepsia (FD) [2,3].

According to the recently revised Rome IV criteria, FD is defined by any combination of four symptoms (postprandial fullness, early satiety, epigastric pain, and epigastric burning) that interfere with usual individual activities, occurred at least 3 days per week in the last 3 months, and started at least 6 months prior to assessment, with no evidence of organic, systemic, metabolic or structural disease likely to explain those symptoms [4]. FD is one of the most prevalent functional gastrointestinal disorders (estimated worldwide prevalence of 5%–20%) and although it is not life-threatening, FD significantly impairs quality of life and increases health care expenses for both the patients and society [4]. The etiology of FD appears to be multifactorial, including *H. pylori* infection or gastrointestinal motility disorders that can be due to hypersensitivity to mechanical and chemical stimuli, immune activation, and elevated mucosal permeability in the proximal small intestine [4,5]. In addition, genetic predisposition and psychopathological comorbidity have also been proposed, although the evidence is weaker than has been observed in other functional gastrointestinal disorders, such as irritable bowel syndrome [5].

Gastritis is inflammation of the gastric mucosa that can be acute or chronic [1]. Acute gastritis involves areas of erosion of the mucosa of the stomach due to damage to mucosal defenses such as a reduction in protective prostaglandins caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), or may be the result of the effects of deleterious factors that directly include cellular necrosis. The two most important causes of gastritis are *H. pylori* infection and NSAIDs [6].

Chronic gastritis is the persistent and often progressive inflammation of the mucosa of the stomach that can be caused by either infectious (such as *H. pylori*, herpes virus, or cytomegalovirus) or noninfectious (such as NSAIDs, autoimmune gastritis, chemotherapy, or uremic gastropathy) conditions [7]. Prevalence of chronic gastritis has markedly declined in the developed world in recent decades but still remains an important cause of morbidity because long-term gastric inflammation can result in the development of peptic ulcer disease (PUD). Chronic gastritis can also lead to atrophic gastritis and gastric intestinal metaplasia (GIM), which are associated with mucosal dysfunctions and deficient absorption of essential vitamins, (vitamin B12) and micronutrients, such as iron, calcium, magnesium, and zinc. Both atrophic gastritis and GIM are considered precancerous conditions due to their strong association with gastric cancer [8].

PUD refers to an injury to the digestive tract caused by peptic acid, which results in a mucosal break (erosions or ulceration) reaching the submucosa. PUDs are usually located in the stomach or proximal duodenum, and less frequently in the esophagus [7,9]. About 10% of people develop PUD at some point in their life (annual incidence 0.1%–0.3%), however, the prevalence of this disorder, along with its associated hospitalization and mortality rates, are declining worldwide, particularly in developed countries, which has been attributed to the reduction in the burden of *H. pylori* infection and changes in the usage of NSAIDs [9].

Several studies have documented the simultaneous presence of EBV and *H. pylori* in gastric cancer specimens (ranging from 6% to 12%) and the significance of co-infection with both pathogens in gastric cancer was also assessed in meta-analysis [10–13]. Considering that persistent inflammation is associated with the development of cancer [14], one may speculate that individuals who develop gastric cancer in association with EBV or *H. pylori* may present with some degree of mucosal inflammation. Indeed, various studies have investigated the potential role of *H. pylori* and EBV co-infection in the development of gastritis and other non-malignant gastroduodenal disorders (NMGDs), including PUD, dyspepsia, and GERD, although variable results have been reported thus far [10,11,15]. We, therefore, conducted a systematic review to comprehensively evaluate publications in which EBV and *H. pylori* co-infections have been documented in patients with NMGDs.

## 2. Biology and Disease Associations of *H. pylori* and EBV

*H. pylori* is a spiral-shaped gram-negative bacterium that has evolved various mechanisms to survive in the acidic environment of the human stomach. More than 50% of the global population has *H. pylori* in their upper gastrointestinal tract, with considerable geographical variations, with a higher prevalence in lower-income countries [16,17]. Infection with *H. pylori* is acquired (typically during early childhood) by the ingestion of contaminated food or water and is asymptomatic in up to 90% of people, however, some individuals develop acute gastritis, which may spontaneously resolve or may progress to chronic gastritis, PUD, or lead to premalignant lesions such as atrophic gastritis and GIM [18]. The lifetime risk of developing gastric cancer in *H. pylori*-infected individuals is 2% and thus this pathogen has been classified as Class-I carcinogen [19,20].

*H. pylori* express various factors that allow the bacterium to colonize and induce persistent infection in the stomach. For example, the adhesion membrane proteins, such as lipoproteins A and B (AlpA/B), blood group antigen binding adhesion (BabA), outer inflammatory protein A (OipA) and sialic acid-binding adhesion (SabA), allow the bacterium to adhere to the gastric epithelium via receptor-mediated adhesion mechanisms [21]. The presence of flagella and the enzyme urease, which hydrolyzes urea releasing ammonia, thus neutralizing the acidic gastric environment, also contribute to *H. pylori* colonization of the stomach. In addition, *H. pylori* express various virulence factors that can induce cellular damage predominantly through the effects of secretory toxins, including vacuolating cytotoxin A (VacA) and cytotoxin-associated gene A (CagA) [22].

EBV is a  $\gamma$ -herpes virus that infects nearly 90% of adults around the world and is etiologically associated with several lymphoid malignancies, including Hodgkin lymphoma, Burkitt's lymphoma, a subset of diffuse large B-cell lymphomas, and nasal T/NK cell lymphomas [23,24]. The virus, which is most often acquired during infancy by contact with the saliva of infected individuals, firstly infects epithelial cells of the nasopharynx and thereafter spreads to B lymphocytes, and ultimately establishes lifelong latent infection in memory B cells. Acute EBV infection is usually asymptomatic or may cause a febrile benign infection, however, in some individuals, especially when first infected during adolescence, the virus causes the typical infectious mononucleosis syndrome with fever, malaise, and lymphadenopathy. EBV latency is categorized into three types: latency I, latency II, and latency III, based on the array of viral genes that are expressed. The host immune response, mostly mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTL), plays an essential role in preventing infected cells from switching to a lytic stage with productive viral replication. This is illustrated by the frequent reactivation of EBV infections observed in immunodeficiency conditions such as post-transplant lymphoproliferative disease, in which EBV-infected B-cells proliferate due to therapeutic immunosuppression after organ transplantation [25,26].

EBV can also infect epithelial cells, including cells of the gastric mucosa, where it may induce acute or chronic gastritis [11], and accumulating evidence appears to link the virus with the development of gastric cancer [27].

An increased number of reports suggest that some sort of cooperation exists between EBV and *H. pylori*, where the presence of one of these microorganisms may promote the growth of the other and vice versa, and could also increase their virulence. Although the mechanisms controlling this synergistic interaction are not entirely known, several lines of evidence suggest that during the course of co-infection with *H. pylori* and EBV, immune cell recruitment to the site of infection is considerably increased, which potentiates gastric inflammation and tissue damage. For example, monochloramine, an oxidant produced in the stomach in the presence of *H. pylori* infection, can induce the conversion of EBV from the latent to the lytic phase [28]. On the other hand, pro-inflammatory cytokines arising in the course of gastric inflammation induced by *H. pylori* may contribute to the proliferation of EBV. For example, interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) secretion induced by *H. pylori* promotes an inflammatory milieu that exacerbates disease severity [29], and this cytokine, along with IL-6 and IL-13, promote EBV proliferation, and higher levels of proinflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-8, have been reported to promote severe gastritis associated EBV and *H. pylori* co-infection [10]. In line with these observations, IFN- $\gamma$  levels in the plasma of patients with gastric cancers are positively correlated with the degree of EBV reactivation[30].

Furthermore, persistent activation of Th17 cells appears to be implicated with the gastric inflammation associated with *H. pylori* and EBV co-infection. Th17 cells are a subset of helper CD4+ T cells with proinflammatory properties that activate innate immune cells, regulate B cell responses, and participate in antimicrobial immune responses and wound healing. Th17 cells and their key cytokine, IL-17A, are implicated in the pathogenesis of gastritis induced by *H. pylori* [31]. For example, animal studies have shown that EBV directly induces the secretion of the proinflammatory cytokine IL17 [32]) and higher neutrophil infiltration within the submucosa and lamina propria of the stomach in *H. pylori*-infected wild type compared to their *H. pylori*-infected IL-17A-/- counterparts [33], thus suggesting that IL-17A is required for neutrophil infiltration. Similarly, increased levels of IL-17A and IL-8 were observed in the gastric mucosa of gastric ulcer and non-ulcer *H. pylori*-infected patients compared to uninfected non-ulcer patients, and both IL-17A and IL-8 are strongly correlated with an increase in neutrophil infiltration in infected patients. Interestingly, serum levels of IL-17 directly correlate with the EBV DNA load in individuals with rheumatoid arthritis, which was not observed in controls, and this IL-17 enhancement, in the course of EBV infection, is mediated by toll-like receptor 9 (TLR9) [34].

IL-21 is a pleiotropic proinflammatory cytokine secreted by Th17 cells, as well as by T follicular helper cells and NK cells or Th1 cells. IL-21-deficient mice showed impaired immune cell infiltration in the gastric mucosa in response to *H. pylori* [35] and human studies have shown that IL-21 is produced in the gastric mucosa in response to *H. pylori* infection and its expression level appears to correlate with the severity of gastric inflammation [36,37]. Interestingly, IL-21 was able to directly activate gastric epithelial cells leading to the upregulation of matrix metalloprotease 1 (MMP-1) and MMP-3 on the gastric cell line AGS cells and in fibroblast-like synoviocytes [36,38], which may contribute to tissue damage. Notably, IL-21 was expressed in circulating CD4+ and CD8+ T cells in a patient with lymphoproliferative disorder associated with EBV infection, which was associated with severe tissue damage [39].

### 3. Material and Methods

This study was conducted following the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement [40]. We used PubMed database to search articles listed on or before September 30, 2019, using the following search terms “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* and gastritis”, “EBV, *helicobacter pylori* and gastritis”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* and duodenitis”, “EBV, *helicobacter pylori* and duodenitis”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* and gastrointestinal inflammation”, “EBV, *helicobacter pylori* and gastrointestinal inflammation”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* and non-ulcer peptic disease”, “EBV, *helicobacter pylori* and non-ulcer peptic disease”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* and peptic ulcer disease”, “EBV, *helicobacter pylori* and peptic ulcer disease”, “Epstein Barr Virus and *helicobacter pylori* coinfection”, “EBV and *helicobacter pylori* coinfection”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* coinfection and gastrointestinal disorders”, “EBV, *helicobacter pylori* coinfection and gastrointestinal disorders”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* coinfection and gastroduodenal inflammation”, “EBV, *helicobacter pylori* coinfection and gastroduodenal inflammation”, “Epstein Barr Virus, *helicobacter pylori* coinfection and gastritis”, “EBV, *helicobacter pylori* coinfection and gastritis”. In addition, references listed in eligible articles were further scrutinized for identifying studies missed in the primary screening.

#### 3.1. Study Selection and Data Extraction

A flow diagram of the study selection process is shown in Figure 1. Prospective studies were selected by three independent researchers (JLE, RDC, and OJD). Titles and abstracts were browsed during a primary selection and potentially eligible studies were subject to full-text review. Discrepancies regarding study inclusion or exclusion were resolved by further review and discussion. Eligibility criteria for inclusion were (1) the search was limited to studies in humans, (2) studies must have ascertained EBV status of gastroduodenal tissue using (EBV-encoded RNA) EBER in situ hybridization, PCR, or serological methods that detect EBV infection, and (3) studies that reported *H. pylori* positivity in gastroduodenal specimens. Extracted items included general study



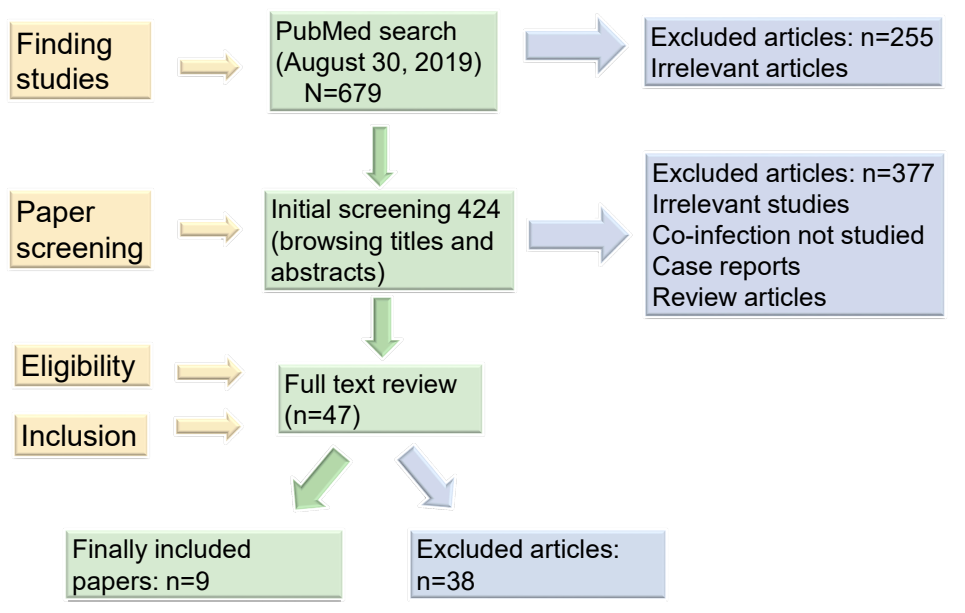
characteristics (year, country, study design), characteristics of the study populations (size, sex, age, disease-related factors), and types of measurements (specimen types, analytic procedures). The number of cases was extracted from all publications or, in some cases, calculated from the reported percentage of cases.

### 3.2. Studies Included

A total of 679 titles were identified in the first round of data retrieval and 255 of them were rapidly excluded because their titles were clearly irrelevant, even though they had the keywords “EBV and *Helicobacter pylori* co-infection”. After browsing titles and abstracts, 377 articles were further excluded because some were case reports, others were conference proceedings, some were review articles, some included only gastric cancer patients and, in some studies, co-infection was not studied. The remaining 47 articles were subjected to full-text review and finally, nine papers met the inclusion criteria and were then systematically reviewed. Due to the excessive clinical diversity and substantial methodological heterogeneity among studies, as well as the small number of patients enrolled in most studies, with low statistical power, we could not perform a meta-analysis.

## 4. Results

After extensive review, we identified nine studies that met the selection criteria. The flow chart of the literature searches and study selection strategy is shown in Figure 1. Among the selected studies, EBV was directly detected in gastric tissues in six studies and, in three studies, serological methods that detect EBV infection were utilized. Notably, except for a study conducted in Hungary, all studies were conducted either in Latin America (Mexico, Peru, Paraguay, and Brazil) or in India (three studies). In total, 1611 individuals with NMGD were included in the present systematic review. Among them, 662 were from studies assessing active EBV infection by serological methods and 949 were from studies in which EBV infection was directly documented in gastric tissues.



**Figure 1.** Outline of the article search and study selection.

### 4.1. Studies Assessing EBV by Serological Methods.

Serological diagnosis of EBV infection is based on the utilization of specific antibodies that recognize EBV antigens as determining disease status, however, given the ubiquitous distribution of

the virus, infecting nearly 95% of adult worldwide population, and the high degree of interindividual variability, studies assessing EBV infection by serological methods must be interpreted cautiously. Three viral antigens, the viral capsid antigens (VCAs), the early antigens (EAs), and the Epstein–Barr nuclear antigens (EBNAs), are typically detected in serological studies. In general, EBV infection status is determined by testing more than one parameter, which provides reasonable criteria to distinguish an acute from a past EBV infection. For example, whereas the presence of anti-VCA IgG and IgM antibodies indicates active acute infection if anti-EBNA 1 is not detected [41], the presence of anti-VCA IgG and anti-EBNA IgG positivity in the absence of anti-VCA IgM antibodies suggests a past (non-active) infection [42]. The serological results and interpretation are listed in Table 1.

**Table 1.** Serological parameters and interpretation for assessing Epstein–Barr Virus (EBV) infection status [41,42].

<b>Antibody</b>	<b>Active infection</b>	<b>Past infection</b>	<b>Reactivation</b>
VCA IgM	positive	negative	negative
VCA IgG	positive	positive	positive
EBNA IgM	positive	negative	positive
EBNA IgG	negative	positive	positive
EA-D IgG	negative	negative	positive

We identified three studies in which EBV infection status was assessed by serological methods (Table 2). A prospective study conducted in Hungary assessed the prevalence of *H. pylori* and EBV co-infection in 104 patients aged between 18 and 80 years with benign upper digestive diseases, as confirmed by endoscopy [43]. EBV infection status was assessed by serology and *H. pylori* infection was determined by the modified Giemsa stain and by IgG-chemiluminescence. Co-infection with *H. pylori* and EBV was significantly more prevalent in patients with duodenal ulcer (60%), while in functional dyspepsia (18.1%) and reflux (12.9%), infection prevalence was similar to that of the general population. The major limitations of this study include the low number of cases enrolled (total 104), with less than 50 cases in each subgroup (PUD 40, FD 33 and 31 RD), which considerably impairs the statistical power of the analysis. In addition, the fact that infection status was assessed by serological methods may have contributed to overestimating the co-infection rate. This is especially relevant considering the fact that EBV was diagnosed based only on IgG and IgM against VCA, and IgG anti-EBNA1 were not included in the analysis, which makes it difficult to distinguish between active infection and past infection. This may suggest that some cases categorized as EBV-seropositive did not have an active EBV infection. This notion may be supported by the fact that, according to “laboratory database” cited by the authors, the overall seroprevalence of *H. pylori* in the general population of the district where the study was conducted (the year 2014) was 29.4% (2385 out of 8107 cases), while EBV IgG was positive in 62.9% (2254 out of 3578 cases) and VCA IgG positivity was 79.4% (2825 out of 3556 cases), and seroprevalence for both pathogens in this population was 27.9% (59 out of 211 cases). Interestingly, a study by the same group reported a gradual decrease in the prevalence of *H. pylori* infection from 71.3% to 32.7% between 1997 and 2012 [44].

**Table 2.** Prevalence of EBV and HP co-infection (serological studies).

Study/Country	Method	Disease	No. Tested	EBV Positivity	<i>H. pylori</i> Positivity	Co-Infection Positivity	Key Findings
Buza's et al. 2015 [43] Hungary	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV viral capsid protein (VCA)	PUD	40	75%	72.5%	60%	Higher prevalence of <i>H. pylori</i> + EBV co-infection along with higher anti-IgG levels found in duodenal ulcer. Could be attributed to an increased viral load or a stronger immune response
		FD	33	51.2%	33.3%	18.1%	
		GERD	31	51.6%	25.8%	12.9%	
	<i>H. pylori</i> : -Giemsa stain -IgG-chemiluminescence	Overall	104	70.1%	56.7%	30%	
Cárdenas-Mondragón et al. 2012 [10]. Mexico	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV VCA	Non-atrophic gastritis (NAG)	333 pediatric patients (median age 10.1 ± 3.7)	64.3%	53.4%	1.8 (1–11.8)	EBV + <i>H. pylori</i> co-infection: significantly associated with severe gastritis. 2.4% (1%–9.7%)
	<i>H. pylori</i> : ELISA test (IgG) against <i>H. pylori</i> whole-cell extracts and against CagA protein						
Cárdenas-Mondragón et al. 2015 [45] Mexico and Paraguay	EBV: ELISA test (IgG and IgM) against EBV VCA	Non-atrophic gastritis (NAG)	225 patients (median age 30)	32 (14.3%)	18 (8%)	175 (77.7%)	EBV collaborates with <i>H. pylori</i> to induce severe inflammation, increasing the risk of malignant transformation
	<i>H. pylori</i> : ELISA test (IgG) against <i>H. pylori</i> whole-cell extracts and against CagA protein						

A study conducted in Mexico showed that co-infection with EBV and *H. pylori* in children is associated with severe gastritis [10]. The study included 333 pediatric patients (0–17 years old) with recurring abdominal pain and the frequency of EBV infection, assessed by IgG and IgM antibodies against VCA, was 64.3% and *H. pylori* infection determined by IgG antibodies against *H. pylori* whole-cell extracts was 53.4%. Importantly, children infected only by EBV presented mild mononuclear cell (MNC) and polymorphonuclear cell (PMNC) infiltration, while those infected by *H. pylori* presented moderate MN and mild PMN. In contrast, patients co-infected with both pathogens were significantly associated with severe gastritis. Of note, 33.9% of patients presented antibodies against CagA, however, the sole infection with *H. pylori* CagA+ strains was not sufficient to cause a severe inflammatory response in the absence of EBV infection. These observations suggest that, at least in the pediatric population, *H. pylori* infection alone may not be sufficient to cause severe gastritis and point to a synergistic or cooperative effect of EBV and *H. pylori* in the pathogenesis of gastric inflammation.

The same group conducted a case-control study, in which antibodies against EBV, *H. pylori* and CagA were analyzed for association with the type of gastric lesion and the degree of inflammation [45]. This study included 525 adult patients ( $\geq 30$  years old) from two Latin American countries (309 from Mexico and 216 from Paraguay). Among them, 225 samples (42.9%) were categorized as NAG, 186 samples (35.4%) were classified as premalignant lesions and 114 (21.7%) as gastric cancer. Importantly, seropositivity for both pathogens (*H. pylori*+/*EBV*+) in this study was very high (434/525); while 63 were seropositive only for EBV, 25 were positive for *H. pylori*, and three patients were double negative. A significantly increased risk was observed for premalignant lesions when *H. pylori*+/*EBV*+ was compared with *H. pylori*+ alone (OR = 8.4, 95% CI 1.8–38.9), as well as with EBV infection alone (OR = 2.0; 95% CI 1.03–3.9). Importantly, EBV + *H. pylori* coinfection was also significantly associated with increased mononuclear cells and polymorphonuclear cells' (PMNC) infiltration in gastric tissues compared with single infection. It must be noted that since this study was based on serological methods, the lack of microbiological or molecular evidence supporting the presence of these pathogens in gastric tissues is a major limitation. In addition, the fact that EBV infection status was solely based on one serological parameter (IgG anti-VCA) may account for the elevated co-infection rate reported in the studied population. In line with this observation, whereas most patients were positive for IgG antibodies, only 120 (22.9%) were also positive for IgA anti-VCA.

As mentioned above, EBV infection status is determined by testing more than one parameter to accurately distinguish acute from a past EBV infection, thus, considering that IgM anti-VCA measurements were not included in this study, as the authors stated, “because only a few samples were positive, and IgM-positive patients preferentially presented NAG, we did not continue that analysis”, based on the available data, the proportion of patients with an active EBV infection is unknown. In addition, the study included serum samples from 129 asymptomatic individuals (median age =  $41.6 \pm 7.7$ ; 0.98 male to female ratio) that were tested for anti-VCA and anti-*H. pylori* antibodies titers. In this group, the median antibody titers were 72.7 for anti-VCA IgG, 1.2 for anti-*H. pylori* IgG, and 1.0 for anti-CagA IgG. Unfortunately, further analysis in this group was not pursued. For example, data on the seroprevalence of antibodies against both pathogens in this group were not shown.

#### 4.2. Studies EBV Infection Directly Assessing in Gastric Tissues.

The presence of EBV and *H. pylori* in gastric tissues was assessed in six studies (Table 3). A study conducted in India prospectively studied the association of *H. pylori* and EBV in patients with gastric cancer and PUD. For that purpose, 348 adult patients (non-ulcer dyspepsia (NUD) 241, PUD 45, GC 62) undergoing upper gastrointestinal endoscopy between September 2003 and May 2007 were enrolled in the study [46]. Interestingly, *H. pylori* infection rate, diagnosed by rapid urease test, culture, histopathology, and PCR, was significantly higher in patients with PUD than in those with gastric cancer (80% versus 56.5%,  $p = 0.01$ ) and NUD (80% versus 55.2%,  $p = 0.002$ ). On the other hand, EBV DNA, which was detected by PCR for EBNA-1 gene and sequence analysis, was more frequently

detected in patients with gastric cancer and PUD than in those with NUD. Coinfection with both pathogens was more frequent in patients with PUD (62.2%) in comparison with gastric cancer (46.8%) and NUD (29.5%). An intriguing finding of this study was the high prevalence of EBV DNA (50.3%) in the study population, which is not consistent with that reported in other studies, where the detection rate of EBV DNA in patients with gastric cancer ranges from 4.6% to 16% [45,47,48]. Potential technical issues associated with the PCR method utilized to detect the EBV DNA may have contributed to such a high virus detection rate, however, in this study, a fraction of the samples that tested positive for EBNA-1 were also confirmed by sequence analysis, which appears to support the veracity of the findings.

**Table 3.** Prevalence of EBV and *H. pylori* co-infection (microbe detection in gastric tissues).

Reference/ Country	Tissue/Method	Disease	No. Tested	EBV (%) Positivity	<i>H. pylori</i> Positivity	Co-Infection Positivity	Caga Positivity
[49] Castaneda et.al. Peru	Gastric biopsy specimens	Chronic gastritis	165	4 (2.4)	112 (67.9)	2 (1.2)	
	<i>H. pylori</i> : qPCR detection of hspA and UreA genes	Comparative samples: GC	375	72 (19.2)	228 (60.8)	40 (10.7)	
		Overall	540	76 (14.1)	340 (63.0)	42 (7.8)	
[15] Moral-Hernández et al.2019. Mexico.	Gastric biopsy specimens	Chronic gastritis	106	74 (69.8)	51 (48.1)	27 (25.4)	
		Comparative samples: gastric cancer	32	30 (87.5)	13 (40.6)	12 (37.5)	
	<i>H. pylori</i> : 16S rRNA gene detection by PCR	Overall	138	104 (75.4)	64 (46.4)	39 (28.2)	
		EBV: PCR detection of EBNA1 gene					
[50] de Souza et al. 2014. Brazil	Gastric biopsy specimens	Juvenile patients with upper gastrointestinal symptoms	62	2 (3.2)	31 (50)	1 (1.6)	20 (32.3)
	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR	Comparative samples: adults with similar symptoms	39	2 (5.1)	27 (69.2)	2 (5.1)	20 (51.3)
		Comparative samples 2: adults with gastric cancer	125	12 (9.6)	110 (88)	12 (9.6)	84 (67.2)
[51] Shukla et al. 2012. India	Gastric biopsy specimens	Non-ulcer dyspepsia	120	36 (30)	Unreported	Unreported	Unreported
	<i>H. pylori</i> :						

	Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	30	19 (63.3)	Unreported	Unreported	Unreported
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene and also BZLF1, BARF1 and BcLF1 genes	Comparative samples: gastric cancer	50	40 (80)	Unreported	Unreported	Unreported
		Overall	200	95 (47.5)	105 (52.5)	56 (28)	Unreported
	Gastric biopsy specimens	Non-ulcer dyspepsia	100	37 (37)	46 (46)	23 (23)	
[52] Shukla et al. 2011. India	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	50	35 (70)	41 (82)	31 (62)	
		Comparative samples: gastric cancer	50	45 (90)	31	27	
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene	Overall	200	117 (58.5)	118 (59)	81 (40/5)	
	Gastric biopsy specimens	Non ulcer dyspepsia	241	90 (37.3)	133 (55.2)	71 (29.5)	
[46] Saxena et al. 2008. India	<i>H. pylori</i> : Rapid urease test and PCR for urea gene	PUD	45	34 (75.6)	36 (80)	28 (62.2)	
		Comparative samples: gastric cancer	62	51 (82.3)	35 (56.5)	29 (46.8)	
	EBV: PCR for detection of EBNA-1 gene	Overall	348	175 (50.3)	204 (58.6)	128 (36.8)	
	<i>H. pylori</i> Ureasa test PCR						

<sup>1</sup> PUD: peptic ulcer disease; GERD: gastroesophageal reflux disease; NAD: Non-atrophic gastritis; FD: functional dyspepsia; GC: Gastric Cancer, CG: Chronic gastritis, NUD (non-ulcer dyspepsia).

In another study from India, biopsy samples were collected from 200 adult patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy and diagnosed as NUD (100 cases), PUD (50), and gastric carcinoma (50) [52]. Infection rate with *H. pylori* in gastric specimens, diagnosed by rapid urease test, culture, histopathology, PCR and quantitative PCR, was significantly higher in patients with PUD than in those with GC ( $p = 0.044$ ) and NUD ( $p < 0.001$ ); however, no difference was observed between gastric cancer and NUD ( $p = 0.083$ ). The frequency of EBV DNA (detected by PCR for EBNA-1 gene) in the study population was 56.5%, and the overall co-infection rate in the studied population was 40.5%. This was significantly higher in patients with gastric cancer and PUD than in those with NUD ( $p < 0.001$ ).

Importantly, the median EBV copy number in *H. pylori*-infected patients was significantly higher than in uninfected patients, however, no difference was observed between *H. pylori*-infected versus non-infected patients when data were analyzed according to disease subsets.

The increased EBV DNA load in *H. pylori*-infected patients may support the notion that *H. pylori* promotes the reactivation of EBV. This hypothesis was tested in another study by the same group, which included 200 adult patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy [51]. The prevalence of EBV infection was higher in patients with gastric cancer and PUD than in those with dyspepsia and whereas levels of EBNA1 transcripts, detected in all EBV positive cases, were not associated with disease type, the expression of BZLF1 was significantly associated with gastric cancer and PUD compared to dyspepsia ( $p < 0.01$ ). Interestingly, BZLF1 expression was significantly higher in *H. pylori*-infected patients and other viral lytic factors, BARF1 and BcLF1, were significantly higher in the gastric epithelium of patients with severe chronic inflammation and gastric atrophy, respectively. Thus, the increased expression of lytic transcripts in patients with gastric cancer and *H. pylori* infection suggests the association of this bacterium with EBV reactivation and points to the pathogenic role of EBV reactivation in the pathogenesis of the diseases.

A retrospective study conducted in Brazil investigated the presence of *H. pylori* (detected by urease test and PCR for CagA) and EBV (detected by Eber-1 in situ hybridization) in gastric specimens from 226 individuals randomly collected during the period 2005–2013 [50]. The study included 62 juvenile patients (12 months to 18 years old) and 39 adults (19 to 61 years old), referred for endoscopic examination to clarify upper gastrointestinal symptoms, as well as tumor samples from 125 adults (26 to 89 years old) with primary gastric adenocarcinoma. Among the juvenile patients, 53 (85.5%) showed some degree of gastritis (45.3% with mild gastritis and 54.7% with moderate/severe gastritis), while all the adult individuals presented gastritis. *H. pylori* infection was detected in 58.5% of samples from juvenile patients, 69.2% of adult gastritis samples and 88% of patients with gastric cancer and was not detectable in normal gastric mucosa. This study found no association between EBV and *H. pylori* co-infection with any clinicopathological variable, which may be due to the low EBV detection rate, as the virus was detected in only 3.8% of samples from juvenile gastritis patients, 5.1% of samples from adult gastritis patients and 9.6% of gastric patients.

A study conducted in Mexico assessed the presence of EBV, human cytomegalovirus (HCMV) and *H. pylori*, all detected by PCR methods, in gastric specimens from patients with chronic gastritis (106 cases) and gastric cancer (32 cases) [15]. Overall, 73.9% of gastric biopsies were positive for EBV, while 52.9% and 46.4% were positive for HCMV and *H. pylori*, respectively. Interestingly, whereas 53% of *H. pylori*+ patients with chronic gastritis were also positive for EBV and 33% were both EBV+/HCMV+, the majority (92.3%) of patients with gastric cancer and *H. pylori* infection were EBV+ and 46.1% were EVB+/HCMV+. The authors proposed that these pathogens may act synergistically to induce inflammation and gastric cancer, although no direct evidence, such as histological studies and multivariate analysis, was provided to support such an assumption [15].

Although isolated case reports linking CMV with gastric inflammation have been reported, including in cases of documented co-infection with *H. pylori* [53–55], this was the first study to report such a relatively high frequency of both pathogens in gastritis and gastric cancer. Important limitations in this study were the small size of the studied population, a highly heterogeneous population (age range 4–89 years old), as well as the lack of a healthy control group and the fact that all pathogens were detected by PCR methods. It is worth mentioning that prevalence of EBV in



individuals with chronic gastritis in the study population (69.8%) was significantly higher than reported in previous studies conducted in other regions of the country, which were about 10% [11], although the authors did not discuss the potential cause of that discrepancy.

Recently, a study conducted in Peru aimed to determine the prevalence of *H. pylori* and EBV and its association with the clinicopathological features of gastric cancer and chronic gastritis [49]. This single-center study included 540 patients (median age was 60 years) evaluated between 2015 and 2018, with 375 of them having gastric cancer (67 underwent diagnostic endoscopy and 308 gastrectomy) and 165 chronic gastritis cases who underwent diagnostic endoscopy. Gastric specimens were collected from old patients for further analysis. Prevalence of *H. pylori*, assessed by the detection of *hspA* and *UreA* genes via PCR, was 62.9% in the whole population and 60.8% in the gastric cancer subset. The prevalence of EBV, assessed by PCR for the detection of the BNRFB1 gene, in gastric tissues of the whole population was 14.1%, and was higher in the gastric cancer group compared with the chronic gastritis subset (19.2% vs. 2.4%;  $p < .001$ ) This EBV infection rate is substantially higher than reported (3.9%) in a previous study in the same population, in which the virus was detected by in situ hybridization [56], but is similar to the average infection rate reported in patients with gastric cancer in South American countries (10%). Coinfection of both pathogens was found in 42 patients (7.8%) in the whole studied population, being significantly higher in gastric cancer compared with chronic gastritis (10.7% vs. 1.2%;  $p < .001$ ). The frequency of *H. pylori* strains expressing the virulent factor CagA in this study was lower (79.9%) than reported 10 years ago in the same population [57], and lower than reported in Brazil (96.7%) [58].

Limitations associated with this study include the fact that both pathogens were detected by a single detection method (PCR); the lack of baseline data, namely infection rates in the healthy population; and the use of convenience sampling, instead of paired selection, since subjects included in the study were patients with gastric cancer and chronic gastritis who were evaluated in a centralized institute for diagnosis.

## 5. Discussion

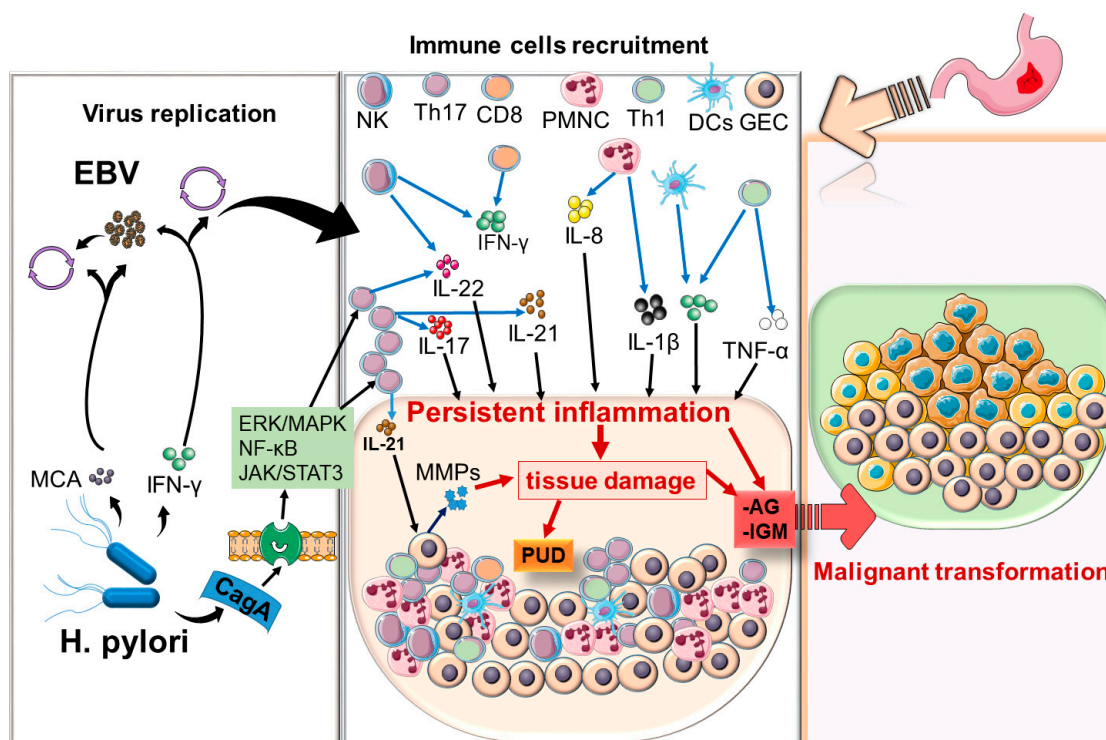
Although a few meta-analyses assessing the association of either *H. pylori* or EBV with gastric cancer have been published to date, and even a systematic review which revised articles reporting on co-infection rate with both pathogens in patients' gastric cancer [12,27,59], to the best of our knowledge, this is the first study to systematically review the literature testing the association between *H. pylori* or EBV co-infection with NMGDs. We identified only nine clinical and epidemiological studies that complied with our inclusion criteria and among them, three studies assessed EBV infection rate by detecting anti-EBV antibodies in blood samples and six studies detected EBV positivity directly in gastric tissues, mostly by PCR methods.

We observed a high variability in the prevalence of EBV and *H. pylori* in patients with NMGDs among the studies included in this review, that is directly related to the detection methods utilized to determine infection status. As expected, an increased EBV infection rate in NMGDs was observed when the virus was detected by serological markers in blood samples, and, although these methods may be useful to evaluate cumulative lifetime exposure and reactivation of the viral infection, when seropositivity is assessed only by detecting EBV antibodies that do not distinguish active infection from life-time infection (usually acquired from childhood), determining EBV infection status is challenging. In this case, comparing EBV antibodies titers between NMGDs patients with those in asymptomatic controls might provide more reliable data to judge the association of EBV infection with NMGDs. Similarly, increased EBV positivity was also reported in studies in which the virus was detected in gastric tissues by PCR methods. It is well-known that, whereas PCR methods are more sensitive than the gold-standard ISH method to detect EBV, they are also associated with a lower specificity. In addition, the PCR method is not able to distinguish EBV DNA present in epithelial cells from that found in infected lymphocytes infiltrating the affected tissue specimens. Therefore, since a potential EBV cross-contamination picked up by PCR methods cannot be completely ruled out, the increased EBNA-1 positivity detected by PCR, particularly in chronic gastritis specimens, rather than reflecting epithelial cells' infection, could indicate the severity of an inflammatory response.

Is there any specific clinical picture associated with EBV and *H. pylori* co-infection? It is unlikely that simultaneous infection with both pathogens causes a defined clinical entity, however, some studies suggest that co-infection with EBV and *H. pylori* induces more severe inflammatory responses in individuals with gastritis, which ultimately increases the risk of developing the intestinal-type gastric cancer [45]. Mechanistically, both pathogens promote immune cell influx and the secretion of pro-inflammatory cytokines in the gastric mucosa. For example, *H. pylori*, mainly via the virulence factor CagA, promotes cell proliferation and reduces apoptosis, supporting the establishment of a chronic inflammatory milieu via the activation of multiple host cell signal pathways such as ERK/MAPK, NF- $\kappa$ B, P13K/Akt, and JAK/STAT3 pathways [60–62] and, as mentioned above, NH2C produced by *H. pylori* promotes the transition of EBV from the latent to the lytic phase, which promotes virus reactivation [28].

Both *H. pylori*- and EBV are capable of inducing epigenetic changes in target cells, leading to oncogene activation or tumor suppressor gene silencing, which increases the risk of malignant transformation [63–65]. For example, Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2 (Shp2), encoded by PTPN11, plays an important role in signal transduction downstream of growth factor receptor signaling, and is associated with various cancer types, including gastric cancer. Interestingly, tissue specimens of EBV+ gastric cancers exhibited SHP1 hypermethylation with reduced SHP1 expression, and the infection of gastric epithelial cells with EBV induces SHP1 promoter hypermethylation, which strengthens phosphorylation-dependent CagA action [66].

Based on the above considerations, there is a synergistic relationship between EBV and *H. pylori* which potentiates the local inflammatory response, ultimately leading to increased tissue damage (Figure 2).



**Figure 2.** Interaction between EBV and *H. pylori* and gastric inflammation and its potential association with gastric cancer.

*H. pylori*-associated monochloramine (MCA) induces EBV lytic conversion in gastric epithelium harboring EBV latent infection. Active EBV infection induces an inflammatory response in the gastric mucosa by attracting immune cells, including Polymorphonuclear cells (PMNCs), natural killer cells (NK cells), and dendritic cells (DCs), as well as CD8, Th17 and Th1 cells. The inflammatory response

is further potentiated by *H. pylori*, which expresses several virulent and proinflammatory factors. For example, CagA induces the activation of various signals pathways, including NF $\kappa$ B, MAPKs, and JAK/STAT3, which also contribute to the generation of a proinflammatory milieu that includes several components of the innate immune system (PMNCs, NK cells, etc.), along with infiltrating lymphocytes, especially Th1, Th17, Th22, and their associated proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17, IL-21, IL-22) leading to severe tissue damage. In addition, IL-21 can directly activate gastric epithelial cells (GECs), which secrete matrix metalloproteases (MMPs) that further cause tissue damage. The establishment of a persistent or chronic infection can lead to the development of peptic ulcer disease (PUD) or premalignant lesions such as atrophic gastritis (AG) or gastric intestinal metaplasia (GIM), which eventually result in the development of gastric cancer.

A major limitation of the published studies is that they were mainly focused on determining a potential correlation between EBV and *H. pylori* co-infection with the development of gastric cancer, and thus patients with benign disorders were included as controls. We found no studies comparing the prevalence of EBV and *H. pylori* co-infection in NMGDs with that in healthy subjects. This is in part due to the technical and ethical issues associated with including asymptomatic individuals as a control group to determine the precise co-infection rate in healthy individuals, because obtaining gastric specimens requires the use of invasive methods (endoscopy), which are not routinely performed in this population. Considering that both *H. pylori* and EBV are ubiquitous microorganisms infecting a broad proportion of the world population, and although various studies have suggested that a potential association exists between co-infection with these agents and the development of a more severe gastric mucosal damage, it is somewhat surprising to find that, with the exception of a small study from Hungary, all studies investigating this issue have been conducted in developing countries, including three studies from India, and five from Latin America. Moreover, gastric carcinogenesis is a multistep process that very often, if not always, initiates with chronic inflammation, which not only promotes tumor initiation but also plays a critical role in tumor growth and metastasis. Therefore, elucidating the mechanisms implicated in the development of acute or chronic infection in the context of a co-infection with EBV and *H. pylori* is crucial for designing cancer prevention strategies. Furthermore, the potential association of both pathogens in the development of NMGDs should also be investigated in other populations, including Caucasians, Asians, and Africans.

Clinical and epidemiological evidence supports the contribution of various viruses, including EBV, hepatitis virus, cytomegalovirus with gastritis and gastric cancer induced by *H. pylori* [67], and several studies have shown that gastric microbiota can regulate *H. pylori* infection and vice versa; this bacterium can modify the gastric microbiota composition [68-70]. On the other hand, the microbiota composition in several body niches exerts direct or indirect effects on virus infections, including EBV and human papilloma virus [71]. Therefore, testing potential crosstalk between EBV and *H. pylori* with gastric microbiota is an interesting line of investigation for further studies.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Supplementary 1: List of abbreviations used in this article.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.L.E.; methodology, J.L.E., O.J., and R.D.; investigation, J.L.E., O.J., and R.D.; writing—original draft preparation, R.D., O.J., J.L.E., and L.T.D.; writing—review and editing, J.L.E.; supervision, J.L.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** There were no funds or grants associated with this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

EBV: Epstein-Barr virus

NMGDs: non-malignant gastroduodenal disorders

PUD: Peptic ulcer disease GERD: gastroesophageal reflux disease NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs

FD: functional dyspepsia  
BabA: blood group antigen binding adhesion  
OipA: outer inflammatory protein A  
SabA: sialic acid-binding adhesion  
VacA: vacuolating cytotoxin A  
CagA: cytotoxin associated gene A  
CTL: cytotoxic T lymphocytes  
NK: natural killer cells  
TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$   
IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$   
TLR9: toll-like receptor 9  
MMP-1: matrix metalloprotease-1  
PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses  
EBER: EBV-encoded RNA  
EBNA: Epstein–Barr nuclear antigens  
VCA: viral capsid antigen  
EA: early antigen  
PMNC: Polymorphonuclear cells  
MNC: mononuclear cells  
NAG: Non-atrophic gastritis  
BZLF1: BamHI Z Leftward reading Frame 1  
BARF1: means BamHI A rightward open-reading frame-1  
HCMV: human cytomegalovirus

## References

1. Stanghellini, V.; Chan, F.K.; Hasler, W.L.; Malagelada, J.R.; Suzuki, H.; Tack, J.; Talley, N.J. Gastroduodenal Disorders. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1380–1392. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011.
2. Talley, N.J.; Ford, A.C. Functional Dyspepsia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1853–1863. doi:10.1056/NEJMra1501505.
3. Masuy, I.; Van Oudenhove, L.; Tack, J. Review article: Treatment options for functional dyspepsia. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2019**, *49*, 1134–1172. doi:10.1111/apt.15191.
4. Stanghellini, V. Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome: Beyond Rome IV. *Dig. Dis.* **2017**, *35*, 14–17. doi:10.1159/000485408.
5. Adriani, A.; Ribaldone, D.G.; Astegiano, M.; Durazzo, M.; Saracco, G.M.; Pellicano, R. Irritable bowel syndrome: The clinical approach. *Panminerva Med.* **2018**, *60*, 213–222. doi:10.23736/S0031-0808.18.03541-3.
6. Smolka, A.J.; Schubert, M.L. *Helicobacter pylori*-Induced Changes in Gastric Acid Secretion and Upper Gastrointestinal Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *400*, 227–252. doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_10.
7. Falkeis-Veits, C.; Vieth, M. Non-malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**. doi:10.1007/5584\_2019\_362.
8. Buzás, G.M. Benign and malignant gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori*: A narrative review and personal remarks in 2018. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **2018**, *64*, 280–296. doi:10.23736/S1121-421X.18.02481-9.
9. Lanas, A.; Chan, F.K.L. Peptic ulcer disease. *Lancet* **2017**, *390*, 613–624. doi:10.1016/S0140-6736(16)32404-7.

10. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Carreón-Talavera, R.; Camorlinga-Ponce, M.; Gomez-Delgado, A.; Torres, J.; Fuentes-Pananá, E.M. Epstein Barr virus and *Helicobacter pylori* co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62850. doi:10.1371/journal.pone.0062850.
11. Martínez-López, J.L.; Torres, J.; Camorlinga-Ponce, M.; Mantilla, A.; Leal, Y.A.; Fuentes-Pananá, E.M. Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses* **2014**, *6*, 301–318. doi:10.3390/v6010301.
12. Zong, L.; Seto, Y. CpG island methylator phenotype, *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, and microsatellite instability and prognosis in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86097. doi:10.1371/journal.pone.0086097.
13. Kim, J.Y.; Bae, B.N.; Kang, G.; Kim, H.J.; Park, K. Cytokine expression associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. *APMIS* **2017**, *125*, 808–815. doi:10.1111/apm.12725.
14. Rugge, M.; Genta, R.M.; Di Mario, F.; El-Omar, E.M.; El-Serag, H.B.; Fassan, M.; Hunt, R.H.; Kuipers, E.J.; Malfertheiner, P.; Sugano, K.; et al. Gastric Cancer as Preventable Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, doi:10.1016/j.cgh.2017.05.023.
15. Del Moral-Hernández, O.; Castañón-Sánchez, C.A.; Reyes-Navarrete, S.; Martínez-Carrillo, D.N.; Betancourt-Linares, R.; Jiménez-Wences, H.; de la Peña, S.; Román-Román, A.; Hernández-Sotelo, D.; Fernández-Tilapa, G. Multiple infections by EBV, HCMV and *Helicobacter pylori* are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico: An observational study. *Medicine (Baltimore)* **2019**, *98*, e14124. doi:10.1097/MD.00000000000014124.
16. Hooi, J.K.Y.; Lai, W.Y.; Ng, W.K.; Suen, M.M.Y.; Underwood, F.E.; Tanyingoh, D.; Malfertheiner, P.; Graham, D.Y.; Wong, V.W.S.; Wu, J.C.Y.; et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 420–429. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022.
17. Khoder, G.; Muhammad, J.S.; Mahmoud, I.; Soliman, S.S.M.; Burucoa, C. Prevalence of *Helicobacter pylori* and Its Associated Factors among Healthy Asymptomatic Residents in the United Arab Emirates. *Pathogens* **2019**, *8*, doi:10.3390/pathogens8020044.
18. Crowe, S.E. Infection. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1158–1165. doi:10.1056/NEJMcp1710945.
19. Chmiela, M.; Gonciarz, W. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 3964–3977. doi:10.3748/wjg.v23.i22.3964.
20. Mejías-Luque, R.; Gerhard, M. Immune Evasion Strategies and Persistence of *Helicobacter pylori*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *400*, 53–71. doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_3.
21. Salama, N.R.; Hartung, M.L.; Müller, A. Life in the human stomach: Persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 385–399. doi:10.1038/nrmicro3016.
22. Fagoonee, S.; Pellicano, R. *Helicobacter pylori*: Molecular basis for colonization and survival in gastric environment and resistance to antibiotics. A short review. *Infect. Dis.* **2019**, *51*, 399–408. doi:10.1080/23744235.2019.1588472.
23. Shannon-Lowe, C.; Rickinson, A. The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 713. doi:10.3389/fonc.2019.00713.
24. Di Napoli, A.; Al-Jadiri, M.F.; Talerico, C.; Duranti, E.; Pillozzi, E.; Trivedi, P.; Anastasiadou, E.; Alsaadawi, A.R.; Al-Darraj, A.F.; Al-Hadad, S.A.; et al. Epstein-Barr virus (EBV) positive classical Hodgkin lymphoma of Iraqi children: An immunophenotypic and molecular characterization of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Pediatric Blood Cancer* **2013**, *60*, 2068–2072. doi:10.1002/pbc.24654.
25. Espinoza, J.L.; Takami, A.; Trung, L.Q.; Kato, S.; Nakao, S. Resveratrol Prevents EBV Transformation and Inhibits the Outgrowth of EBV-Immortalized Human B Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51306. doi:10.1371/journal.pone.0051306.
26. Taylor, G.S.; Long, H.M.; Brooks, J.M.; Rickinson, A.B.; Hislop, A.D. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 787–821. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326.
27. Chen, X.Z.; Chen, H.; Castro, F.A.; Hu, J.K.; Brenner, H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: A systematic review. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94*, e792. doi:10.1097/MD.0000000000000792.
28. Minoura-Etoh, J.; Gotoh, K.; Sato, R.; Ogata, M.; Kaku, N.; Fujioka, T.; Nishizono, A. *Helicobacter pylori*-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 905–911. doi:10.1099/jmm.0.46580-0.
29. Allison, C.C.; Ferrand, J.; McLeod, L.; Hassan, M.; Kaparakis-Liaskos, M.; Grubman, A.; Bhathal, P.S.; Dev, A.; Sievert, W.; Jenkins, B.J.; et al. Nucleotide oligomerization domain 1 enhances IFN- $\gamma$  signaling in gastric

- epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection and exacerbates disease severity. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 3706–3715. doi:10.4049/jimmunol.1200591.
30. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Sánchez-Zauco, N.; Gómez-Delgado, A.; Camorlinga-Ponce, M.; Maldonado-Bernal, C.; Fuentes-Pananá, E.M. Elevated levels of Interferon- $\gamma$  are associated with Epstein-Barr virus reactivation in patients with the intestinal type of gastric cancer. *J Immunol Res* **2017**, *2017*, 7069242, doi:10.1155/2017/7069242.
  31. Dixon, B.R.E.A.; Hossain, R.; Patel, R.V.; Algood, H.M.S. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: A Dichotomy of Help and Harm. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, doi:10.1128/IAI.00363–19.
  32. Rahal, E.A.; Hajjar, H.; Rajeh, M.; Yamout, B.; Abdelnoor, A.M. Epstein-Barr Virus and Human herpes virus 6 Type A DNA Enhance IL-17 Production in Mice. *Viral Immunol.* **2015**, *28*, 297–302. doi:10.1089/vim.2014.0129.
  33. Shiomi, S.; Toriie, A.; Imamura, S.; Konishi, H.; Mitsufuji, S.; Iwakura, Y.; Yamaoka, Y.; Ota, H.; Yamamoto, T.; Imanishi, J.; et al. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter* **2008**, *13*, 518–524. doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00629.x.
  34. Salloum, N.; Hussein, H.M.; Jammaz, R.; Jiche, S.; Uthman, I.W.; Abdelnoor, A.M.; Rahal, E.A. Epstein-Barr virus DNA modulates regulatory T-cell programming in addition to enhancing interleukin-17A production via Toll-like receptor 9. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200546. doi:10.1371/journal.pone.0200546.
  35. Carbo, A.; Olivares-Villagómez, D.; Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J.; Chaturvedi, R.; Piazuolo, M.B.; Delgado, A.; Washington, M.K.; Wilson, K.T.; Algood, H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4+ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio* **2014**, *5*, e01243-14. doi:10.1128/mBio.01243-14.
  36. Caruso, R.; Fina, D.; Peluso, I.; Fantini, M.C.; Tosti, C.; Del Vecchio Blanco, G.; Paoluzi, O.A.; Caprioli, F.; Andrei, F.; Stolfi, C.; et al. IL-21 is highly produced in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 5957–5965. doi:10.4049/jimmunol.178.9.5957.
  37. Bagheri, N.; Azadegan-Dehkordi, F.; Shirzad, M.; Zamanzad, B.; Rahimian, G.; Taghikhani, A.; Rafieian-Kopaei, M.; Shirzad, H. Mucosal interleukin-21 mRNA expression level is high in patients with *Helicobacter pylori* and is associated with the severity of gastritis. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **2015**, *40*, 61–67. doi:10.5114/cej.2015.50835.
  38. Lebre, M.C.; Vieira, P.L.; Tang, M.W.; Aarrass, S.; Helder, B.; Newsom-Davis, T.; Tak, P.P.; Screaton, G.R. Synovial IL-21/TNF-producing CD4. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*, 775–783. doi:10.1189/jlb.5A0516-217RR.
  39. Ortega, C.; Estévez, O.A.; Fernández, S.; Aguado, R.; Rumbao, J.M.; Gonzalez, T.; Pérez-Navero, J.L.; Santamaría, M. Interleukin-21 overexpression dominates T cell response to Epstein-Barr virus in a fatal case of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, *20*, 765–771. doi:10.1128/CVI.00002-13.
  40. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e1000097. doi:10.1371/journal.pmed.1000097.
  41. De Paschale, M.; Clerici, P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J. Virol.* **2012**, *1*, 31–43. doi:10.5501/wjv.v1.i1.31.
  42. Smatti, M.K.; Al-Sadeq, D.W.; Ali, N.H.; Pintus, G.; Abou-Saleh, H.; Nasrallah, G.K. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 211. doi:10.3389/fonc.2018.00211.
  43. Buzás, G.M.; Konderák, J. Co-infection with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in benign upper digestive diseases: An endoscopic and serologic pilot study. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2016**, *4*, 388–394. doi:10.1177/2050640615610265.
  44. Buzás, G.M.; Lotz, G.; Schneider, F.; Józán, J. Changing prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the 9th district of Budapest. A retrospective endoscopic study, 1997–2012. *Orv. Hetil.* **2013**, *154*, 900–907. doi:10.1556/OH.2013.29630.
  45. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Flores-Luna, L.; Camorlinga-Ponce, M.; Carreón-Talavera, R.; Gomez-Delgado, A.; Kasamatsu, E.; Fuentes-Pananá, E.M. Case-control study of Epstein-Barr virus and *Helicobacter pylori* serology in Latin American patients with gastric disease. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1866–1873. doi:10.1038/bjc.2015.175.
  46. Saxena, A.; Nath Prasad, K.; Chand Ghoshal, U.; Krishnani, N.; Roshan Bhagat, M.; Husain, N. Association of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus with gastric cancer and peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 669–674. doi:10.1080/00365520801909660.

47. Kattoor, J.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Ding, S.; Eizuru, Y.; Abraham, E.K.; Chandralekha, B.; Amma, N.S.; Nair, M.K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in southern India: A comparison with a large-scale Japanese series. *J. Med. Virol.* **2002**, *68*, 384–389. doi:10.1002/jmv.10215.
48. Herrera-Goepfert, R.; Akiba, S.; Koriyama, C.; Ding, S.; Reyes, E.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Eizuru, Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 6096–6103. doi:10.3748/wjg.v11.i39.6096.
49. Castaneda, C.A.; Castillo, M.; Chavez, I.; Barreda, F.; Suarez, N.; Nieves, J.; Bernabe, L.A.; Valdivia, D.; Ruiz, E.; Dias-Neto, E., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection, its virulent genotypes, and Epstein-Barr virus in Peruvian patients with chronic gastritis and gastric cancer. *J. Glob. Oncol.* **2019**, *5*, 1–9, doi:10.1200/JGO.19.00122.
50. de Souza, C.R.; de Oliveira, K.S.; Ferraz, J.J.; Leal, M.F.; Calcagno, D.Q.; Seabra, A.D.; Khayat, A.S.; Montenegro, R.C.; Alves, A.P.; Assumpção, P.P.; et al. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 179. doi:10.1186/1471-230X-14-179.
51. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Expression profile of latent and lytic transcripts of Epstein-Barr virus in patients with gastroduodenal diseases: A study from northern India. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1289–1297. doi:10.1002/jmv.23322.
52. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Singh, A.; Saxena, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Epstein-Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. *Braz. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 583–590.
53. Yoo, Y.; Lee, Y.; Lee, Y.M.; Choe, Y.H. Co-infection with Cytomegalovirus and *Helicobacter pylori* in a Child with Ménétrier's Disease. *Pediatric Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* **2013**, *16*, 123–126. doi:10.5223/pghn.2013.16.2.123.
54. Crespo, P.; Dias, N.; Marques, N.; Saraiva da Cunha, J. Gastritis as a manifestation of primary CMV infection in an immunocompetent host. *BMJ Case Rep.* **2015**, *2015*, doi:10.1136/bcr-2014-206991.
55. Hokama, A.; Taira, K.; Yamamoto, Y.; Kinjo, N.; Kinjo, F.; Takahashi, K.; Fujita, J. Cytomegalovirus gastritis. *World J. Gastrointest. Endosc.* **2010**, *2*, 379–380. doi:10.4253/wjge.v2.i11.379.
56. Yoshiwara, E.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Chirinos, J.L.; Watanabe, J.; Takano, J.; Miyagui, J.; Hidalgo, H.; et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2005**, *24*, 49–54.
57. Mendoza, D.; Herrera, P.; Gilman, R.H.; Lanfranco, J.; Tapia, M.; Bussalleu, A.; Tenorio, J.H.; Guillén-Rodríguez, C.E.; Arróspide, M.T.; Piscocoya, A.; et al. Variation in the prevalence of gastric cancer in Perú. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 414–420. doi:10.1002/ijc.23420.
58. Cavalcante, M.Q.; Silva, C.I.; Braga-Neto, M.B.; Fialho, A.B.; Nunes Fialho, A.; Barbosa, A.M.; Cruz, F.W.; Rocha, G.A.; Queiroz, D.M.; Braga, L.L. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **2012**, *107*, 561–563. doi:10.1590/s0074-02762012000400021.
59. Bae, J.M.; Kim, E.H. Epstein-Barr Virus and Gastric Cancer Risk: A Meta-analysis With Meta-regression of Case-control Studies. *J. Prev. Med. Public Health* **2016**, *49*, 97–107. doi:10.3961/jpmp.15.068.
60. Ohnishi, N.; Yuasa, H.; Tanaka, S.; Sawa, H.; Miura, M.; Matsui, A.; Higashi, H.; Musashi, M.; Iwabuchi, K.; Suzuki, M.; et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1003–1008. doi:10.1073/pnas.0711183105.
61. Yong, X.; Tang, B.; Li, B.S.; Xie, R.; Hu, C.J.; Luo, G.; Qin, Y.; Dong, H.; Yang, S.M. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun. Signal.* **2015**, *13*, 30. doi:10.1186/s12964-015-0111-0.
62. Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: A paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 306–316. doi:10.1016/j.chom.2014.02.008

63. Matsusaka, K.; Funata, S.; Fukayama, M.; Kaneda, A. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 3916–3926. doi:10.3748/wjg.v20.i14.3916.
64. Wu, W.K.; Yu, J.; Chan, M.T.; To, K.F.; Cheng, A.S. Combinatorial epigenetic deregulation by *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infections in gastric tumourigenesis. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 245–249. doi:10.1002/path.4731.
65. Fukayama, M.; Kunita, A.; Kaneda, A. Gastritis-Infection-Cancer Sequence of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1045*, 437–457. doi:10.1007/978-981-10-7230-7\_20.
66. Saju, P.; Murata-Kamiya, N.; Hayashi, T.; Senda, Y.; Nagase, L.; Noda, S.; Matsusaka, K.; Funata, S.; Kunita, A.; Urabe, M.; et al. Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16026. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.26.
67. Cui, H.; Jin, Y.; Chen, F.; Ni, H.; Hu, C.; Xu, Y.; Xuan, H.; Hu, D.; Deng, W.; Zhang, Y.; et al. Clinicopathological evidence of Hepatitis B Virus infection in the development of gastric adenocarcinoma. *J. Med. Virol.* **2019**, doi:10.1002/jmv.25584.
68. Espinoza, J.L.; Matsumoto, A.; Tanaka, H.; Matsumura, I. Gastric microbiota: An emerging player in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancies. *Cancer Lett.* **2018**, *414*, 147–152. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.009.
69. Coker, O.O.; Dai, Z.; Nie, Y.; Zhao, G.; Cao, L.; Nakatsu, G.; Wu, W.K.; Wong, S.H.; Chen, Z.; Sung, J.J.Y.; et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* **2018**, *67*, 1024–1032. doi:10.1136/gutjnl-2017-314281.
70. Alarcón, T.; Llorca, L.; Perez-Perez, G. Impact of the Microbiota and Gastric Disease Development by *Helicobacter pylori*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *400*, 253–275. doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_11.
71. Wakabayashi, R.; Nakahama, Y.; Nguyen, V.; Espinoza, J.L. The Host-Microbe Interplay in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Microorganisms* **2019**, *7*, doi:10.3390/microorganisms7070199.





# Epstein-Barr virus and *Helicobacter pylori* co-infection prevalence in gastroduodenal disorders: A proportion meta-analysis.

Óscar Jarquín-Durán<sup>1</sup>, Ramsés Dávila-Collado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, UNIDES University, Managua, Nicaragua 11001, Nicaragua

**Background:** The coexistence Epstein-Barr virus (EBV) and *helicobacter pylori* (*H. pylori*) are implicated in the carcinogenesis of gastric cancer process and the development of several cancers. It has been hypothesized EBV and *H. pylori* coinfection plays an important role in the etiology of benign and premalignant gastroduodenal disorders, yet the available evidence is limited. A recent systematic review documented EBV and *H. pylori* coinfection in a variety of non-malignant gastroduodenal disorders. However a quantitative assessment is still lacking.

**Objectives:** To provide a quantitative estimate of the prevalence of EBV and *H. pylori* co-infection in gastroduodenal disorders, based on data from relevant studies published until April 17, 2020

**Methods:** Three authors independently searched PubMed for studies reporting on the coexistence of EBV and *H. Pylori* in population with gastroduodenal disorders. Proportion meta-analyses were performed to calculate the prevalence estimates of EVB and *H. pylori* coinfection.

**Results:** A total of 6 studies were included in the analysis, covering 1402 individuals from population with gastroduodenal disorders. Overall, the prevalence of EBV and *H. Pylori* coinfection was 23% (95% confidence interval [CI]: 20.8%-25.3%). In benign gastroduodenal disorders the prevalence was 17.9% (95%CI: 15.1%-20.9%). The prevalence was significantly higher in premalignant gastroduodenal disorders (61.2% [95%CI: 52.5%-69.4%]), but statistically not significant ( $p=0.973$ ), this due to the amount of the sample (135 individuals). Five studies assessing the coexistence EBV and *H. Pylori* directly in patients with gastric cancer (total 567 patients) were identified, estimating a pooled prevalence of 20% [95%CI: 16.9%-23.6%]).

**Conclusions:** This meta-analysis confirmed that at least 23% of the patients with gastro-duodenal disorders have EBV and *H. Pylori* coinfection. It highlights the need for more studies on the early detection of both microorganisms in non-malignant gastroduodenal disorders.

**Keywords:** Epstein-Barr virus; gastritis; non-ulcerous peptic disease; peptic ulcer disease; *helicobacter pylori*

---

## 1. Introduction

## 2. Material and methods

This study was conducted following the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement[35]. We used PubMed database to search articles listed on or before April 17, 2020.

Three screeners (SNC.), (OJD) and (RDC.) independently searched PubMed for studies reporting on the occurrence of EBV and *H. Pylori* coinfection using the following search terms: "(Epstein-Barr-Virus and *Helicobacter Pylori* coinfection), (Epstein-Barr-Virus and *Helicobacter Pylori* in patient with gastric cancer) AND (The coexistence of Epstein-Barr-Virus and *Helicobacter Pylori* in gastroduodenal disorders)."

### 2.1. Study selection and Data Extraction

To qualify for inclusion, studies had to be original, written in English, and available in a full-text form. So-called grey literature (ie, conference papers, reports, etc.) was not included. Titles and abstracts were browsed during a primary selection and potentially eligible studies were subject to full-text review. Discrepancies regarding study inclusion or exclusion were resolved by further review and discussion. Studies written in languages other than English and those who did not report EBV and H. Pylori coinfection were excluded.

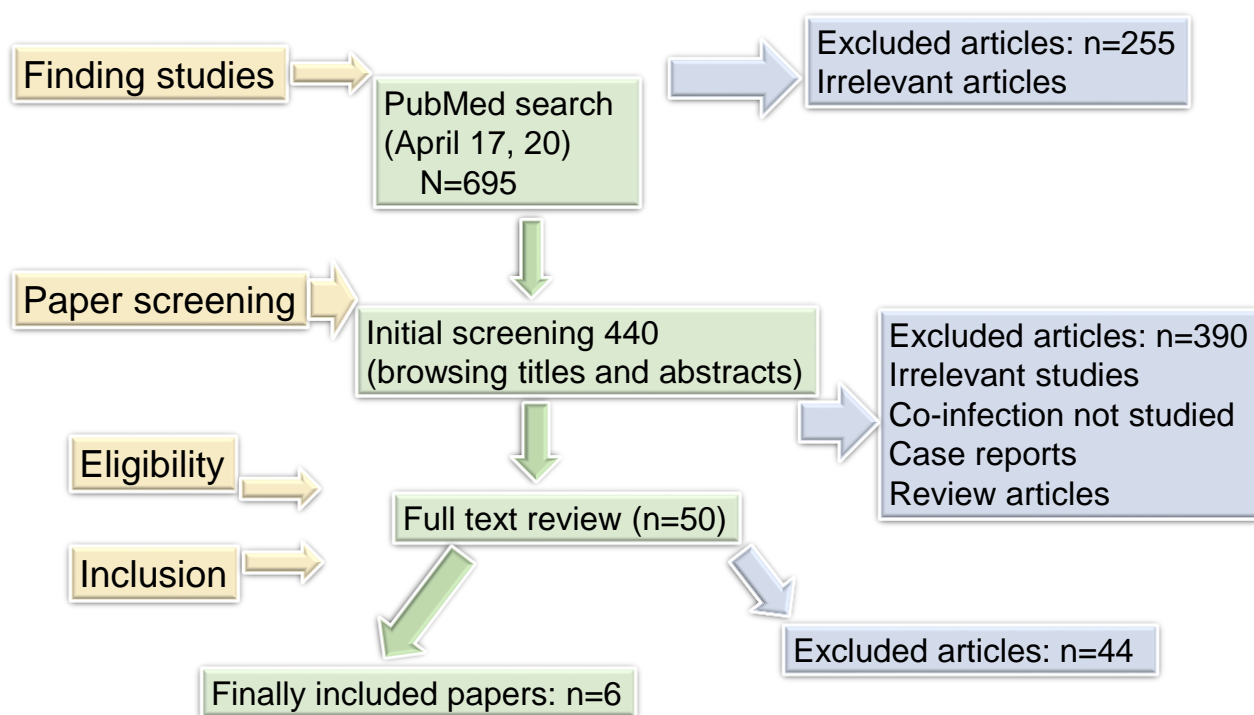
A flow diagram of the study selection process is shown in figure 1.

## 2.2. Studies Included

A total of 679 titles were identified and 255 of them were rapidly excluded because they were judged irrelevant. After reviewing titles and abstracts, 377 articles were further excluded because some were judged irrelevant, some were cases reports, others were review articles, and in some studies co-infection was not studied. The remaining 47 articles were subjected to full-text review and finally, nine papers met the inclusion criteria and were then systematically reviewed.

## 3. Results

After extensive review, we identified nine studies that met the selection criteria. The flow chart of the literature searches and study selection strategy is shown in **Figure 1**. We identified 695 records through PubMed searching, which were screened according to title and abstract, yielding 440 studies for fulltext assessment combined with studies identified from our first systematic review article and from screening references of the included studies, 6 studies were included for data extraction. A summary of the main study findings is shown in table 1 and 2.



**Figure 1:** outline of the article search and study selection.

**Table 1. Estimates of prevalence and heterogeneity according to gastroduodenal disorders**

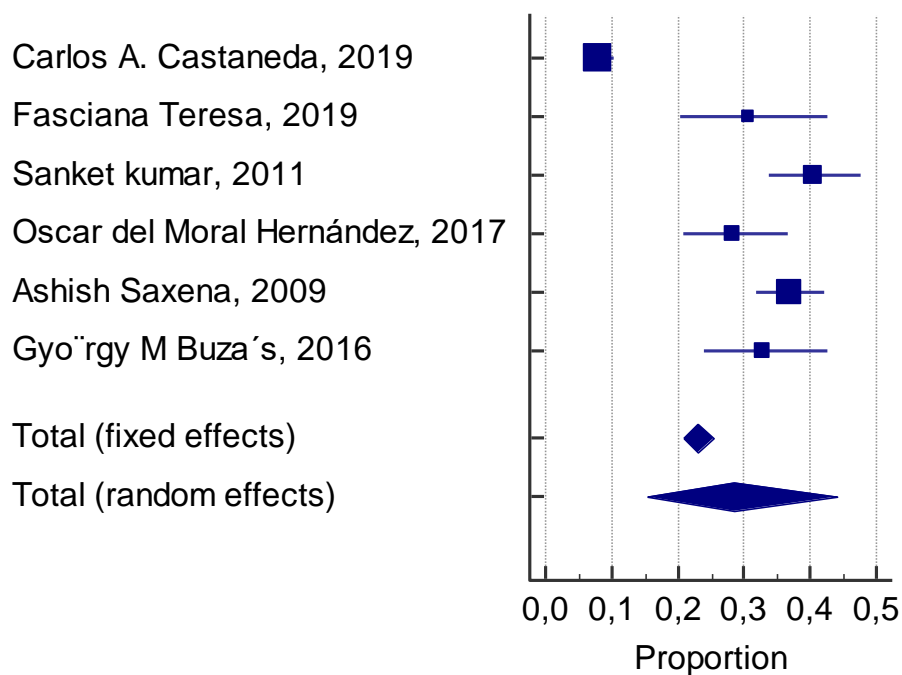
Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	540	7,7	5,6 to 10,3	38,42	17,16
Fasciana Teresa, 2019	72	30,5	20,2 to 42,5	5,18	15,97
Sanket kumar, 2011	200	40,5	33,6 to 47,6	14,28	16,83
Oscar del Moral Hernández, 2017	138	28,2	20,9 to 36,5	9,87	16,61
Ashish Saxena, 2009	348	36,7	31,7 to 42,0	24,79	17,05
György M Buza's, 2016	104	32,6	23,8 to 42,5	7,46	16,37
Total (fixed effects)	1402	23	20,8 to 25,3	100	100
Total (random effects)	1402	28,5	15,2 to 44,0	100	100

**Table 2. Test for heterogeneity in the population with gastroduodenal disorders**

Q	171,81
DF	5
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	97,09%
95% CI for I <sup>2</sup>	95,45 to 98,14

### 3.1. Prevalence of gastroduodenal disorders population

In total, 6 studies were included in the quantitative analysis, yielding an overall prevalence of 23% (95%CI: 20.8%-25.3%) in 1402 tested participants (Figure 2).



**Figure 2.** Prevalence of gastroduodenal disorders population

### 3.2. Prevalence of benign gastroduodenal disorders population.

The 6 studies, including 700 individuals with benign gastroduodenal disorders, yielding a collective prevalence of 17.9% (95%CI: 15.1%-20.9%) (table 3 and 4) (figure 3).

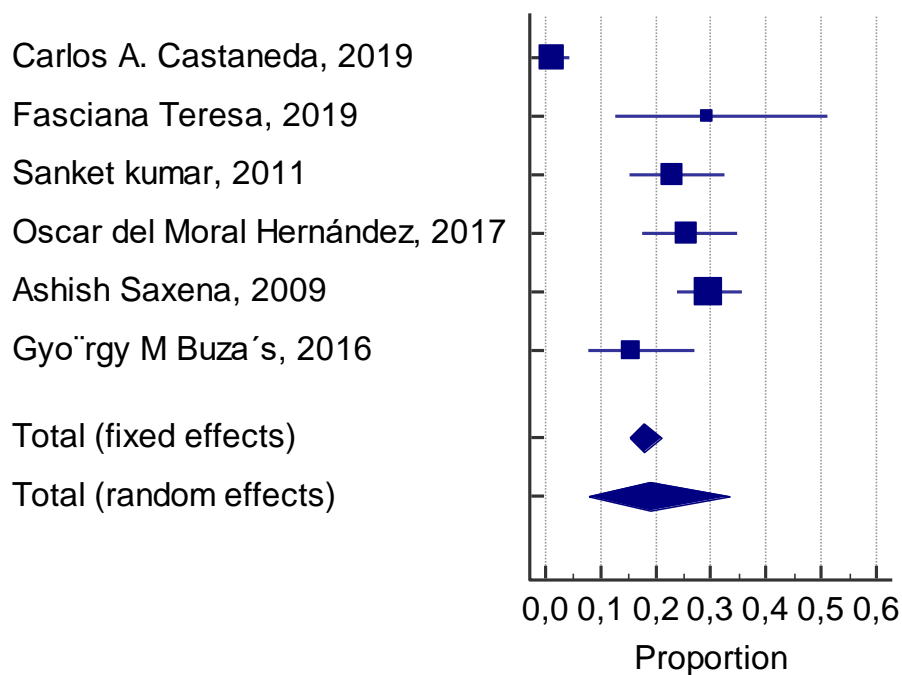
**Tabla 3. Estimates of prevalence and heterogeneity according to benign gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	165	1,212	0,147 to 4,310	23,51	17,41
Fasciana Teresa, 2019	24	29,167	12,6 to 51,0	3,54	14,43
Sanket kumar, 2011	100	23	15,1 to 32,4	14,31	17,01
Oscar del Moral Hernández, 2017	106	25,4	17,5 to 34,8	15,16	17,06
Ashish Saxena, 2009	241	29,4	23,7 to 35,6	34,28	17,61
Gyo'rgy M Buza's, 2016	64	15,6	7,7 to 26,8	9,21	16,47
Total (fixed effects)	700	17,9	15,1 to 20,9	100	100
Total (random effects)	700	18,9	7,8 to 33,4	100	100

**Table 4. Test for heterogeneity in the population with benign gastroduodenal disorders**

Q	91,84
---	-------

DF	5
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	94,56%
95% CI for I <sup>2</sup>	90,65 to 96,83



**Figure 3.** Prevalence of benign gastroduodenal disorders population

### 3.3. Prevalence of premalignant gastroduodenal disorders population.

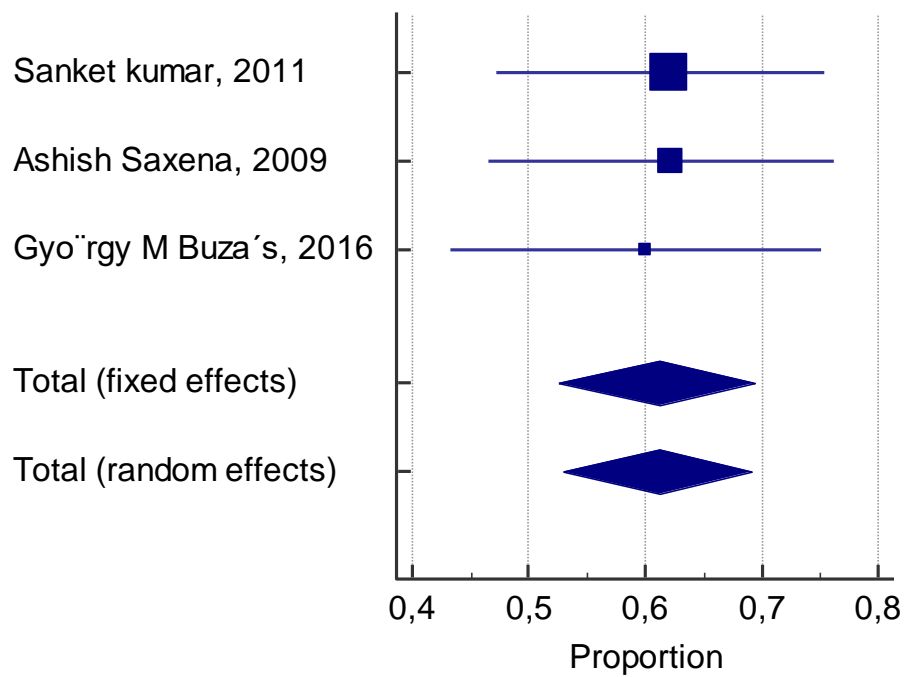
Three studies reported on the prevalence of premalignant gastroduodenal disorders population, yielding a prevalence of 61.2% (95%CI: 52.5%-69.4%) in 135 tested individuals. This is the only result which is not statistically significant ( $p = 0.973$ ) probably because the sample size is small. (Table 5 and 6) Figure (4)

**Table 5. Estimates of prevalence and heterogeneity according to premalignant gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Sanket kumar, 2011	50	62	47,1 to 75,3	36,96	36,96
Ashish Saxena, 2009	45	62,2	46,5 to 76,2	33,33	33,33
Gyo'rgy M Buza's, 2016	40	60	43,3 to 75,1	29,71	29,71
Total (fixed effects)	135	61,2	52,5 to 69,4	100	100
Total (random effects)	135	61,2	52,9 to 69,1	100	100

**Table 6. Test for heterogeneity in the population with premalignant gastroduodenal disorders**

Q	0,05
DF	2
Significance level	P = 0,97
I <sup>2</sup> (inconsistency)	0,00%
95% CI for I <sup>2</sup>	0,00 to 0,00



**Figure 4.** Prevalence of premalignant gastroduodenal disorders population

#### 3.4. Prevalence of malignant gastroduodenal disorders population.

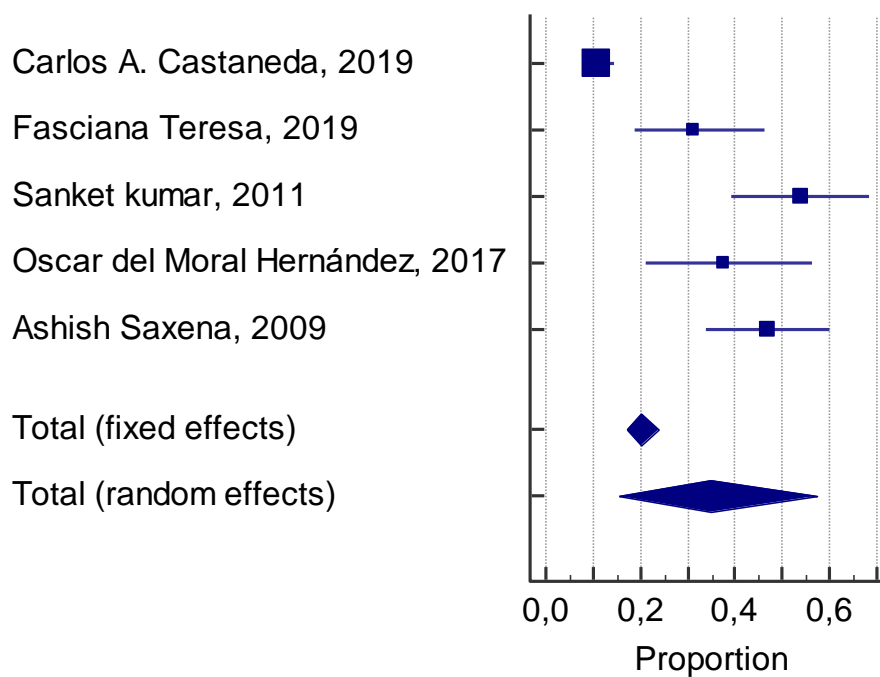
There were five studies reporting on malignant gastroduodenal disorders in 567 individuals, a prevalence of 20.1% (95%CI: 16.9%-23.6%) was estimated. (table 7 and 8) (Figure 5)

**Table 7. Estimates of prevalence and heterogeneity according to malignant gastroduodenal disorders**

Study	Sample size	Proportion (%)	95% CI	Weight (%)	
				Fixed	Random
Carlos A. Castaneda, 2019	375	10,6	7,7 to 14,2	65,73	21,16
Fasciana Teresa, 2019	48	31,25	18,6 to 46,2	8,57	19,78
Sanket kumar, 2011	50	54	39,3 to 68,1	8,92	19,84
Oscar del Moral Hernández, 2017	32	37,5	21,1 to 56,3	5,77	19,09
Ashish Saxena, 2009	62	46,7	33,9 to 59,8	11,01	20,12
Total (fixed effects)	567	20,1	16,9 to 23,6	100	100
Total (random effects)	567	34,7	15,3 to 57,2	100	100

**Table 8. Test for heterogeneity in the population with malignant gastroduodenal disorders**

Q	81,6
DF	4
Significance level	P < 0,0001
I <sup>2</sup> (inconsistency)	95,10%
95% CI for I <sup>2</sup>	91,22 to 97,27



**Figure 4.** Prevalence of malignant gastroduodenal disorders population

#### 4. Discussion

**Author Contributions:** **Author Contributions:** conceptualization, S.C; methodology, S.C, O.J, and R.D.; investigation, S.C, O.J, and R.D.; writing—original draft preparation, R.D, O.J, J.L.E.; writing—review and editing, S.C; supervision, S.C.

**Funding:** There were no funds or grants associated with this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Stanghellini, V.; Chan, F.K.; Hasler, W.L.; Malagelada, J.R.; Suzuki, H.; Tack, J.; Talley, N.J. Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1380-1392, doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011.
2. Koduru, P.; Irani, M.; Quigley, E.M.M. Definition, Pathogenesis, and Management of That Cursed Dyspepsia. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2018**, *16*, 467-479, doi:10.1016/j.cgh.2017.09.002.
3. Masuy, I.; Van Oudenhove, L.; Tack, J. Review article: treatment options for functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* **2019**, *49*, 1134-1172, doi:10.1111/apt.15191.
4. Talley, N.J.; Ford, A.C. Functional Dyspepsia. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 1853-1863, doi:10.1056/NEJMra1501505.
5. Stanghellini, V. Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome: Beyond Rome IV. *Dig Dis* **2017**, *35 Suppl 1*, 14-17, doi:10.1159/000485408.
6. Tomita, T.; Oshima, T.; Miwa, H. New Approaches to Diagnosis and Treatment of Functional Dyspepsia. *Curr Gastroenterol Rep* **2018**, *20*, 55, doi:10.1007/s11894-018-0663-4.
7. Chang, K.L.; Estores, D.S. Upper Gastrointestinal Conditions: Nonmalignant Conditions of the Stomach. *FP Essent* **2017**, *458*, 18-24.
8. Smolka, A.J.; Schubert, M.L. Helicobacter pylori-Induced Changes in Gastric Acid Secretion and Upper Gastrointestinal Disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 227-252, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_10.
9. Falkeis-Veits, C.; Vieth, M. Non-malignant Helicobacter pylori-Associated Diseases. *Adv Exp Med Biol* **2019**, doi:10.1007/5584\_2019\_362.
10. Watari, J.; Chen, N.; Amenta, P.S.; Fukui, H.; Oshima, T.; Tomita, T.; Miwa, H.; Lim, K.J.; Das, K.M. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 5461-5473, doi:10.3748/wjg.v20.i18.5461.
11. Lanas, A.; Chan, F.K.L. Peptic ulcer disease. *Lancet* **2017**, *390*, 613-624, doi:10.1016/S0140-6736(16)32404-7.
12. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Carreón-Talavera, R.; Camorlinga-Ponce, M.; Gomez-Delgado, A.; Torres, J.; Fuentes-Pananá, E.M. Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS One* **2013**, *8*, e62850, doi:10.1371/journal.pone.0062850.
13. Martínez-López, J.L.; Torres, J.; Camorlinga-Ponce, M.; Mantilla, A.; Leal, Y.A.; Fuentes-Pananá, E.M. Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses* **2014**, *6*, 301-318, doi:10.3390/v6010301.



14. Zong, L.; Seto, Y. CpG island methylator phenotype, Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, and microsatellite instability and prognosis in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2014**, *9*, e86097, doi:10.1371/journal.pone.0086097.
15. Kim, J.Y.; Bae, B.N.; Kang, G.; Kim, H.J.; Park, K. Cytokine expression associated with Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. *APMIS* **2017**, *125*, 808-815, doi:10.1111/apm.12725.
16. Rugge, M.; Genta, R.M.; Di Mario, F.; El-Omar, E.M.; El-Serag, H.B.; Fassan, M.; Hunt, R.H.; Kuipers, E.J.; Malfertheiner, P.; Sugano, K., et al. Gastric Cancer as Preventable Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2017**, doi:10.1016/j.cgh.2017.05.023.
17. Del Moral-Hernández, O.; Castañón-Sánchez, C.A.; Reyes-Navarrete, S.; Martínez-Carrillo, D.N.; Betancourt-Linares, R.; Jiménez-Wences, H.; de la Peña, S.; Román-Román, A.; Hernández-Sotelo, D.; Fernández-Tilapa, G. Multiple infections by EBV, HCMV and Helicobacter pylori are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico: An observational study. *Medicine (Baltimore)* **2019**, *98*, e14124, doi:10.1097/MD.00000000000014124.
18. Hooi, J.K.Y.; Lai, W.Y.; Ng, W.K.; Suen, M.M.Y.; Underwood, F.E.; Tanyingoh, D.; Malfertheiner, P.; Graham, D.Y.; Wong, V.W.S.; Wu, J.C.Y., et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 420-429, doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022.
19. Crowe, S.E. Infection. *N Engl J Med* **2019**, *380*, 1158-1165, doi:10.1056/NEJMcp1710945.
20. Chmiela, M.; Gonciarz, W. Molecular mimicry in Helicobacter pylori infections. *World J Gastroenterol* **2017**, *23*, 3964-3977, doi:10.3748/wjg.v23.i22.3964.
21. Mejías-Luque, R.; Gerhard, M. Immune Evasion Strategies and Persistence of Helicobacter pylori. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 53-71, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_3.
22. Salama, N.R.; Hartung, M.L.; Müller, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 385-399, doi:10.1038/nrmicro3016.
23. Espinoza, J.L.; Takami, A.; Trung, L.Q.; Kato, S.; Nakao, S. Resveratrol Prevents EBV Transformation and Inhibits the Outgrowth of EBV-Immortalized Human B Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e51306, doi:10.1371/journal.pone.0051306.
24. Quoc Trung, L.; Espinoza, J.L.; Takami, A.; Nakao, S. Resveratrol Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Malignant NK Cells via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *PLoS One* **2013**, *8*, e55183, doi:10.1371/journal.pone.0055183.
25. Taylor, G.S.; Long, H.M.; Brooks, J.M.; Rickinson, A.B.; Hislop, A.D. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol* **2015**, *33*, 787-821, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326.
26. Yanai, H.; Murakami, T.; Yoshiyama, H.; Takeuchi, H.; Nishikawa, J.; Nakamura, H.; Okita, K.; Miura, O.; Shimizu, N.; Takada, K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol* **1999**, *29*, 39-43.
27. Ryan, J.L.; Morgan, D.R.; Dominguez, R.L.; Thorne, L.B.; Elmore, S.H.; Mino-Kenudson, M.; Lauwers, G.Y.; Booker, J.K.; Gulley, M.L. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* **2009**, *89*, 80-90, doi:labinvest2008103 [pii] 10.1038/labinvest.2008.103.
28. Chen, X.Z.; Chen, H.; Castro, F.A.; Hu, J.K.; Brenner, H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94*, e792, doi:10.1097/MD.0000000000000792.

29. Choi, M.G.; Jeong, J.Y.; Kim, K.M.; Bae, J.M.; Noh, J.H.; Sohn, T.S.; Kim, S. Clinical significance of gastritis cystica profunda and its association with Epstein-Barr virus in gastric cancer. *Cancer* **2012**, *118*, 5227-5233, doi:10.1002/cncr.27541.
30. de Souza, C.R.T.; Almeida, M.C.A.; Khayat, A.S.; da Silva, E.L.; Soares, P.C.; Chaves, L.C.; Burbano, R.M.R. Association between. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 4928-4938, doi:10.3748/wjg.v24.i43.4928.
31. Minoura-Etoh, J.; Gotoh, K.; Sato, R.; Ogata, M.; Kaku, N.; Fujioka, T.; Nishizono, A. Helicobacter pylori-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *J Med Microbiol* **2006**, *55*, 905-911, doi:10.1099/jmm.0.46580-0.
32. Allison, C.C.; Ferrand, J.; McLeod, L.; Hassan, M.; Kaparakis-Liaskos, M.; Grubman, A.; Bhathal, P.S.; Dev, A.; Sievert, W.; Jenkins, B.J., et al. Nucleotide oligomerization domain 1 enhances IFN- $\gamma$  signaling in gastric epithelial cells during Helicobacter pylori infection and exacerbates disease severity. *J Immunol* **2013**, *190*, 3706-3715, doi:10.4049/jimmunol.1200591.
33. JL, E.; A, T.; LQ, T.; S, K.; S, N. Resveratrol prevents EBV transformation and inhibits the outgrowth of EBV-immortalized human B cells. *PloS one* **2012**, doi:10.1371/journal.pone.0051306.
34. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Sánchez-Zauco, N.; Gómez-Delgado, A.; Camorlinga-Ponce, M.; Maldonado-Bernal, C.; Fuentes-Pananá, E.M. Elevated Levels of Interferon-. *J Immunol Res* **2017**, *2017*, 7069242, doi:10.1155/2017/7069242.
35. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; Group, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* **2009**, *6*, e1000097, doi:10.1371/journal.pmed.1000097.
36. Buzás, G.M.; Konderák, J. Co-infection with Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus in benign upper digestive diseases: An endoscopic and serologic pilot study. *United European Gastroenterol J* **2016**, *4*, 388-394, doi:10.1177/2050640615610265.
37. Buzás, G.M.; Lotz, G.; Schneider, F.; Józán, J. [Changing prevalence of Helicobacter pylori infection in the 9th district of Budapest. A retrospective endoscopic study, 1997-2012]. *Orv Hetil* **2013**, *154*, 900-907, doi:10.1556/OH.2013.29630.
38. Cárdenas-Mondragón, M.G.; Torres, J.; Flores-Luna, L.; Camorlinga-Ponce, M.; Carreón-Talavera, R.; Gomez-Delgado, A.; Kasamatsu, E.; Fuentes-Pananá, E.M. Case-control study of Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 1866-1873, doi:10.1038/bjc.2015.175.
39. Saxena, A.; Nath Prasad, K.; Chand Ghoshal, U.; Krishnani, N.; Roshan Bhagat, M.; Husain, N. Association of Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus with gastric cancer and peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* **2008**, *43*, 669-674, doi:10.1080/00365520801909660.
40. Kattoor, J.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Ding, S.; Eizuru, Y.; Abraham, E.K.; Chandralekha, B.; Amma, N.S.; Nair, M.K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in southern India: A comparison with a large-scale Japanese series. *J Med Virol* **2002**, *68*, 384-389, doi:10.1002/jmv.10215.
41. Herrera-Goepfert, R.; Akiba, S.; Koriyama, C.; Ding, S.; Reyes, E.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Eizuru, Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population. *World J Gastroenterol* **2005**, *11*, 6096-6103, doi:10.3748/wjg.v11.i39.6096.
42. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Singh, A.; Saxena, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Epstein-Barr virus DNA load and its association with Helicobacter pylori infection in gastroduodenal diseases. *Braz J Infect Dis* **2011**, *15*, 583-590.

43. Shukla, S.K.; Prasad, K.N.; Tripathi, A.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Husain, N. Expression profile of latent and lytic transcripts of epstein-barr virus in patients with gastroduodenal diseases: a study from northern India. *J Med Virol* **2012**, *84*, 1289-1297, doi:10.1002/jmv.23322.
44. de Souza, C.R.; de Oliveira, K.S.; Ferraz, J.J.; Leal, M.F.; Calcagno, D.Q.; Seabra, A.D.; Khayat, A.S.; Montenegro, R.C.; Alves, A.P.; Assumpção, P.P., et al. Occurrence of Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol* **2014**, *14*, 179, doi:10.1186/1471-230X-14-179.
45. Yoo, Y.; Lee, Y.; Lee, Y.M.; Choe, Y.H. Co-Infection with Cytomegalovirus and Helicobacter pylori in a Child with Ménétrier's Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **2013**, *16*, 123-126, doi:10.5223/pghn.2013.16.2.123.
46. Crespo, P.; Dias, N.; Marques, N.; Saraiva da Cunha, J. Gastritis as a manifestation of primary CMV infection in an immunocompetent host. *BMJ Case Rep* **2015**, *2015*, doi:10.1136/bcr-2014-206991.
47. Hokama, A.; Taira, K.; Yamamoto, Y.; Kinjo, N.; Kinjo, F.; Takahashi, K.; Fujita, J. Cytomegalovirus gastritis. *World J Gastrointest Endosc* **2010**, *2*, 379-380, doi:10.4253/wjge.v2.i11.379.
48. Castaneda, C.A.; Castillo, M.; Chavez, I.; Barreda, F.; Suarez, N.; Nieves, J.; Bernabe, L.A.; Valdivia, D.; Ruiz, E.; Dias-Neto, E., et al. Prevalence of. *J Glob Oncol* **2019**, *5*, 1-9, doi:10.1200/JGO.19.00122.
49. Yoshiwara, E.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Itoh, T.; Minakami, Y.; Chirinos, J.L.; Watanabe, J.; Takano, J.; Miyagui, J.; Hidalgo, H., et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J Exp Clin Cancer Res* **2005**, *24*, 49-54.
50. Mendoza, D.; Herrera, P.; Gilman, R.H.; Lanfranco, J.; Tapia, M.; Bussalleu, A.; Tenorio, J.H.; Guillén-Rodríguez, C.E.; Arróspide, M.T.; Piscocoya, A., et al. Variation in the prevalence of gastric cancer in Perú. *Int J Cancer* **2008**, *123*, 414-420, doi:10.1002/ijc.23420.
51. Cavalcante, M.Q.; Silva, C.I.; Braga-Neto, M.B.; Fialho, A.B.; Nunes Fialho, A.; Barbosa, A.M.; Cruz, F.W.; Rocha, G.A.; Queiroz, D.M.; Braga, L.L. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 561-563, doi:10.1590/s0074-02762012000400021.
52. Asgeirsdottir, G.A.; Kjartansdottir, I.; Olafsdottir, A.S.; Hreinsson, J.P.; Hrafnkelsson, H.; Johannsson, E.; Björnsson, E.S. Helicobacter pylori infection in Icelandic children. *Scand J Gastroenterol* **2017**, *52*, 686-690, doi:10.1080/00365521.2017.1304986.
53. Kusano, C.; Gotoda, T.; Ishikawa, H.; Moriyama, M. The administrative project of Helicobacter pylori infection screening among junior high school students in an area of Japan with a high incidence of gastric cancer. *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 16-19, doi:10.1007/s10120-017-0688-7.
54. Inoue, M. Changing epidemiology of Helicobacter pylori in Japan. *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 3-7, doi:10.1007/s10120-016-0658-5.
55. Wang, C.; Nishiyama, T.; Kikuchi, S.; Inoue, M.; Sawada, N.; Tsugane, S.; Lin, Y. Changing trends in the prevalence of H. pylori infection in Japan (1908-2003): a systematic review and meta-regression analysis of 170,752 individuals. *Sci Rep* **2017**, *7*, 15491, doi:10.1038/s41598-017-15490-7.
56. Burucoa, C.; Axon, A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* **2017**, *22 Suppl 1*, doi:10.1111/hel.12403.
57. Watanabe, M.; Ito, H.; Hosono, S.; Oze, I.; Ashida, C.; Tajima, K.; Katoh, H.; Matsuo, K.; Tanaka, H. Declining trends in prevalence of Helicobacter pylori infection by birth-year in a Japanese population. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 1738-1743, doi:10.1111/cas.12821.

58. Corral, J.E.; Mera, R.; Dye, C.W.; Morgan, D.R. Helicobacter pylori recurrence after eradication in Latin America: Implications for gastric cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol* **2017**, *9*, 184-193, doi:10.4251/wjgo.v9.i4.184.
59. Bae, J.M.; Kim, E.H. Epstein-Barr Virus and Gastric Cancer Risk: A Meta-analysis With Meta-regression of Case-control Studies. *J Prev Med Public Health* **2016**, *49*, 97-107, doi:10.3961/jpmph.15.068.
60. Ohnishi, N.; Yuasa, H.; Tanaka, S.; Sawa, H.; Miura, M.; Matsui, A.; Higashi, H.; Musashi, M.; Iwabuchi, K.; Suzuki, M., et al. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 1003-1008, doi:10.1073/pnas.0711183105.
61. Yong, X.; Tang, B.; Li, B.S.; Xie, R.; Hu, C.J.; Luo, G.; Qin, Y.; Dong, H.; Yang, S.M. Helicobacter pylori virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun Signal* **2015**, *13*, 30, doi:10.1186/s12964-015-0111-0.
62. Hatakeyama, M. Helicobacter pylori CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 306-316, doi:10.1016/j.chom.2014.02.008.
63. Dixon, B.R.E.A.; Hossain, R.; Patel, R.V.; Algoood, H.M.S. Th17 Cells in Helicobacter pylori Infection: a Dichotomy of Help and Harm. *Infect Immun* **2019**, *87*, doi:10.1128/IAI.00363-19.
64. Rahal, E.A.; Hajjar, H.; Rajeh, M.; Yamout, B.; Abdelnoor, A.M. Epstein-Barr Virus and Human herpes virus 6 Type A DNA Enhance IL-17 Production in Mice. *Viral Immunol* **2015**, *28*, 297-302, doi:10.1089/vim.2014.0129.
65. Shiomi, S.; Toriie, A.; Imamura, S.; Konishi, H.; Mitsufuji, S.; Iwakura, Y.; Yamaoka, Y.; Ota, H.; Yamamoto, T.; Imanishi, J., et al. IL-17 is involved in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter* **2008**, *13*, 518-524, doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00629.x.
66. Salloum, N.; Hussein, H.M.; Jammaz, R.; Jiche, S.; Uthman, I.W.; Abdelnoor, A.M.; Rahal, E.A. Epstein-Barr virus DNA modulates regulatory T-cell programming in addition to enhancing interleukin-17A production via Toll-like receptor 9. *PLoS One* **2018**, *13*, e0200546, doi:10.1371/journal.pone.0200546.
67. Carbo, A.; Olivares-Villagómez, D.; Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J.; Chaturvedi, R.; Piazuelo, M.B.; Delgado, A.; Washington, M.K.; Wilson, K.T.; Algoood, H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4+ T cell responses during chronic Helicobacter pylori infection. *MBio* **2014**, *5*, e01243-01214, doi:10.1128/mBio.01243-14.
68. Caruso, R.; Fina, D.; Peluso, I.; Fantini, M.C.; Tosti, C.; Del Vecchio Blanco, G.; Paoluzi, O.A.; Caprioli, F.; Andrei, F.; Stolfi, C., et al. IL-21 is highly produced in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis. *J Immunol* **2007**, *178*, 5957-5965, doi:10.4049/jimmunol.178.9.5957.
69. Bagheri, N.; Azadegan-Dehkordi, F.; Shirzad, M.; Zamanzad, B.; Rahimian, G.; Taghikhani, A.; Rafieian-Kopaei, M.; Shirzad, H. Mucosal interleukin-21 mRNA expression level is high in patients with Helicobacter pylori and is associated with the severity of gastritis. *Cent Eur J Immunol* **2015**, *40*, 61-67, doi:10.5114/ceji.2015.50835.
70. Lebre, M.C.; Vieira, P.L.; Tang, M.W.; Aarrass, S.; Helder, B.; Newsom-Davis, T.; Tak, P.P.; Screaton, G.R. Synovial IL-21/TNF-producing CD4. *J Leukoc Biol* **2017**, *101*, 775-783, doi:10.1189/jlb.5A0516-217RR.
71. Ortega, C.; Estévez, O.A.; Fernández, S.; Aguado, R.; Rumbao, J.M.; Gonzalez, T.; Pérez-Navero, J.L.; Santamaría, M. Interleukin-21 overexpression dominates T cell response to Epstein-Barr virus in a fatal case of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. *Clin Vaccine Immunol* **2013**, *20*, 765-771, doi:10.1128/CVI.00002-13.

72. Sanaii, A.; Shirzad, H.; Haghghian, M.; Rahimian, G.; Soltani, A.; Shafigh, M.; Tahmasbi, K.; Bagheri, N. Role of Th22 cells in Helicobacter pylori-related gastritis and peptic ulcer diseases. *Mol Biol Rep* **2019**, doi:10.1007/s11033-019-05004-1.
73. Matsusaka, K.; Funata, S.; Fukayama, M.; Kaneda, A. DNA methylation in gastric cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 3916-3926, doi:10.3748/wjg.v20.i14.3916.
74. Wu, W.K.; Yu, J.; Chan, M.T.; To, K.F.; Cheng, A.S. Combinatorial epigenetic deregulation by Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infections in gastric tumourigenesis. *J Pathol* **2016**, *239*, 245-249, doi:10.1002/path.4731.
75. Fukayama, M.; Kunita, A.; Kaneda, A. Gastritis-Infection-Cancer Sequence of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1045*, 437-457, doi:10.1007/978-981-10-7230-7\_20.
76. Saju, P.; Murata-Kamiya, N.; Hayashi, T.; Senda, Y.; Nagase, L.; Noda, S.; Matsusaka, K.; Funata, S.; Kunita, A.; Urabe, M., et al. Host SHP1 phosphatase antagonizes Helicobacter pylori CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16026, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.26.
77. Pandey, S.; Jha, H.C.; Shukla, S.K.; Shirley, M.K.; Robertson, E.S. Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by. *MBio* **2018**, *9*, doi:10.1128/mBio.00649-18.
78. Cui, H.; Jin, Y.; Chen, F.; Ni, H.; Hu, C.; Xu, Y.; Xuan, H.; Hu, D.; Deng, W.; Zhang, Y., et al. Clinicopathological evidence of Hepatitis B Virus infection in the development of gastric adenocarcinoma. *J Med Virol* **2019**, doi:10.1002/jmv.25584.
79. Espinoza, J.L.; Matsumoto, A.; Tanaka, H.; Matsumura, I. Gastric microbiota: An emerging player in Helicobacter pylori-induced gastric malignancies. *Cancer Letters* **2018**, *414*, 147-152, doi:10.1016/j.canlet.2017.11.009.
80. Coker, O.O.; Dai, Z.; Nie, Y.; Zhao, G.; Cao, L.; Nakatsu, G.; Wu, W.K.; Wong, S.H.; Chen, Z.; Sung, J.J.Y., et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* **2018**, *67*, 1024-1032, doi:10.1136/gutjnl-2017-314281.
81. Alarcón, T.; Llorca, L.; Perez-Perez, G. Impact of the Microbiota and Gastric Disease Development by Helicobacter pylori. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**, *400*, 253-275, doi:10.1007/978-3-319-50520-6\_11.
82. Wakabayashi, R.; Nakahama, Y.; Nguyen, V.; Espinoza, J.L. The Host-Microbe Interplay in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Microorganisms* **2019**, *7*, doi:10.3390/microorganisms7070199.