

R.34.759

R 1189

Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos y factores que la condicionan

Trabajo realizado para optar al Grado de Doctor en Medicina por la licenciada María Rojas Fera.



Sevilla, 4 de Enero de 2002

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
el folio 167 número 163 del libro
correspondiente.

Sevilla, 4 de marzo de 2002

El Jefe del Negociado de Tesis.

Rosa Martín

Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos y factores que la condicionan

TD
R/189



Universidad de Sevilla
Departamento de Microbiología

**D^a María Victoria Borobio, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla y D.
Rafael Romero Castro, Facultativo Especialista de Area del Servicio de
Aparato Digestivo del HUV Macarena de Sevilla,**

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "**Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos y factores que la condicionan**" ha sido realizada por D^a María Rojas Feria bajo nuestra supervisión considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a diez de Octubre de 2001.



Fdo. Dra. María Victoria Borobio



Dr.D. Rafael Romero Castro

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas. Por ello, quiero agradecerlo:

En primer lugar, al Profesor Herrerías, por haberme brindado la oportunidad de descubrir el apasionante mundo de la investigación y alentado a trabajar en ella. Su constante estímulo para profundizar y ampliar conocimientos constituye el elemento indispensable para un continuo y necesario progreso científico. Sus aportaciones profesionales y personales en la realización de este trabajo son buena prueba de ello.

A la Dra. Borobio, por su dirección, su experiencia en la dirección de trabajos científicos, sus aportaciones personales, y sobre todo, por la paciencia manifestada en las continuas revisiones de este trabajo.

De manera especial, al Dr. Romero, por su aliento, por sembrarme tantas inquietudes, por sus siempre originales aportaciones y, de manera muy especial, por su paciencia en los momentos difíciles. Auténtico coordinador de esta tesis, en ocasiones desde la distancia, que ha permitido que las fases de elaboración del presente trabajo se fuesen sucediendo satisfactoriamente a lo largo del tiempo que hemos venido trabajando juntos.

Al Dr. Pellicer, por sus acertados consejos, y a todo el personal de la Unidad de Endoscopia, por su ayuda desinteresada y su paciencia durante el proceso de recogida de muestras.

Al personal del Departamento de Microbiología y, especialmente, a la Dra. Suárez, por toda su amabilidad, sus consejos y su dedicación en el cultivo de las muestras.

Al personal del Departamento de Anatomía Patológica, de forma especial a la Dra. Pareja, ante todo, mi amiga, por todo lo que me ha ayudado; al Dr. Rivera y a Paqui, por todo el tiempo que me han dedicado.

Al Dr. Valenzuela y su equipo, por su colaboración y sus interesantes reflexiones sobre el estudio morfométrico.

A la Dra. Gómez Galindo por su disposición y eficiencia en la realización de los test del aliento.

A la Dra. Fernández, por su colaboración en el estudio estadístico.

A mis compañeros del Servicio de Aparato Digestivo, por todo lo que me han enseñado.

A la Dra. Millán, Olga, y a la Dra. Cortés, María José, por su ayuda y consejos en los últimos momentos.

A todos los miembros de mi familia, por su resignación a estar sin mi compañía, por su ánimo constante y porque sin ellos no habría podido llegar hasta aquí.

A Ignacio, por su apoyo incondicional, por haber estado ahí en todo momento y porque sin él, no hubiera sido posible la finalización de este trabajo.

A mi familia,

Índice

	Pág.
I. Introducción	2
1.-Perspectiva histórica	3
2.-Microbiología	5
3.-Epidemiología	13
4.-Patogenia	18
5.-Histología	25
6.-Diagnóstico	29
7.-Aspectos clínicos	36
8.-Tratamiento	41
II. Objetivos	47
III. Material y Métodos	50
IV. Resultados	58
1.-Datos epidemiológicos	59
2.-Relación entre las distintas variables epidemiológicas y la resistencia	63
3.-Relación entre la densidad de <i>H. pylori</i> en la mucosa y la resistencia	67
4.-Relación entre la profundidad alcanzada por <i>H. pylori</i> en la mucosa y la resistencia	70
5.-Fenotipo bacteriano y resistencia a los antibióticos	72
V. Discusión	73
1.-Prevalencia de la resistencia	76
2.-Resistencia y variables epidemiológicas	85
3.-Resistencia y densidad bacteriana	89
4.-Resistencia y profundidad	94
5.-Resistencia y fenotipo bacteriano	96
VI. Conclusiones	97
VII. Bibliografía	99

I.- Introducción

1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

A lo largo de la historia la úlcera péptica ha sido considerada como una enfermedad provocada por factores ambientales, genéticos o psicosomáticos. A pesar de que hace cien años se describió la existencia de bacterias con forma espiral en la mucosa gástrica (1), el papel de las bacterias en la patología gástrica permanece olvidado, debido principalmente a la dificultad en el aislamiento y cultivo de ellas.

A principios del siglo XX, la patogenia de la úlcera péptica se creía relacionada con el estrés y la dieta alimenticia. Años más tarde, se asumió que el ácido gástrico era el principal causante de ella. En 1971, sir James Black (2) identificó un subtipo de receptores de histamina (H_2) que parecían ser mediadores de la secreción ácida, desarrollándose posteriormente los fármacos antagonistas de estos receptores, lo que supuso un gran avance en el tratamiento de la úlcera péptica.

A mediados de los años 70, Steer (3) comienza a asociar la inflamación de la mucosa gástrica con la existencia de bacterias espirales, aunque fracasa en el intento de cultivarlas. Doce años más tarde, Warren (4), un patólogo australiano, observa también esta asociación e insta a Barry Marshall, residente de medicina interna, a aislar el microorganismo a partir de biopsias de la mucosa gástrica, lo que consigue de forma fortuita.

Marshall (5) y Morris (6) efectuaron experimentos de autoinoculación para confirmar que el microorganismo provocaba gastritis y no era un simple comensal de la mucosa gástrica.

En 1983, Warren (4) y Marshall (7) publican en Lancet dos cartas en las que comunican el descubrimiento de la bacteria, a la que denominan *Campylobacter-like*. Marshall preconiza que este microorganismo debe desempeñar un papel importante en la gastritis, la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Tras la publicación, investigadores de todo el mundo comprueban la presencia de la bacteria en el moco gástrico y empiezan a relacionarla con la existencia de inflamación en la mucosa gástrica. Posteriormente, se describen características, fundamentalmente en relación con los ácidos grasos celulares, que la diferencian de las bacterias del género *Campylobacter*, llegándose a denominar *Helicobacter pylori* y creándose un nuevo género bacteriano, el género *Helicobacter*.

McNulty y colaboradores (8) mostraron que el tratamiento antimicrobiano producía una reducción de la inflamación de la mucosa gástrica causada por *H. pylori*, sugiriendo que la eliminación de la infección podía conducir a la curación de la gastritis. El primer tratamiento eficaz fue desarrollado por Borody (9), al emplear una triple terapia con tetraciclina, metronidazol y sales de bismuto. Graham (10,11) demuestra, en 1991, en un ensayo controlado y aleatorio, que la curación de la infección evitaba la recaída de la úlcera gástrica y duodenal.

En 1994, se celebra una reunión de consenso, convocada por el Instituto Nacional de Salud Americano (12), donde se define a *H. pylori* como el principal causante de la úlcera péptica, recomendándose la erradicación del microorganismo en todos los individuos ulcerosos infectados. En dicho año, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer lo declara agente carcinogénico, al estar implicado en el desarrollo del cáncer gástrico (13).

2. MICROBIOLOGÍA

El género *Helicobacter* está constituido por bacilos gramnegativos curvados con flagelos uni o bipolares, recubiertos de una vaina. Son catalasa y oxidasa positivos, capaces de hidrolizar rápidamente la urea, precisando una atmósfera microaerófila para crecer (14). Este género agrupa al menos a 18 especies diferenciadas genéticamente que, según el nicho ecológico que ocupan, se clasifican en especies gástricas e intestinales.

Las especies gástricas son productoras de ureasa y sensibles a las sales biliares, asociándose a patología gástrica (excepto *H. nemestrinae*) mientras que las helicobacterias intestinales pueden tolerar concentraciones de sales biliares mayores del 20%, no produciendo patología en humanos la mayoría de ellas (15-17).

2.1. Características microbiológicas

2.1.1. Morfología

H. pylori es un bacilo gramnegativo helicoidal, con bordes redondeados cuando se aísla en biopsias gástricas. Cuando se cultiva en medio sólido, el microorganismo adquiere una forma redondeada (14), que se transforma en cocoide tras un cultivo prolongado (18). Las formas cocoides son metabólicamente activas, aunque no pueden ser cultivadas *in vitro* (19).

En las muestras de tejido gástrico *H. pylori* tiene un tamaño de 0.5 a 1 μ de ancho por 2.5 a 4.5 μ de largo, mostrando de 1 a 8 flagelos polares, de unas 30 μ de longitud, recubiertos por una vaina y con un bulbo terminal (14). La presencia de los flagelos le confiere motilidad y constituye un factor de virulencia. La membrana externa se recubre por un glicocálix.

2.1.2. Estructura

Genoma

El genoma de *H. pylori* consiste en un cromosoma circular de 1.667.867 pares de bases. Aproximadamente el 40% de las cepas contienen plásmidos, aunque éstos no contienen factores de virulencia. En el genoma existen dos copias de cada gen rRNA (16S y 23S) (20). El contenido medio de guanina y citosina es del 39%, aunque 5 regiones del genoma tienen una composición significativamente diferente. Dos de ellas contienen una o más copias de la secuencia de inserción IS605, estando implicados sus genes en el procesamiento del ADN (21). Otra región es el islote de patogenicidad *cag* (PAI), flanqueado por 31 pares de bases repetidos. El gen *cagA* está situado en uno de los extremos de este islote. Esta región está presente sólo en algunas cepas, siendo responsable de la expresión de la proteína *cagA*, proteína que induce una respuesta inflamatoria severa en la mucosa. Ligados a esta región se encuentran los genes *picA* y *picB*.

El gen *vacA*, que codifica una proteína homónima de 140 kD, también es determinante de la patogenicidad de *H. pylori*. Se han descrito varias variantes alélicas. La familia de alelos m1 y m2 se diferencian entre sí en la secuencia de la porción media del gen, mientras que la familia de alelos s1a, s1b y s2 lo hacen en el péptido señal.

Uno de los genes más característicos de esta bacteria es el de la *ureasa*. El operón de la *ureasa* se compone de 7 genes. Dos de ellos son estructurales (*ureA* y *ureB*), suficientes para la construcción de la apoenzima; el resto, son accesorios (*ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH*), necesarios para la inserción de los iones de níquel en el sitio activo de la enzima (22).

H. pylori muestra una gran diversidad genética (23), siendo diferentes las cepas aisladas de individuos no relacionados entre sí. Esta diversidad se explica tanto por la variable localización de los genes en el mapa genómico (macrodiversidad) como por las diferencias existentes en la secuencia de nucleótidos dentro de un mismo gen (variación del 3 al 5%) (24). La diversidad entre las cepas de *H. pylori* explica el débil proceso de selección de genotipos que ha sufrido la especie y refleja la escasa competencia de las cepas entre sí.

Pared celular y lipopolisacáridos

Aproximadamente, el 4% de la capacidad de codificación del genoma de *H. pylori* se emplea en codificar las proteínas de la membrana externa, porcentaje superior al observado en otras bacterias (25). La mayoría de estas proteínas pertenecen a 3 familias, la mayor de las cuáles consta de 20 miembros, muchos de ellos porinas (26) o adhesinas específicas al factor B de Lewis (27). Los miembros de esta familia tienen una similitud en su secuencia mayor del 95%, lo que sugiere que las secuencias específicas a cada una tienen un papel limitado en la variación antigénica.

Se han identificado varias proteínas en la membrana externa de la pared celular, con pesos moleculares comprendidos entre 31 y 80 kD (28). La proteína HspB y la ureasa se localizan en el citoplasma de la bacteria en las fases tempranas del cultivo, mientras que en fases tardías se observan en la membrana externa celular (29). Este hecho se debe a que las proteínas citoplasmáticas son liberadas durante la autólisis bacteriana, siendo captadas por otras bacterias, característica que es esencial para entender la patogénesis de la infección (30).

También se ha purificado y caracterizado una familia de porinas de la membrana, designadas como HopA-E, con pesos moleculares comprendidos entre 48 y 67 kD.

La estructura química del lipopolisacárido consta de un core formado por heptasacáridos, para cuya síntesis se requieren múltiples glicosiltransferasas (31), y una cadena O, compuesta por ácidos de Lewis, idénticos a los existentes en los tejidos del huésped. Se piensa que la similitud molecular con el antígeno sanguíneo Lewis estaría implicada en la colonización y persistencia de la infección e incluso en procesos de autoinmunidad. El lipopolisacárido tiene una actividad

inmunológica débil, propiedad que también ayudaría a la persistencia de la infección.

2.1.3. Metabolismo

H. pylori puede utilizar la glucosa para la síntesis de pentosas y para generar una fuerza reductora a través del ciclo de la pentosa. La actividad glucokinasa está asociada a la membrana celular, existiendo transportadores específicos para la D-glucosa (32). La glucosa también puede ser metabolizada a través de la vía de Entner-Doudoroff (33).

Los aminoácidos son una fuente importante de carbono, nitrógeno y energía. Para su metabolismo utiliza una vía de fermentación similar a la de otras bacterias anaerobias (34), utilizándose el nitrógeno resultante de la desaminación de los aminoácidos en el ciclo de la urea.

Las características microaerófilas de la bacteria se deben tanto a sus requerimientos de oxígeno como a la necesidad de una presión parcial de CO₂ elevada. La catalasa, la superóxido dismutasa y la proteína recombinante reparadora (recA) son importantes para resistir el daño oxidativo y pueden representar un sistema de supervivencia de la bacteria dentro del huésped.

2.1.4. Resistencia

Una cepa es resistente a un fármaco si su concentración mínima inhibitoria (CMI) es mayor que la concentración que el fármaco alcanza *in vivo* en el lugar de la infección. La resistencia a los antibióticos puede ser natural o adquirida. La resistencia natural es intrínseca al microorganismo, estando condicionada por las características de la bacteria. La resistencia adquirida puede ser primaria, provocada por el contacto con el fármaco a través de tratamientos no relacionados con el microorganismo, y secundaria, vinculada al contacto con el tratamiento para erradicar la bacteria causante de la infección. En *H. pylori* la resistencia primaria surge por el uso de antibióticos en el tratamiento de las infecciones de la comunidad, principalmente genitourinarias y respiratorias. La resistencia secundaria aparece tras el fracaso del tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Resistencia a los nitroimidazoles

Los primeros fármacos utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori* fueron los nitroimidazoles, en concreto el metronidazol y el tinidazol. La diferencia entre ambos radica en su farmacodinamia y su perfil de seguridad, existiendo resistencia cruzada entre ellos (35).

Aunque la CMI de este grupo para inhibir el crecimiento de *H. pylori* no es baja (CMI₅₀ 1 mg/l), no se afecta negativamente por el pH. Además, presentan la ventaja de ser excretados a la luz gástrica, donde se concentran. El metronidazol es una base débil no ionizada a pH neutro, que se transforma en ionizada al cruzar la

barrera gástrica, por acción del pH ácido, acumulándose en la luz gástrica hasta alcanzar su equilibrio. Para que este fármaco sea activo necesita penetrar en la bacteria y que se reduzca su grupo nitro a hidroxilamina (36).

La selectividad frente a los microorganismos anaerobios se basa en que requiere un bajo potencial redox para la reducción de su grupo nitro (de -430 a -460 mV), potencial que no puede ser alcanzado por los aerobios. El metronidazol inhibe el crecimiento de *H. pylori* porque este microorganismo puede alcanzar, en condiciones microaerofílicas, un potencial redox menor a -430 mV. El mecanismo exacto de acción no se conoce, aunque se supone que actúa lesionando el DNA y provocando la muerte celular (35).

El mecanismo de resistencia a estos fármacos tampoco está suficientemente aclarado. Smith y Edwards (37) estudiaron la tasa de muerte celular de *H. pylori* tras la administración de metronidazol y hallaron que era dependiente de la tensión relativa de oxígeno del medio y de la densidad celular, ambas determinantes de las condiciones redox del medio. Estos autores observaron que, bajo condiciones anaeróbicas, la tasa de muerte celular era mayor. Cederbrant (38) apoya estos argumentos, demostrando que la resistencia *in vitro* a metronidazol es inestable, disminuyendo cuando las cepas se incuban en un medio anaerobio en las primeras horas de cultivo. En condiciones anaerobias se obtiene un potencial redox bajo, lográndose una mayor reducción del metronidazol y una mayor actividad de éste.

El mecanismo de resistencia a metronidazol en *H. pylori* parece deberse a una pérdida de la capacidad de la bacteria de alcanzar el potencial redox necesario para reducir el fármaco. Goodwin (39) determina que la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) nitrorreductasa podría ser la enzima responsable de la reducción del grupo nitro y que una mutación en el gen que la codifica (*rdxA*) podría disminuir la actividad enzimática. Este autor (39) determina que la resistencia a metronidazol se debe a una pérdida de la insensibilidad al oxígeno de la NADPH nitrorreductasa. El gen que codifica esta enzima (*rdxA*) es un gen de 630 bp, homólogo de las nitrorreductasas clásicas de las bacterias entéricas, que difiere de éstas en el contenido en cisteínas (6 vs 1 ó 2 en las entéricas) y en el punto isoeléctrico (pI 7.99 vs 5.4-5.6). Una mutación en este gen provocaría la resistencia a metronidazol. En el caso de la cepa de *H. pylori* NCTC11638 (cepa de referencia), la adquisición de resistencia se debe a la inserción de la secuencia IS605 (40).

El patrón de resistencia a metronidazol sigue una distribución continua, es decir, el espectro de CMI varía dependiendo del estado redox de la bacteria.

Evolución de la resistencia a metronidazol

La resistencia a metronidazol se ha detectado en todo el mundo, con gran variabilidad entre los distintos países, según el grado de utilización del fármaco, estando condicionada por el uso previo en otras infecciones, generalmente

parasitarias y ginecológicas. El mapa epidemiológico difiere en las distintas regiones, por la falta de estandarización en los métodos de detección.

En Europa, la prevalencia de la resistencia primaria está próxima al 30%. En 1992, en un estudio multicéntrico estandarizado (41) se observaron grandes diferencias entre los distintos países europeos, oscilando entre el 7% de España y el 49% de Grecia. En cambio, en países en vías de desarrollo, como es el caso de África, la tasa de resistencia se acerca al 80% (42). En Hong Kong, se han hallado cifras intermedias, rondando el 54% (43).

En los últimos años se ha producido un incremento progresivo en las tasas de resistencia a estos fármacos. En Bélgica, de 1989 a 1994 (44), se incrementaron del 30% al 48.3%, no observándose en los años posteriores (1995 a 1998) variación significativa (45). En Holanda (46-47), se han comunicado ascensos desde un 7% a un 32%, en el periodo comprendido entre 1993 y 1996.

En España, la prevalencia media de resistencia a metronidazol es del 26%, aunque oscila considerablemente entre las diversas regiones geográficas. En el periodo de 1991 a 1995, las tasas aumentaron de un 9% a un 21.6%, si bien en los últimos años permanecen estables (48). Nuestro grupo observó una prevalencia del 42% en el periodo 1998-1999.

Una variable a tener en cuenta en la epidemiología de la resistencia es la población inmigrante. Un estudio halló una prevalencia de resistencia del 37% (49) en nativos ingleses, frente a un 90% en inmigrantes de Bangladesh. En un estudio francés, se obtuvo una resistencia del 11.5% en la población nativa, frente a un 42.5% en inmigrantes africanos.

Resistencia a los macrólidos

Entre los macrólidos disponibles, sólo claritromicina se utiliza ampliamente como tratamiento de la infección por *H. pylori*, debido a que la concentración de este fármaco necesaria para inhibir el crecimiento de esta bacteria es baja (CMI₅₀, 0.03 mg/l), y se modifica poco a pH bajo; la CMI de los macrólidos restantes aumenta al disminuir el pH (35).

La elevada potencia de este fármaco se explica por su mayor hidrofobicidad en comparación con otros macrólidos, por lo que difunde bien en la mucosa gástrica y se concentra en el moco y en el interior celular (50). Goldman y colaboradores (50) han demostrado que eritromicina, claritromicina y su metabolito 14C-eritromicina se unen a los ribosomas de *H. pylori*, siendo su constante de disociación una de las más bajas medidas para el complejo macrólido-ribosoma. Esta constante se sitúa dos órdenes de magnitud por debajo de la constante de disociación para otras bacterias gramnegativas. Estos hallazgos pueden explicar la buena actividad de estos fármacos frente a *H. pylori*.

La resistencia a claritromicina presenta una distribución bimodal, es decir, existe o no (51). Cuando existe, su efecto es similar a la sustitución de este fármaco por un placebo.

La resistencia de este microorganismo a los macrólidos se debe a la falta de puntos de unión de estos fármacos a los ribosomas de la bacteria, interesando a todas las moléculas de esta familia. Dicho mecanismo puede ser demostrado incubando eritromicina marcada con concentraciones crecientes de ribosomas, obtenidos de microorganismos sensibles y resistentes. La concentración de antibiótico unido aumenta de forma paralela a la concentración de ribosomas presentes en las cepas sensibles, pero no en las cepas resistentes, poniendo de manifiesto la falta de unión del antibiótico a éstos, es decir, la unión fármaco-ribosoma es dosis dependiente en cepas sensibles y no tiene lugar en cepas resistentes (52).

La modificación en los puntos de unión a los ribosomas se establece por cambios postranscripcionales. Responsable de la resistencia puede ser la mutación en el dominio V de la peptidiltransferasa del 23rRNA, descrita primero en otras bacterias, como *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycobacterium intracellulare* (36). Versalovic y colaboradores (53) la describieron en *H. pylori* en 1996. Se han descrito 7 mutaciones diferentes (54). Las mutaciones fueron halladas primero en las posiciones 2143 y 2144 del genoma bacteriano (55), describiéndose posteriormente en las posiciones 2116 y 2142 (56). Son de carácter dominante, constituyendo cambios transicionales (adenina por guanina) o más frecuente, de transversión (adenina por citosina). El tipo de mutación puede determinar el grado de resistencia. Así, Versalovic (57) observa que la mutación A2142G se presenta más frecuentemente que la mutación A2143G en las cepas con valores de CMI > 64 mg/l. Las mutaciones son homocigóticas, los fenotipos que inducen son estables y su adquisición puede tener lugar por transferencia horizontal.

El método de referencia para determinar la mutación es la secuenciación del genoma de *H. pylori*. Los métodos de PCR-RFLP pueden aplicarse directamente a las cepas, ya que la mutación en la posición 2142 crea un sitio de restricción donde actúa la enzima BsaI y la mutación en la 2143, otro donde lo hace la enzima BbsI (52-53).

Evolución de la resistencia

La prevalencia de la resistencia a los macrólidos sufre variaciones en los distintos países de forma paralela al uso previo de este fármaco en otras infecciones, principalmente respiratorias (35).

Globalmente, las tasas de resistencia comunicadas oscilan entre el 0 y el 15% (36). En Estados Unidos (58), las tasas se sitúan entre un 10.6% y un 12%, según el método de análisis utilizado (dilución en agar o E-test), mayores que las observadas en Canadá (<3%) (59). En Europa, la resistencia sigue un gradiente de norte a sur, encontrándose las tasas más bajas en el norte (3% en Escandinavia y Holanda) y las más altas en los países mediterráneos, donde oscilan entre un 10 y un 15% (46). En un trabajo publicado recientemente, se comunica una prevalencia del 11.3% en Italia (60), cifra cercana a la observada en Bulgaria (9.7%) (61). En Gran Bretaña y Alemania las cifras son intermedias. En Bélgica, la prevalencia de

resistencia a claritromicina ha experimentado un ascenso significativo, pasando de un 0.9% en 1995 a un 17.8% en 1998 (45).

En España (62), la prevalencia media de resistencia es del 6.7%, si bien oscila considerablemente entre las diversas regiones, aumentando a un ritmo relativamente alto en los últimos años. El porcentaje medio de resistencias a claritromicina en 1995 era del 4.6%, aumentando al 10.9% en 1997. En Zaragoza, el grupo de Gomollón (63) obtiene un 5.5% de resistencia en 1998, cifra que se eleva a un 15.8% en 1999. En nuestro medio hospitalario la prevalencia primaria es del 13% (64).

Resistencia a amoxicilina

La amoxicilina es el único betalactámico utilizado en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, debido a su gran actividad (CMI menor de 0.03 mg/l) (36).

Las bacterias adquieren resistencia a este fármaco por tres mecanismos: síntesis de betalactamasas, disminución de la permeabilidad de la membrana al fármaco o desarrollo de cambios estructurales en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs). Las PBPs incluyen transpeptidasas, transglicosilasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas.

Los betalactámicos actúan sobre *H. pylori* inhibiendo las fases finales de la síntesis del peptidoglicano, un mecanismo bioquímico en el cuál intervienen varias proteínas de unión a las penicilinas. En las cepas de *H. pylori* resistentes a amoxicilina no se ha detectado actividad betalactamasa (35). Dore y colaboradores (65) han descrito que la resistencia a amoxicilina se debe a la falta de una de las cuatro proteínas de unión a este fármaco, la PBP D, normalmente presente en las cepas sensibles. DeLoney (66), además de observar una disminución de la afinidad de la PBP1 por los betalactámicos halla que, en las cepas resistentes, la permeabilidad de la membrana para estos antibióticos está disminuida.

Van Zwet (67) ha logrado aislar una cepa con resistencia adquirida estable a la amoxicilina, incluso tras congelación a -80°C y cultivo. Dado el intercambio natural de DNA entre las distintas cepas, por conjugación y transformación, la transmisión de la resistencia es posible.

Resistencia a tetraciclinas

La CMI de las tetraciclinas frente a *H. pylori* es moderada (0.25 mg/l), siendo su actividad independiente del pH. Otra ventaja de este grupo es que se concentra de forma adecuada en la mucosa gástrica.

La resistencia de *H. pylori* a ellas es baja, si bien existe resistencia cruzada con metronidazol. En Gran Bretaña, la resistencia es cercana al 6% (68). Realdi (69), en un estudio en 369 pacientes dispépticos, obtiene una resistencia primaria a este fármaco del 14%.

Resistencia a quinolonas

H. pylori posee resistencia natural a las quinolonas de primera generación, como el ácido nalidíxico (35). Las fluorquinolonas no constituyen un tratamiento de primera línea en la infección por *H. pylori*, sin embargo, se han constatado resistencias cuando se usan solos o en combinación con otros antibióticos frente a esta infección (36). Son fármacos con una actividad moderada (CMI frente a *H. pylori* de 0.5 mg/l), con adecuada concentración en la mucosa gástrica y actividad dependiente del pH. *In vitro*, la tasa de selección de mutantes resistentes es menor que la de metronidazol e incluso que la de los macrólidos.

Las fluorquinolonas inhiben la subunidad A de la enzima DNA girasa. Esta enzima, compuesta por dos subunidades A y dos B y codificada por los genes *girA* y *girB*, tiene como función desenrollar el DNA al comienzo de la replicación (35).

La resistencia de *H. pylori* a estos fármacos ha sido estudiada por Moore y colaboradores (70), quienes asocian la pérdida de actividad de estos fármacos frente a *H. pylori* a mutaciones en el genoma de esta bacteria. La alteración que determina la resistencia se localiza entre los aminoácidos 67 y 106 del gen *girA*, conociéndose en *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *M. pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus* (35). En *H. pylori* se detectan mutaciones en las posiciones 87 (asn por lys), 88 (ala por val), 91 (asp por gly, asn o tyr) y 97 (ala por val), que se asocian a un aumento de la CMI de *H. pylori*, de 0.25 mg/l a 4 mg/l.

La resistencia primaria descrita a quinolonas es de un 1-3.5% (71). La primera evidencia de resistencia secundaria se conoció en 1987 (72), siendo alta en monoterapia y de carácter estable.

Resistencia a rifampicina

La resistencia a los fármacos de esta familia (rifampicina y rifaximina) se detecta en bajos porcentajes, habiéndose comunicado tras monoterapias (73). Son fármacos con gran actividad frente a *H. pylori*, independiente del pH, y buena concentración en la mucosa gástrica. Actúan inhibiendo la subunidad β de la RNA polimerasa, enzima codificada por el gen *rpoB*. La alteración que origina la resistencia a estos fármacos es una mutación en este gen.

3. EPIDEMIOLOGÍA

3.1. Fuente de la infección

El reservorio principal de *H. pylori* es el estómago humano. Se ha intentado hallar una fuente animal de la infección. Aunque se han aislado distintas especies de *Helicobacter* en la cavidad gástrica de gatos (74), cerdos, ovejas y monos, su transmisión es anecdótica (75). Grubel y colaboradores (76) han publicado que *H. pylori* es capaz de sobrevivir en el tubo digestivo de la mosca común durante 30 horas, pudiendo actuar este insecto como vector de la infección. A diferencia de ellos, Osato (77) no ha logrado aislar este microorganismo en el tubo digestivo de moscas expuestas previamente a heces que contenían *H. pylori*.

La especificidad del hombre como huésped puede estar en relación con un mecanismo de absorción del hierro, dependiente de la lactoferrina humana (78). El nicho ecológico es el antro gástrico humano, al existir en esta zona gástrica unos receptores específicos a los que es capaz de adherirse. Se puede aislar también de otras áreas de mucosa gástrica ectópica (metaplasia gástrica en duodeno, esófago de Barrett o recto) y de otras localizaciones, como la placa dental (79) y la saliva (80), habiéndose cultivado a partir de muestras de esta última. Ésto apoyaría la hipótesis de que la cavidad oral podría actuar como reservorio. Esta hipótesis se refuerza por los hallazgos de la misma cepa en la placa dental y en el estómago, mediante estudios de DNA (81). También se ha logrado cultivar a partir de muestras de heces (82).

3.2. Mecanismos de transmisión

Se han descrito varios mecanismos de posible transmisión:

3.2.1. Transmisión fecal-oral

Es, probablemente, la más importante. *H. pylori* se elimina con el jugo gástrico, el moco y la descamación celular. Se ha conseguido aislar la bacteria en las heces de individuos infectados (82), aunque de forma intermitente. El agua contaminada por material fecal también puede ser un vehículo de transmisión, aunque no se ha podido aislar en ella.

3.2.2. Transmisión oral-oral

Se ha demostrado que *H. pylori* puede alcanzar la cavidad oral con la regurgitación del contenido gástrico que se produce durante el vómito. El aislamiento de la bacteria en la cavidad oral y su cultivo a partir de muestras de vómito, hace pensar en la posibilidad de transmisión por esta vía (80-81). Se han identificado casos de transmisión oral-oral en África, donde en determinadas comunidades existe el hábito de premasticación de los alimentos (83).

3.2.3. Transmisión por fómites

La forma menos común es la yatrogénica, a través de los tubos y endoscopios. La mejora en la desinfección de los endoscopios ha reducido la incidencia de transmisión (84-85). La alta incidencia de la infección entre los endoscopistas que no utilizan guantes, sugiere que la infección se transmite a través de los instrumentos contaminados por secreción gástrica.

3.3. Población susceptible

3.3.1. Factores de riesgo para la infección por *H. pylori*

Sexo

Los varones tienen tasas de incidencia de enfermedad ulcerosa duodenal y de cáncer gástrico más elevadas que las mujeres, aunque no se han encontrado diferencias en la prevalencia del microorganismo asociada al sexo (86).

Raza o grupo étnico

En Estados Unidos se ha descrito una mayor prevalencia de *H. pylori* entre la población afroamericana e hispana que entre la blanca no hispánica (87). En otros países, como Taiwan (88) o Nueva Zelanda (89), las poblaciones indígenas presentan una tasa de infección más elevada.

Se ha observado una mayor prevalencia de infección por este microorganismo en sujetos de raza negra, independientemente de la edad, el sexo, el nivel socioeconómico o el consumo de tabaco y alcohol (87, 90).

Nivel socioeconómico

Probablemente, el nivel económico y las costumbres sociales sean los factores de riesgo más importantes para la adquisición de la infección por *H. pylori*, al relacionarse su prevalencia con las condiciones higiénicas y el contacto estrecho entre individuos.

Existe una relación inversa entre la infección por *H. pylori* y el nivel socioeconómico. En la encuesta Eurogast, llevada a cabo sobre 3194 individuos asintomáticos de 17 países europeos, la seroprevalencia de *H. pylori* se asoció inversamente con el nivel educacional de cada grupo de población (91).

Susceptibilidad genética

Uno de los diseños de investigación más relevantes para examinar la importancia de los factores genéticos es el que estudia a gemelos idénticos separados en la infancia. Uno de estos estudios fue llevado a cabo en Suecia (92), determinándose la serología frente a *H. pylori* en dos grupos de gemelos, unos criados juntos y otros separados. El coeficiente de correlación en los gemelos homocigóticos separados fue del 0.66%, lo que confirma la importancia de estos factores en la adquisición de la infección.

Otras

No se ha observado que el consumo de alcohol, tabaco o AINES se asocie con una mayor o menor prevalencia de infección por *H. pylori* (87, 91).

3.3.2. Prevalencia

H. pylori se ha hallado en la mucosa gástrica de individuos de todo el mundo. La prevalencia de la infección en los países en desarrollo es de un 70-90%, mientras que en los países desarrollados, la prevalencia es menor, oscilando entre un 25 y un 50%.

La diferente prevalencia entre los distintos países se cree que es debido a la diferente incidencia de la infección durante la infancia. De forma global, se identifican dos curvas de prevalencia (93).

En los países en vías de desarrollo, la mayoría de los individuos se infectan en la infancia, cronificándose la infección y aumentando la prevalencia a lo largo de la vida (94). En cambio, en los países desarrollados, sólo una minoría de los niños se infectan, siendo la prevalencia baja hasta los 35-40 años, observándose, a partir de entonces, un ascenso importante (91). En los países desarrollados, los individuos con mayor nivel socioeconómico tienen menores tasas de infección (90) aunque, entre ciertas minorías étnicas, persisten tasas elevadas a pesar del desarrollo económico.

En casi todos los estudios, la prevalencia de la infección en relación con la edad es similar para ambos sexos (95-96).

Prevalencia de la infección en España

En nuestro país, se han publicado varios estudios epidemiológicos, siendo discordantes los datos entre sí. Mientras que dos de los estudios (97, 98) presentan cifras bajas de prevalencia, debido a que la mayoría de los pacientes eran menores de 40 años, el estudio realizado en Barcelona (99) cifra la prevalencia en un 60%, más en consonancia con las cifras de los países de nuestro entorno.

En adultos sintomáticos, el grupo de Boixeda (100) halla una prevalencia de la infección del 71%, perteneciendo el mayor porcentaje de pacientes en los que se detectó la infección a la cuarta y quinta década de la vida. Este porcentaje es semejante al obtenido por Mur Villacampa (70%) (101).

En nuestro medio hospitalario, hemos realizado un estudio de prevalencia de la infección en donantes de sangre, sobre 611 sujetos, determinando la presencia de anticuerpos circulantes frente a *H. pylori*, resultando una prevalencia del 54.17%, sin diferencias entre sexos (102).

En todos los estudios se observa un incremento de la prevalencia de la infección con respecto a la edad.

3.3.3. Distribución geográfica

H. pylori sigue una distribución mundial, observándose grandes oscilaciones en su prevalencia entre los distintos países (93, 103).

El estudio del genoma de la bacteria muestra una clara diferencia geográfica en la distribución de los genotipos del microorganismo. Se han observado similitudes entre los genotipos de las cepas de distintas regiones al estudiar la secuencia de DNA de cepas de *H. pylori* de los 5 continentes (104). La distribución de los genotipos *vacA* en Centro y Sudamérica (104) es similar a la existente en la península Ibérica, lo que puede reflejar la relación sociocultural y económica que existió entre estas dos regiones en los siglos pasados. De forma similar, los genotipos que predominan en el norte de Europa son los mismos que predominan en Canadá y Australia, reflejando también las relaciones históricas entre estos países. En Europa (104), existe un gradiente de distribución significativo de norte a sur de los genotipos *vacA* de *H. pylori*. En el Norte y Este de Europa, predomina el genotipo s1a frente al s1b. En Francia e Italia, la prevalencia de ambos subtipos es similar, mientras que en la península Ibérica el subtipo mayoritario es el s1b.

La diferente distribución de los genotipos puede explicar la diferente significación clínica de la infección por *H. pylori* en distintas regiones del mundo, al asociarse ciertos genotipos (*cagA+*, *vacA* tipo s1) a patologías más severas (105-107).

3.4. Reinfeción

La erradicación de *H. pylori* se asocia a una reducción significativa en la tasa de recidivas ulcerosas, lográndose no sólo la cicatrización temporal, sino la curación definitiva de la enfermedad ulcerosa. Otra entidad que se beneficia de la erradicación es el linfoma gástrico MALT asociado a *H. pylori*, describiéndose la regresión histológica tumoral en los de bajo grado tras la curación de la infección. La recidiva ulcerosa y la de este tipo de linfomas tras la erradicación se asocian a una recurrencia de la infección por *H. pylori* (108, 109).

Ante una recurrencia de la infección habría que diferenciar entre *reinfeción* (es decir, cuando el paciente es infectado por una nueva cepa de *H. pylori*) y *recrudescencia* (cuando se detecta una cepa similar a la aislada previamente a la erradicación) (110).

La tasa de recurrencia de la infección tras un tratamiento erradicador eficaz es baja en los países desarrollados, oscilando entre el 0 y el 10% anual, con cifras inferiores al 3% en la mayoría de los estudios, si bien es más alta en algunos países en vías de desarrollo (108). La tasa de recurrencia parece ser similar, o incluso inferior, a la incidencia de infección primaria en la población de los correspondientes países.

El nivel socioeconómico del país podría constituir un predictor del riesgo de recurrencia. De esta forma, las mayores tasas se han descrito en regiones con

menor índice de desarrollo, como ocurre en Brasil (111), Corea (112) o Polonia (113), donde la prevalencia de *H. pylori* es muy elevada. Dentro de una misma región se ha constatado un mayor riesgo entre los individuos pertenecientes a una clase económica más deprimida. No obstante, existen paradojas, como es el caso de Turquía (114), Malasia (115), Túnez (116) o China (117), donde la tasa de recurrencias es relativamente baja, a pesar de la elevada tasa de infección. En España, la incidencia oscila entre un 2% anual, descrita por Monés (118), hasta un 7% anual, descrita por el grupo de García Valriberas (119).

El riesgo de recurrencia es mayor en la infancia, pudiéndose relacionar con los estrechos contactos físicos y las menores medidas higiénicas. Rowland (120) halla un riesgo de reinfección 26 veces mayor en los niños menores de 5 años en comparación con aquéllos de edad superior. En otro trabajo se constata que la edad media de los pacientes re infectados es menor que la de los que continúan siendo *H. pylori* negativos (121).

El riesgo de sufrir una recurrencia parece limitarse a unos pocos meses o un año después de haber administrado el tratamiento erradicador, siendo menor la incidencia de recurrencias tardías (108, 109, 122). Según distintas observaciones (121), gran parte de las recurrencias detectadas en los primeros meses son recrudescencias que no se han detectado en un momento temprano (al mes de finalizar el tratamiento), por distintos motivos; entre otros, las características de los métodos diagnósticos utilizados para comprobar la erradicación.

Otro factor del que parece depender la tasa de recurrencias es el tipo de tratamiento utilizado. Cuanto menor es la eficacia antibiótica, mayor es el riesgo de recurrencias, al tratarse de un aclaramiento bacteriano transitorio más que de una verdadera erradicación (109, 123).

Se ha sugerido que el tratamiento de mantenimiento con antagonistas de los receptores H₂ podría incrementar el riesgo de reinfección (124), si bien se requieren más estudios que confirmen estos hallazgos.

4.- PATOGENIA

Las bacterias patógenas necesitan mecanismos que les permitan colonizar la mucosa gástrica, producir lesión y evadir o tolerar los sistemas de defensa del huésped. La presencia de estos mecanismos biológicos, conocidos como factores de patogenicidad, puede explicar la aparición de síntomas y signos de la enfermedad.

Actualmente, existe evidencia de la implicación de *H. pylori* en el desarrollo de la gastritis crónica superficial. La ingesta de un inóculo bacteriano produce gastritis. Tras la curación de la infección por *H. pylori* con antibióticos, se produce un aclaramiento de la gastritis y una disminución en el título de anticuerpos.

Se han desarrollado distintos modelos animales que permiten estudiar los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *H. pylori* en la patología gastroduodenal.

4.1. Factores de patogenicidad

La colonización y persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica supone la adquisición por parte de la bacteria de unos mecanismos de adaptación que le permitan sobrevivir en este medio hostil y defenderse de la agresión que suponen el ácido gástrico, el peristaltismo y el recambio celular rápido del epitelio. Los componentes estructurales de la bacteria y la producción de mediadores bacterianos y antígenos contribuyen a ello.

4.1.1. Componentes estructurales

Flagelos

La motilidad de *H. pylori*, conferida por su forma curvada, y la presencia de flagelos en uno de sus polos, es un factor esencial en la colonización de la mucosa, permitiéndole desenvolverse en la viscosidad del moco gástrico. La importancia de los flagelos se ha podido demostrar al infectar a cerdos gnotobióticos con estirpes de *Helicobacter* aflageladas, observándose una menor colonización en estos casos (125).

Los flagelos están constituidos por polímeros de dos proteínas, denominadas flagelinas, FlaA y FlaB (126), de 53 y 54 kD respectivamente. Se ha identificado una tercera proteína, FlgE, que actuaría de anclaje de la flagelina en la base del flagelo. Se han descrito variaciones alélicas en los genes que codifican las subunidades de la flagelina, que podrían comportar diferencias en la motilidad de las cepas, aunque no ha podido demostrarse que esta variabilidad posea relevancia clínica (68).

Los flagelos están recubiertos por una vaina, compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa, que les protege frente al ácido

gástrico (127). Gracias a los flagelos, *H. pylori* es capaz de responder a estímulos quimiotácticos.

Moléculas de adherencia

La superficie de *H. pylori* presenta una hidrofobicidad elevada, que se incrementa en presencia de urea y pH ácido, lo que le confiere mayor adherencia al epitelio gástrico (14). *H. pylori* se adhiere a las células de la mucosa gástrica o a células de metaplasia gástrica en otras localizaciones, pero no a células intestinales, lo que hace pensar que deben existir receptores específicos de unión de la bacteria a estas células.

Las moléculas bacterianas implicadas en la adherencia son diversas, caracterizándose recientemente la adhesina, que reconoce específicamente antígenos de Lewis con residuos de fucosa (parte de los antígenos que determinan el grupo sanguíneo O) (128). No obstante, existe controversia en cuanto a la contribución de este antígeno a la adhesión. Su participación podría explicar la mayor prevalencia de úlceras en sujetos con grupo sanguíneo O.

Algunas cepas de *H. pylori* poseen la capacidad de secretar ciertos antígenos, denominados Lewis^x y Lewis^y, similares a Lewis^b, que podrían estar implicados en fenómenos autoinmunes responsables de la disminución de la capacidad de acidificación gástrica y en la gastritis atrófica (129).

Algunos autores han detectado una hemaglutinina fibrilar que se une específicamente a la N-acetil-neuraminil-lactosa y que puede corresponder al factor primario de la adhesión (130). Otros receptores para *H. pylori* son la fosfatidiletanolamina y la laminina, componentes de membrana de las células epiteliales.

La intensidad de la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico está relacionada con la gravedad de las lesiones histológicas (131). La unión de la bacteria al epitelio origina modificaciones en el citoesqueleto que conducen a la fosforilación de tirosinas en proteínas celulares adyacentes y a la secreción de IL8 por la célula epitelial.

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido de *H. pylori* consta de una porción lipídica, de la cuál la más importante en cuanto a las propiedades endotóxicas es el lípido A, un núcleo polisacárido central y cadenas polisacáridas proyectadas al exterior de la membrana bacteriana, que constituyen la parte antigénica de la molécula.

El lipopolisacárido induce una leve respuesta inflamatoria; sin embargo, altera la unión de las lamininas del epitelio gástrico, afectando a la integridad de éste (132). Otras propiedades son la inducción de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) e interleukina 1 (IL-1).

4.1.2. Enzimas

Ureasa

H. pylori es un microorganismo microaerófilo, es decir, necesita oxígeno en bajas concentraciones, encontrando en el interior de la mucosa gástrica un hábitat óptimo. Esta localización también le permite mantenerse apartado del pH bajo y de la respuesta celular del huésped (133). Esta bacteria sólo es capaz de subsistir en medios con $\text{pH} > 5.4$. La ureasa, localizada en el citosol y en la membrana bacteriana (134), hidroliza la urea del medio, produciendo iones amonio que neutralizan el pH ácido.

La ureasa tiene un peso molecular de 540 kD, estando formada por 2 subunidades, de 28 y 61 kD, que se acoplan formando un hexámero que contiene níquel (22). La capacidad hidrolítica de esta enzima es extraordinaria, lo que le permite actuar con la escasa concentración de urea del estómago.

La ureasa, además de permitir la colonización bacteriana, contribuye a la lesión tisular asociada a la infección, a través de mecanismos directos e indirectos. El amonio resultante de la hidrólisis de la urea, al interactuar con el agua, produce hidróxido de amonio, que induce vacuolización de las células (135), siendo su acúmulo responsable de la hipoclorhidria que se observa en las fases agudas de la infección. El amonio también interfiere en la retrodifusión de hidrogeniones de la mucosa gástrica. El acúmulo de hidrogeniones generaría un gradiente electroquímico en la membrana citoplasmática que podría ser utilizado por la bacteria como fuente de energía.

Los efectos nocivos más importantes derivados de esta enzima se producen a través de su capacidad de estimular la respuesta inmune. La ureasa constituye el componente proteico más abundante de *H. pylori*, con gran capacidad inmunógena. Por sí misma es capaz de provocar la respuesta humoral, con producción de IgA e IgG específicas, así como estimular la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos y activar los macrófagos, promoviendo la formación y liberación de radicales libres de oxígeno, que ayudarían a amplificar la respuesta inflamatoria local. La reacción entre el amonio y el ácido hipocloroso, producido por los leucocitos activados, da lugar a la formación de hidroxilamina o monocloramina, que contribuirían al desarrollo de la lesión.

Catalasa y superóxido dismutasa

La catalasa y la superóxido dismutasa (68) protegen a *H. pylori* de los metabolitos tóxicos de los macrófagos y neutrófilos. Un factor que facilitaría también la colonización es el factor de inhibición de la secreción gástrica (136). Es una proteína termolábil que parece tener una acción antisecretora sobre las células parietales, determinando una hipoclorhidria transitoria que facilitaría el asentamiento bacteriano, al reducir el moco y la secreción de pepsina.

Fosfolipasas y deshidrogenasas

La principal acción de las fosfolipasas A₂ y C, existentes en todas las cepas de *H. pylori*, es la degradación de los fosfolípidos que componen la barrera mucosa gástrica, disminuyendo la hidrofobicidad y aumentando la susceptibilidad a la lesión celular. Al actuar sobre ellos, liberan ácido araquidónico, que se transforma en leucotrienos, PAF o lisolecitina, moléculas con capacidad ulcerogénica directa (137).

La alcohol deshidrogenasa de *H. pylori* es capaz de producir grandes cantidades de acetaldehído, que al unirse a proteínas de la mucosa gastroduodenal, interfiere en los mecanismos de defensa (138). Además, la oxidación de acetaldehído a acetato genera radicales libres de oxígeno.

4.1.3. Citotoxinas

Citotoxina vacuolizante (VacA)

Aproximadamente, la mitad de las cepas de *H. pylori* producen una toxina vacuolizante *in vitro* (VacA), siendo más frecuente encontrar esta toxina en sujetos con úlcera que entre los que sólo presentan una gastritis antral (68). A pesar de que no todas las cepas de *H. pylori* expresan actividad de esta toxina, el gen que la codifica está presente en todas (139).

La proteína VacA es sintetizada como un precursor, cuyo extremo carboxiterminal es escindido para generar la proteína madura de 95 kD, que se activa al exponerse a pH bajo, resistiendo a la acción de la pepsina.

Las cepas *vacA* s1m1 presentan una actividad citotóxica importante *in vitro*. Las cepas s1m2 muestran citotoxicidad moderada, mientras que las s2m2 no producen citotoxina vacuolizante (140). En un estudio reciente, realizado en biopsias gástricas, se ha demostrado que los fenómenos inflamatorios irían ligados a la región s del gen, mientras que la región m sería responsable de la intensidad de la lesión epitelial. Este estudio sugiere un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica en caso de infección por cepas s1a (141).

Citotoxina cagA e islote de patogenicidad (PAI) Cag

El locus o islote de patogenicidad *cag* del genoma se ha demostrado relevante en el desarrollo de enfermedad por *H. pylori*. Esta región cromosómica multigénica codifica más de 15 genes diferentes, entre ellos el gen *cagA*, responsable de la producción de la toxina CagA. El hecho de que la expresión del gen *cagA* coincidiera en la mayoría de los casos con la existencia de actividad vacuolizante (VacA), promovió la clasificación de *H. pylori* en dos tipos (I y II), según la presencia o ausencia de ambos factores de patogenicidad (142).

Se ha observado, *in vitro* e *in vivo*, que las cepas *cagA*⁺ inducen más interleuquinas (IL1a, IL1b, IL8) que las cepas *cagA*⁻, citoquinas implicadas en los

fenómenos inflamatorios asociados a la infección por este microorganismo. Sin embargo, en estudios realizados posteriormente se cuestiona el papel de la proteína CagA como factor de patogenicidad, al no observarse diferencias en la prevalencia de infección por cepas *cagA+* entre pacientes afectados de gastritis crónica o de úlcera péptica (143).

Estas divergencias se han intentado explicar estudiando otros genes ligados al gen *cagA* en el islote de patogenicidad. Así, la producción de IL8 no parece depender de la presencia del gen *cagA*, sino de otros genes situados en el PAI *cag*, como los *picA* y *picB*. Otras acciones que parecen derivarse de genes presentes en dicho islote son la fosforilación de tirosinas en el huésped y la reorganización del citoesqueleto de las células de superficie del huésped (126). Por tanto, a pesar de que la expresión de la citotoxina CagA pueda considerarse un marcador de patogenicidad al revelar la existencia del PAI *cag*, los efectos biológicos pueden derivarse de otros genes situados en dicho islote.

Otro gen con implicaciones en la virulencia es el gen *ice*, que se expresa como consecuencia de la interacción de la bacteria con el epitelio de superficie gástrico, conociéndose al menos dos variantes alélicas (144). Una de ellas es similar en su secuencia al gen codificador de una endonucleasa de *Neisseria lactamica*.

4.2. La respuesta inflamatoria en la patogenia de las lesiones asociadas a *H. pylori*

Además de la acción directa de *H. pylori* en la mucosa gástrica, la respuesta del sistema inmune a la infección por este microorganismo tiene un papel fundamental en el desarrollo de las lesiones gastroduodenales.

4.2.1. Respuesta inflamatoria inespecífica

La respuesta inicial a la infección por *H. pylori* es una marcada infiltración de la mucosa por neutrófilos. Se ha sugerido que la capacidad de las cepas de *H. pylori* de estimular dicha respuesta condicionaría la gravedad de las lesiones asociadas a esta bacteria.

La adhesión de este microorganismo a las células epiteliales de la mucosa gástrica conlleva a la activación de éstas y a la liberación de diversas citoquinas, como TNF α , IFN, IL1, IL6 e IL8, que propician el reclutamiento y la activación de los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos en el lugar de la infección (145).

Los neutrófilos son activados por la IL8 y, probablemente, por sustancias producidas por *H. pylori*, como la denominada NAP (proteína activadora de neutrófilos). Esta proteína actúa induciendo la interacción entre el receptor CD11b/CD18 de los leucocitos y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) de las células epiteliales (146).

Mediante modelos animales, se ha demostrado que las interacciones que ocurren en los fenómenos de rodamiento leucocitarios, en la microcirculación

gástrica, dependen de las L y P selectinas, moléculas que pertenecen a la familia de los receptores de adhesión celular. Estas moléculas participan también en la formación de agregados plaquetarios, cuyo significado permanece sin aclarar (147). Tras los fenómenos de rodamiento, la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular se asocia a degranulación de los mastocitos e incremento de la permeabilidad vascular (147). La infiltración tisular por neutrófilos activados conlleva a la liberación de productos metabólicos con una marcada actividad tóxica, como la mieloperoxidasa y los radicales libres de oxígeno. También se generan eicosanoides, como el leucotrieno C₄, que amplifica la respuesta inflamatoria.

Otra molécula involucrada en la lesión tisular es el óxido nítrico (NO), producido por las células inflamatorias tras la infección por *H. pylori*. Se ha comprobado un incremento de la actividad NO-sintasa-inducible en la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y úlcera duodenal, originándose esta actividad en las células mononucleares y los neutrófilos (148).

En todos los casos de infección por *H. pylori*, aparece un infiltrado inflamatorio crónico, con predominio de linfocitos T. Esta respuesta es predominantemente de Th-1, lo que posiblemente contribuye a la persistencia de la infección a pesar de producirse una respuesta inflamatoria intensa (149).

4.2.2. Respuesta inmune relacionada con genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA)

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* estimula el sistema HLA, aumentando la expresión de moléculas de clase II en las células epiteliales. La expresión de estas moléculas sugiere que las células epiteliales son más que una barrera fisiológica, contribuyendo a la estimulación de las células T CD₄ locales.

En un estudio europeo, en el que se investigó la influencia de los antígenos HLA-DR y DQ en la progresión de la infección por *H. pylori* a la atrofia gástrica, se observó que la expresión del alelo DQ5 se asociaba a la gastritis atrófica con metaplasia intestinal (150).

En Japón, se llevó a cabo un estudio donde se analizó la relación del gen DQA1 con la gastritis crónica y la úlcera péptica asociada a este microorganismo. Este estudio mostró que la expresión del alelo DQA1*0102 era significativamente menor en pacientes con úlcera duodenal infectados por *H. pylori* que en pacientes no infectados, y que la frecuencia del alelo DQA1*0301 en enfermos con úlcera péptica e infección por *H. pylori* era significativamente mayor que en controles no infectados (151).

Estos datos sugieren que el gen DQA1 puede tener un papel importante en la patogenia de la úlcera péptica, modulando la respuesta inmune del huésped en la infección por *H. pylori*.

4.2.3. Respuesta humoral

La respuesta humoral en el huésped se caracteriza por una diversidad de anticuerpos, con diferentes funciones efectoras, incluyendo la activación del complemento y la unión a células fagocíticas. Esta respuesta es tanto local como sistémica.

Los linfocitos presentes en el infiltrado inflamatorio producen inmunoglobulinas de la clase IgA y, en menor grado, IgG. En casi todos los pacientes con gastritis crónica, infectados por *H. pylori*, se produce IgA frente a esta bacteria. Estas inmunoglobulinas son específicas frente a la proteína cagA.

Los anticuerpos IgG circulantes son los componentes mayoritarios de la respuesta humoral madura. Sus distintas subclases (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) se diferencian tanto en su estructura como en sus funciones efectoras.

Estudiando las subclases de IgG en la infección por *H. pylori*, se ha observado correlación entre los niveles de algunas de ellas y la presencia de patología gástrica, lo que puede resaltar el papel del huésped en el desarrollo de enfermedad. En dos trabajos (152, 153), se han descrito niveles de IgG₂ significativamente más elevados en pacientes con úlcera duodenal que en aquéllos con dispepsia funcional. También se ha observado una asociación significativa entre los niveles de IgG₃ y el grado de inflamación crónica en la mucosa gástrica, tanto en pacientes con dispepsia funcional como en pacientes ulcerosos.

Todos estos datos ponen de relieve que *H. pylori* cuenta con un amplio potencial para producir lesiones tisulares, tanto directamente como a través de la respuesta inmune desarrollada en el huésped tras su infección (150).

La asociación de estos mecanismos con factores ambientales y genéticos del huésped podrían condicionar que la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica determinara el desarrollo de enfermedad.

5. HISTOLOGÍA

El cambio morfológico inicial en la infección por *H. pylori* es el desarrollo de una inflamación aguda mantenida, inducida por la actuación directa del microorganismo.

El efecto de la agresión de *H. pylori* en la mucosa gástrica se manifiesta por cambios degenerativos, como depleción de mucina y exfoliación celular; cambios regenerativos, como focos de aspecto sincitial; infiltrado inflamatorio por polimorfonucleares en la *lamina propria* y epitelio foveolar superficial (154); y formación de microabscesos e imágenes de criptitis.

Habitualmente, la infección se mantiene, persistiendo la lesión epitelial, de forma que, en un periodo de tiempo que oscila entre 4 y 5 semanas, aumenta progresivamente la celularidad inflamatoria crónica, constituida por células mononucleares, que termina predominando sobre la aguda. En este momento, se establece la fase crónica de la inflamación. El infiltrado inflamatorio en la gastritis crónica depende, por tanto, del momento evolutivo de la misma. En los casos en los que existe un grado importante de atrofia o metaplasia intestinal, el infiltrado inflamatorio puede no estar presente.

5.1. Clasificación de las gastritis

El valor real de la clasificación histológica de la gastritis reside en la relación existente entre ciertos patrones de inflamación y atrofia y las enfermedades asociadas a ellos. En algunos casos, estos patrones pueden ser predictivos de riesgo de úlcera péptica o carcinoma gástrico. Para traducir los hallazgos histológicos en patrones topográficos bien definidos fue conveniente someter las características histológicas a una escala estandarizada y reproducible. Con el sistema de Sydney (155) se logró una primera clasificación, que fue mejorada en la reunión de Houston (156), al introducirse una escala analógica visual que permite mayor concordancia entre distintos observadores.

5.2. Variables sometidas a gradación

5.2.1. Densidad de *H. pylori*

La presencia de *H. pylori* es un dato importante en la práctica clínica. La variación en la densidad de estos microorganismos en la mucosa gástrica tiene importancia epidemiológica (157). La valoración de la densidad se realiza actualmente mediante la clasificación de Houston (156), compuesta de 4 grados (ausencia, escasos, frecuentes y abundantes microorganismos). La estimación de la densidad se lleva a cabo mediante la comparación de la mucosa gástrica observada al microscopio óptico con una escala gráfica que representa la mucosa gástrica con distintos grados de infiltración bacteriana.

Esta variable es difícil de cuantificar en las muestras de biopsia gástrica que presentan metaplasia intestinal, la cuál no se coloniza habitualmente por esta bacteria.

5.2.2. Actividad neutrofílica

La actividad neutrofílica es un patrón universal observado en las gastritis por *H. pylori*. Los neutrófilos se hallan en la *lamina propria*, dentro del epitelio (particularmente en la región del cuello glandular) y dentro de la luz foveolar, donde forman abscesos.

La densidad de los neutrófilos intraepiteliales se ha correlacionado con la extensión de la lesión mucosa y la intensidad de la infección por *H. pylori* (158).

La existencia de neutrófilos es un indicador muy sensible de la presencia o ausencia de infección por *H. pylori*, desapareciendo a los pocos días de curarse la infección. Si tras un tratamiento erradicador se observan neutrófilos y aparentemente no se observan microorganismos, habría que utilizar tinciones especiales o técnicas inmunohistoquímicas para detectarlos (159).

5.2.3. Inflamación crónica

La mucosa gástrica normal contiene un escaso número de células mononucleares en la *lamina propria*. Se considera normal hasta un máximo de 2 a 5 linfocitos, células plasmáticas y macrófagos por campo, al observar al microscopio con aumento x40, o bien, 2 ó 3 linfocitos o células plasmáticas entre las foveolas (156).

Las células plasmáticas están ausentes de la mucosa gástrica sana, por lo que su presencia es un indicador especialmente importante de la respuesta inflamatoria crónica. Algunos autores consideran presente la inflamación crónica al hallar 1 ó 2 células plasmáticas.

Ocasionalmente, se pueden observar linfocitos en el epitelio de la mucosa gástrica normal, especialmente en la superficie (aproximadamente 5 por cada 100 células epiteliales). Un mayor número de ellos es diagnóstico de inflamación crónica.

Tras el tratamiento erradicador de *H. pylori* la celularidad inflamatoria decae lentamente, desapareciendo al año (160).

5.2.4. Atrofia glandular

La atrofia de la mucosa gástrica se define como una pérdida del tejido glandular, que provoca un adelgazamiento de la mucosa. Cuando la capa glandular se destruye, ésta se reemplaza por una matriz fibrosa.

La atrofia de la mucosa antral es difícil de reconocer, ya que esta región se constituye por glándulas profundas, ramificadas y tortuosas, separadas por gran cantidad de tejido conectivo. Para algunos investigadores, la atrofia antral estaría representada por un aumento de células inflamatorias en la *lamina propria*, que separaría las glándulas.

La atrofia de la mucosa oxíntica es más fácil de reconocer, al observarse una reducción en el número de células parietales o principales y su reemplazo por células mucosas, una disminución de la densidad de las glándulas oxínticas y un aumento en el espacio interglandular. Para medir el grado de atrofia, Genta y Karttunen (161) han desarrollado unas escalas analógicas visuales, consistentes en una serie de dibujos que representan de forma esquemática la severidad progresiva de la gastritis.

El significado clínico de la atrofia antral se desconoce, aunque no parece tener implicaciones pronósticas, a menos que se acompañe de metaplasia intestinal o displasia (162). No obstante, es conocida la asociación entre gastritis atrófica y úlcera gástrica, aparentemente independiente de la metaplasia intestinal.

5.2.5. Metaplasia intestinal

La metaplasia intestinal es un hallazgo histológico común en la gastritis crónica de cualquier etiología, aumentando su prevalencia con la duración de la enfermedad. Supone el reemplazo progresivo de la mucosa gástrica por epitelio de característica intestinal, tanto delgado como grueso, con presencia de células caliciformes, células absortivas, células de Paneth y células endocrinas. También pueden aparecer células ciliadas. Las células caliciformes contienen mucina, compuesta de glicoproteínas ácidas, diferenciándose de la mucosa normal que contiene mucinas neutras (156).

La metaplasia intestinal se clasifica basándose en estudios morfológicos y en estudios histoquímicos de la mucina:

a) Estudios morfológicos, histoquímicos y enzimológicos (163, 164):

1. Completa o madura: cuando todas las características morfológicas y enzimáticas (fosfatasa alcalina, sucrasa, teholasa y leucinaminopeptidasa) expresadas en el fenotipo celular, corresponden a las del intestino delgado normal. La transformación en células neoplásicas es rara.
2. Incompleta: cuando las enzimas están disminuidas o ausentes, no se observan células de Paneth ni absortivas, pero existen células columnares con apariencia de células foveolares gástricas (165). En algunos casos, se observan sulfomucinas en células columnares y/o caliciformes.

Se piensa que puede ser un paso evolutivo en el desarrollo de carcinoma gástrico, ya que, habitualmente, la metaplasia que rodea a las neoplasias gástricas es de tipo incompleto (163, 165).

b) Atendiendo a la histoquímica de la mucina, se distinguen tres tipos de metaplasia intestinal (156, 166):

1. Tipo I o completa: Se constituye por células absortivas maduras, no secretoras y con ribete en cepillo respetado; entre ellas se disponen células caliciformes con contenido en mucina ácida tipo sialomucina, con alta proporción de derivados N-acetilados. La arquitectura de la mucosa es regular, siendo rectas las criptas.
2. Tipo II o incompleta: El epitelio presenta pocas células absortivas, existiendo células mucosas columnares en varios estadios de diferenciación. Estas células secretan mucina neutra y/o pequeñas cantidades de sialomucina. Entre ellas se distribuyen las células caliciformes. No se detectan sialomucinas O-acetiladas en las células caliciformes ni en las columnares. Rara vez se observan células de Paneth. La arquitectura está ligeramente distorsionada, siendo las criptas alargadas y tortuosas.
3. Tipo III o incompleta: La distorsión de la arquitectura glandular es más marcada, al igual que la atipia y la pérdida de diferenciación celular. Las células columnares contienen sulfomucinas. Existen escasas células caliciformes, que contienen sialo o sulfomucinas. Las células de Paneth están ausentes (167).

Se considera que la metaplasia intestinal predispone a malignización de la mucosa. La metaplasia completa o de tipo I conlleva menor riesgo, mientras que aquellas formas de metaplasia intestinal con características de intestino grueso (tipo II y III) se asocian a mayor incidencia de carcinoma (168).

6. DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente, los métodos diagnósticos de la infección por *H. pylori* se han dividido en directos, basados en la demostración directa de la bacteria, e indirectos, basados en el estudio y la detección de ciertas características de la bacteria o de la respuesta del sistema inmunitario del huésped frente a la infección

6.1. Métodos directos

Precisan de la realización de una endoscopia para la obtención de muestras de biopsia gástrica, por lo que resultan agresivos para el enfermo.

El número y la localización de las biopsias gástricas que deben tomarse dependen del empleo previo de fármacos: antibióticos e inhibidores de la bomba de protones (IBP) principalmente, presencia de metaplasia o atrofia gástrica o si se trata del diagnóstico inicial o tras la administración de tratamiento erradicador (169).

La distribución de *H. pylori* y la inflamación asociada son parcheadas, por lo que la toma de biopsias puede inducir a errores de muestreo, con resultados falsos negativos en las pruebas derivadas del estudio de las biopsias (170).

La mayoría de los autores recomiendan la toma de biopsias de la región antral, ya que éste es el lugar preferente de colonización de *H. pylori* (171). La toma de biopsias del cuerpo gástrico está siempre indicada tras la realización de un tratamiento erradicador, ya que la densidad de bacterias puede disminuir, y tras tratamiento reciente con IBP, debido a que se ha descrito una migración proximal del microorganismo en pacientes que reciben estos fármacos. Las biopsias del cuerpo gástrico deben obtenerse del tercio superior de la curvatura mayor (169).

No existe acuerdo con respecto al número de biopsias necesarias para un correcto diagnóstico, si bien algunos autores sugieren que es suficiente una única biopsia. Otros recomiendan obtener dos de cada localización (169).

6.1.1. Histología

La observación de microorganismos con forma espirilar en los cortes histológicos de las biopsias es un método diagnóstico sencillo de la infección por *H. pylori*. Las bacterias se localizan en el moco, en contacto con el epitelio de superficie y, con frecuencia, en profundidad dentro de las criptas. El método histológico, como ventaja frente a los demás, aporta información sobre los cambios morfológicos de la mucosa gástrica (170).

Los factores que influyen en la correcta identificación de *H. pylori* incluyen la densidad bacteriana, el tipo de tinción utilizada y el entusiasmo y experiencia del observador. La elección del método de tinción depende de la experiencia y posibilidades de cada laboratorio, no siendo específica ninguna de ellas.

La tinción con hematoxilina-eosina es la más utilizada para el diagnóstico, al emplearse de forma rutinaria y ser fácil de realizar. Como inconveniente, requiere una experiencia superior a las otras técnicas para establecer un correcto diagnóstico de la presencia del microorganismo, siendo éste difícil cuando están presentes pocas bacterias (170).

La identificación de *H. pylori* se ve facilitada con el empleo de tinciones especiales, como la de Whartin-Starry, que no se utiliza de rutina, dado que es laboriosa y presenta un elevado coste, y la de Giemsa, que por su simplicidad, rapidez y bajo coste, se considera como la de elección. Otras técnicas propuestas son la tinción con naranja de acridina, la de Brown-Hopps, la coloración de Giménez, el acetato de crisil violeta o la tinción con azul de metileno (170).

La selección de casos que requieran una tinción especial debe guiarse por el infiltrado inflamatorio de la mucosa. Así, en ausencia de inflamación, la probabilidad de infección por *H. pylori* es remota, por lo que no está indicado el empleo de estas tinciones. Por el contrario, si existe un infiltrado inflamatorio activo y no se detecta *H. pylori*, sería apropiado utilizar tinciones especiales (68). De hecho, la presencia histológica de infiltrado inflamatorio activo gástrico en un paciente que previamente no haya sido tratado de infección por *H. pylori* podría ser patognomónico de infección por esta bacteria (172). Se ha sugerido que la histología no debería emplearse rutinariamente, dado su elevado coste, reservándose para los casos en que el test rápido de la ureasa (método directo más barato) fuera negativo.

Por último, se han estudiado técnicas de inmunohistoquímica (173) e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales frente a *H. pylori* (174).

6.1.2. Estudio microscópico directo de la muestra con tinción de Gram

La tinción de Gram y la observación al microscopio de un frotis de la muestra es una técnica rápida, que alcanza una elevada especificidad, cercana al 100%, y sensibilidad, sobre todo al obtenerse muestras de antro y fundus simultáneamente (175).

6.1.3. Cultivo

El cultivo de *H. pylori* aporta dos ventajas fundamentales al diagnóstico frente al resto de técnicas diagnósticas. La primera de ellas es la determinación de la sensibilidad del microorganismo a los antimicrobianos y la segunda, la caracterización en detalle de la cepa.

La especificidad del cultivo es del 100%, siendo su sensibilidad, en los laboratorios con experiencia, mayor del 95%, si bien existen otros métodos diagnósticos más simples, más rápidos y sometidos a menor variabilidad que el cultivo (68).

H. pylori es muy sensible a la desecación, siendo aconsejable transportar las muestras de biopsia gástrica destinadas a cultivo en un medio adecuado (suero salino a 4°C o medio de transporte específico para *H. pylori*) y en el espacio de tiempo más breve posible.

Se disponen comercialmente de una gran variedad de medios de cultivo, tanto no selectivos como selectivos. Es recomendable la utilización de medios de cultivo selectivos, que añaden un suplemento antibiótico al medio nutritivo, evitando así la contaminación bacteriana de las muestras de biopsia. El medio de Skirrow es uno de los más utilizados, aconsejándose suplementarlo con sangre total o suero (del 1 al 5%) para obtener un buen crecimiento.

H. pylori requiere un ambiente microaerófilo, con alta humedad y una temperatura de 35°-37°C, durante un máximo de 7-10 días. A partir del tercer o cuarto día pueden detectarse colonias, que son traslúcidas y de tamaño variable. La confirmación diagnóstica se establece por las características del microorganismo: bacilo gramnegativo, catalasa, oxidasa y ureasa positivos. La adición de sales de tetrazolio ayuda a la identificación de las colonias cultivadas en un medio de agar (170).

En la práctica clínica, dado que el tratamiento empírico logra la erradicación de *H. pylori* en un elevado porcentaje, no es necesaria la realización de cultivo rutinariamente (171). Tras el fracaso de un primer tratamiento empírico, sería cuestionable. El cultivo está claramente indicado tras un segundo fracaso erradicador.

Recientemente, se ha propuesto un nuevo método que permite demostrar directamente la presencia de *H. pylori* y realizar antibiogramas sin necesidad de realizar una endoscopia, que es el denominado "enterotest" o "prueba del hilo". Esta prueba debe ser validada antes de poder recomendarse ampliamente (176).

6.1.4. Detección de antígenos de H. pylori en heces

Esta técnica presenta una elevada sensibilidad y especificidad. Se utiliza en el diagnóstico inicial de la infección en pacientes sintomáticos, siendo también de utilidad en la confirmación de la erradicación después del tratamiento (177). Representa una técnica diagnóstica alternativa prometedora, al ser una técnica sencilla, rápida y de bajo coste económico, especialmente indicada en pacientes con dispepsia o en la población pediátrica. Sin embargo, se necesitan más estudios que evalúen su utilidad después del tratamiento erradicador y su especificidad con respecto a otras bacterias relacionadas con *H. pylori*, como helicobacters entéricos y campylobacters.

6.1.5. Test rápido de la ureasa

La observación de que *H. pylori* produce grandes cantidades de ureasa ocasionó el desarrollo de métodos indirectos para la detección del microorganismo en muestras de biopsia gástrica.

El test rápido de la ureasa es un método barato y rápido, que consiste en la colocación de la muestra en un tubo con urea y un indicador que cambia la coloración del medio conforme lo hace el pH. En presencia de *H. pylori*, la ureasa procedente de las bacterias hidroliza la urea, generándose iones amonio, que aumentan el pH de la solución, virando el color del medio.

La rapidez del resultado depende del test comercial empleado y del número de bacterias presentes en la muestra. La especificidad de la técnica es elevada, pudiéndose producir falsos positivos en presencia de otros gérmenes productores de ureasa, como *Proteus spp.* o *Yersinia spp.*, si bien ningún otro microorganismo produce tanta cantidad de ureasa.

La sensibilidad depende de la carga bacteriana que existe en el estómago, por lo que no debe utilizarse para confirmar la desaparición de *H. pylori* tras haber administrado un tratamiento erradicador (169). La sensibilidad también disminuye en los pacientes con úlcera gástrica, si las muestras son de antro, probablemente por la mayor presencia de metaplasia o atrofia en esta región. Por ello, deben obtenerse biopsias del cuerpo gástrico en estos casos (178).

6.1.6. Técnicas de biología molecular

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección de pequeñas cantidades de ADN, alcanzando una elevada sensibilidad y especificidad. Los factores que influyen en la precisión de la técnica son la preparación de la muestra, la elección del cebador, la densidad bacteriana y el procedimiento técnico utilizado.

Una ventaja potencial de esta técnica es que permite detectar la presencia de *H. pylori* en fluidos no gástricos, como la saliva o las heces. Permite también diferenciar entre recrudescencias y verdaderas reinfecciones tras la erradicación de *H. pylori*, así como, detectar la presencia de mutaciones que determinan resistencia a ciertos fármacos, como la claritromicina.

Presenta, como inconvenientes, la obtención de falsos positivos, dada su alta sensibilidad, que hace que se puedan detectar formas no viables del germen, el elevado coste y la necesidad de disponer de un equipamiento y de personal entrenado (170).

Otros métodos diagnósticos lo constituyen los métodos de hibridación con oligonucleótidos específicos, ensayos con oligonucleótidos ligasa (179) o DNA inmunoensayo (180). Estas técnicas aún requieren el cultivo de la bacteria. Puede ser posible el desarrollo de la técnica directamente en las muestras gástricas utilizando primers con secuencia de 23S rRNA.

6.2. Métodos indirectos

Los métodos indirectos se basan en el estudio y la detección de características de la bacteria o de la respuesta inmunitaria del huésped frente a la infección. No precisan la realización de endoscopia, por lo que son poco agresivos para el paciente.

6.2.1 Prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C o ^{14}C

El principio de esta prueba es similar a otros tests basados en la demostración de la actividad ureásica. La urea marcada con ^{13}C o ^{14}C se suministra en una solución, que es ingerida por el paciente, tras recogerse una muestra basal de aire espirado. Posteriormente, se recogen muestras de aire espirado tras determinados periodos de tiempo. El CO_2 marcado, obtenido tras la hidrólisis de la urea ingerida, se exhala, siendo detectado por un espectrómetro de masas, en el caso de ^{13}C , o por un escintilógrafo, en el caso de ^{14}C .

La precisión de la técnica depende, entre otros factores, de la forma en que se suministre la urea (líquida o en comprimido), del tiempo de vaciamiento gástrico y del momento en que se recoja el CO_2 . Valora la totalidad de la mucosa gástrica, resultando una técnica con alta sensibilidad y especificidad (181).

El empleo de antibióticos, bismuto o IBP en los días previos a la realización de la prueba causa falsos negativos. También pueden obtenerse falsos negativos en pacientes sometidos a cirugía gástrica, al estar alterado el vaciamiento gástrico, y en pacientes a los que se les ha realizado una endoscopia en las horas previas. En pacientes con aclorhidria pueden obtenerse falsos positivos, por la existencia en el estómago de otras bacterias productoras de ureasa.

La prueba del aliento es la técnica de elección para confirmar la erradicación de *H. pylori*, lo que deberá comprobarse al menos 4 semanas después de haber finalizado el tratamiento (171).

6.2.2 Serología

Tras la infección por *H. pylori* se produce una elevación de IgG e IgA específicas en suero y de IgA en la mucosa gástrica. Los métodos serológicos se basan en la determinación de los anticuerpos específicos.

La mayoría de los estudios serológicos determinan anticuerpos del tipo IgG, que es la principal respuesta sistémica inmunológica, sin bien, en ocasiones, se observan individuos con títulos no diagnósticos de IgG y sí de IgA. Algunos autores han obtenido una mayor sensibilidad diagnóstica mediante la determinación de ambos tipos de anticuerpos (182). Estas técnicas indican una exposición previa al microorganismo, pero no discriminan entre personas con infección activa y enfermedad e individuos sanos previamente expuestos a la infección.

Los métodos serológicos son válidos como técnica de despistaje en estudios epidemiológicos, al ser poco invasivos, rápidos y simples de realizar. La utilidad de esta técnica para confirmar la erradicación se encuentra limitada por la prolongada latencia existente entre la desaparición de *H. pylori* y el descenso definitivo del título de anticuerpos, objetivándose a partir del sexto mes de seguimiento (183).

Recientemente se disponen de métodos de serología rápida, que utilizan sangre capilar en vez de suero, obtenida por punción digital. No debe recomendarse el empleo generalizado de estos métodos al presentar escasa sensibilidad y especificidad (184).

7. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori* EN EL APARATO DIGESTIVO

7.1. Úlcera duodenal

Se ha descrito una estrecha relación entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad ulcerosa duodenal. La asociación entre ambas no es específica, puesto que la bacteria puede estar presente en pacientes con dispepsia no ulcerosa o en pacientes asintomáticos. El motivo por el cual sólo una proporción de pacientes infectados por este microorganismo desarrolla una úlcera duodenal se desconoce. Por ello, esta patología es considerada como una entidad multifactorial, en la que, además de la infección por *H. pylori*, deben intervenir otros factores, como la susceptibilidad individual, la virulencia del germen, los factores ambientales y la edad de contagio de la infección.

La susceptibilidad genética se ha podido demostrar en estudios en gemelos homocigotos (185). La virulencia del germen se ha relacionado con variantes fenotípicas de la expresión de citotoxinas vacuolizantes y de la proteína CagA. Atherton (186) demuestra que el tipo de señal de secuencia expresado por el gen *vacA* (s1a, s1b o s2) determina la capacidad ulcerogénica de las cepas, siendo las s1a las más patógenas. Tummuru (187) halla que el 60% de los pacientes con úlcera duodenal son *cagA+*, porcentaje similar al hallado por Tee (188). Martín Guerrero (189) observa que el 82.4% de las úlceras duodenales se asocian a infección por *H. pylori cagA+*.

Los factores ambientales que pueden contribuir al desarrollo de úlcera duodenal son el estado nutricional, la toma de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y el tabaco.

El argumento más sólido a favor de que *H. pylori* sea la causa de la úlcera duodenal lo constituye la reducción de las tasas de recidiva ulcerosa cuando se logra la erradicación de la infección. La historia natural de la úlcera duodenal es la de una enfermedad crónica, caracterizada por la recurrencia tras el abandono del tratamiento antisecretor. El primer estudio donde se tiene constancia del efecto de la erradicación en la recurrencia ulcerosa fue el realizado por Coghlan (190). En él se observó que el 79% de los pacientes *H. pylori* positivos tuvieron una recurrencia ulcerosa al cabo de un año, mientras que los pacientes *H. pylori* negativos tuvieron una tasa de recurrencia del 10%. La menor incidencia de las recidivas ulcerosas tras la erradicación del microorganismo se mantiene en el tiempo, como lo demuestran los trabajos realizados por Borody (191, 192) y Forbes (193).

La erradicación de *H. pylori* consigue la aceleración de la cicatrización ulcerosa, sin necesidad de utilizar un tratamiento antisecretor coadyuvante, como demostró por primera vez Hosking (194). En España, Gisbert (195), en un estudio sobre 308 pacientes ulcerosos, observa una tasa de cicatrización ulcerosa significativamente mayor cuando se cura la infección (90%), que cuando los pacientes permanecían infectados (45%). En los controles endoscópicos realizados

unos meses más tarde, se observó una tasa acumulada de cicatrización del 98%, sin que hubieran recibido tratamiento antisecretores.

Otro aspecto que disminuye de forma significativa tras la erradicación es la tasa de recidiva hemorrágica, incluso sin tratamiento antisecretores de mantenimiento tras la erradicación, lo que conlleva a una reducción del coste económico (196).

7.2. Úlcera gástrica

La infección por *H. pylori* y los AINES representan los dos factores etiológicos más importantes de la enfermedad ulcerosa.

La prevalencia de la infección por *H. pylori* en la úlcera gástrica es menor que en la duodenal, oscilando en las distintas publicaciones entre un 70% y un 90%. Kuipers (197) observa una prevalencia de la infección del 84% al estudiar a 1400 pacientes ulcerosos, porcentaje similar al hallado en nuestro país por Boixeda (198). Estos autores observan que la prevalencia de la infección es mayor en ulcerosos no consumidores de AINES que en consumidores, siendo baja (11%) la prevalencia de úlcera gástrica no asociada a ninguno de estos dos factores de riesgo. La interacción entre *H. pylori* y AINES en la patogenia de la úlcera péptica ha estado sometida a controversia.

Algunos autores han observado una mayor prevalencia de *H. pylori* en los consumidores de AINES con lesiones gástricas que en aquéllos con mucosa de aspecto normal (199). Otros investigadores observan una mayor prevalencia de úlcera péptica en consumidores de AINES con infección por *H. pylori* que sin infección (200). Respecto al posible sinergismo entre AINES y la infección por *H. pylori* en el desarrollo de úlcera péptica, en algunos ensayos prospectivos no se evidencia que la presencia del microorganismo aumente las lesiones gastroduodenales inducidas por los fármacos gastrolesivos, si bien hay que tomar con cautela estos resultados, al tratarse de estudios con escaso número de pacientes (201). Sin embargo, es significativo el estudio prospectivo aleatorio llevado a cabo por Chan (202), donde se demuestra que la erradicación de *H. pylori* antes del empleo de AINES reduce la incidencia de úlceras inducidas por estos fármacos y establece la infección por *H. pylori* como factor de riesgo de la enfermedad ulcerosa inducida por AINES.

Actualmente, se recomienda tratar a aquellos pacientes con infección por *H. pylori* en los que se desarrolle una úlcera mientras realizan tratamiento con AINES. En la reunión de Consenso Europeo de 1996 se clasificó como "aconsejable" la administración de tratamiento erradicador en todos los pacientes infectados que realicen tratamiento con AINES (203). En la última reunión de consenso, celebrada en Maastricht en el año 2000, se establece que la erradicación de *H. pylori* previa al empleo de AINES, disminuye la incidencia de úlceras, si bien, la erradicación, como única maniobra terapéutica, es insuficiente para prevenir el resangrado ulceroso en los pacientes de alto riesgo tomadores de AINES (204).

7.3. Adenocarcinoma gástrico

La incidencia mundial de carcinoma gástrico está disminuyendo, a expensas de la disminución del carcinoma gástrico antral. Sin embargo, se constata un aumento de los tumores cardiales.

El carcinoma gástrico es el resultado de la interacción de factores ambientales y factores del huésped que ocasionan alteraciones histológicas secuenciales. La conexión entre *H. pylori* y el adenocarcinoma gástrico se pretende explicar por la capacidad del microorganismo para desencadenar gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, considerada como lesión premaligna. Kuipers (205) demuestra esta secuencia de hechos tras el seguimiento de sujetos, con y sin infección por *H. pylori*, durante un periodo de 11 años, observando mayor incidencia de gastritis atrófica y metaplasia intestinal en los individuos infectados. Estos hallazgos se desarrollan en el 40-50% de los sujetos infectados, siendo poco frecuentes en sujetos no infectados. La presencia de ambos hechos incrementa el riesgo de carcinoma gástrico distal entre 5 y 90 veces.

La asociación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de adenocarcinoma gástrico se establece a través de distintos tipos de estudios:

7.3.1. Estudios epidemiológicos

Las evidencias epidemiológicas que relacionan *H. pylori* con el carcinoma gástrico son muy sugestivas, si bien hay que interpretarlas con cautela, ya que estos estudios presentan limitaciones metodológicas.

Los estudios nos muestran que la distribución geográfica de la infección por *H. pylori* coincide con la distribución de la prevalencia de adenocarcinoma gástrico. Correa (206) estudia la prevalencia de la infección mediante serología en poblaciones con distinto riesgo de carcinoma gástrico, observando mayor prevalencia de infección en las regiones con mayor riesgo para este carcinoma. En las regiones con elevada prevalencia de adenocarcinoma gástrico, la infección se contrae a edades tempranas, a diferencia de lo que ocurre en las regiones con menor prevalencia. Existen, sin embargo, algunos puntos aún no resueltos que hacen dudar del verdadero peso de esta asociación (207):

- En todos los estudios la tasa de carcinoma gástrico varón/mujer se cifra de 4:1 a 1:5, mientras que la prevalencia de la infección por *H. pylori* es similar en ambos sexos.
- La prevalencia de la infección en algunos países en vías de desarrollo es cercana al 90%, mientras que la frecuencia de carcinoma gástrico es baja.
- La adquisición de la infección a edades tempranas, considerada de gran importancia para el desarrollo de carcinoma, varía entre el 4.2 y el 83% en países con la misma incidencia de cáncer gástrico.

- La incidencia de carcinoma gástrico en pacientes con úlcera duodenal es la mitad que en la población general, pese a que cerca del 100% de estos pacientes están infectados por *H. pylori*.

7.3.2. Estudios histopatológicos transversales

Estos estudios valoran la prevalencia de infección por *H. pylori* en el momento del diagnóstico de los casos de adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, de ellos no se puede deducir que la infección por *H. pylori* y el adenocarcinoma gástrico tengan una relación causal.

Menegatti (208) diagnostica la infección por *H. pylori* mediante serología en el 82% de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, en una muestra de 300 casos. Loffeld (209) evalúa los pacientes con adenocarcinoma gástrico, demostrando la infección en el 59% de las biopsias tumorales. De forma similar, Sipponen y colaboradores (210), empleando métodos histológicos, describen una prevalencia de la infección en el 60% de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, frente al 100% cuando emplean técnicas serológicas.

7.3.3. Estudios serológicos de casos y controles

Los trabajos retrospectivos de casos y controles pueden presentar sesgos, si no se detecta la infección en el momento actual, a pesar de que existiera en el pasado, lo que puede subestimar la fuerza de la asociación entre la infección por *H. pylori* y el adenocarcinoma gástrico. Otro inconveniente que presentan es que no pueden establecer una secuencia temporal entre la infección y el desarrollo de cáncer gástrico.

Los estudios prospectivos diagnostican la infección por *H. pylori* antes del desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Ejemplo de éstos son los trabajos llevados a cabo por Forman (211), Parsonnet (212) y Nomura (213), en los cuáles realizaron un seguimiento de los individuos entre 6 y 14 años. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en los pacientes con adenocarcinoma gástrico fue del 69, 84 y 94% respectivamente, con odds ratio promedio de 3.8 para el desarrollo de adenocarcinoma. Esta odds ratio asciende a 8.7 en los pacientes diagnosticados de carcinoma gástrico 15 o más años después del diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Estos hallazgos demuestran que la mucosa gástrica se coloniza por *H. pylori* previamente al desarrollo de adenocarcinoma gástrico.

El grupo de estudio Eurogast (214) llevó a cabo una revisión que incluía a 3000 individuos asintomáticos de 13 países, en los que se determinó serológicamente la infección por *H. pylori*. En él se concluyó que la presencia de *H. pylori* multiplica por 6 el riesgo de sufrir un adenocarcinoma gástrico.

H. pylori es considerado como un factor carcinogénico probado, al haber sido clasificado por la OMS dentro de la categoría I, grupo al que también pertenecen los virus B y C de la hepatitis. Se ha sugerido que esta bacteria supone un riesgo mayor para el desarrollo de todo tipo de tumores gástricos, si bien es

mayor con el adenocarcinoma de tipo intestinal que con el difuso. Parece que la prevalencia de la infección varía según la localización de la neoplasia en la cavidad gástrica, no asociándose el adenocarcinoma gástrico cardial con la infección, a diferencia de lo que ocurre con el antral o corporal (215).

7.4. Linfoma MALT gástrico

El término de linfoma MALT fue acuñado por Isaacson (216) en la década de los 80. La mayoría de los linfomas que aparecen en el estómago derivan del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) y reproducen su estructura. En una clasificación reciente, propuesta por el Grupo Internacional para el Estudio del Linfoma, la clasificación REAL (Revised European American Lymphoma Classification) (217), se incluyen los linfomas MALT dentro del grupo de linfomas periféricos de células B subtipo extranodal, tipo MALT. Estos linfomas se componen de linfocitos centrocitoides procedentes de la zona marginal, que infiltran y destruyen la *lamina propria* y el epitelio, dando lugar a lesiones linfoepiteliales.

La mayoría de los linfomas gastrointestinales son de células B, predominando los de bajo grado de malignidad. La presencia de áreas de bajo grado y de lesiones linfoepiteliales en algunos linfomas de alto grado sugiere que estos tumores forman parte de un mismo proceso tumoral, pudiendo progresar un linfoma de bajo grado a otro de alto grado. La mayoría de los linfomas primarios gástricos de alto grado corresponden a linfomas centroblásticos seguidos, en este orden, por linfomas inmunoblásticos, linfoblásticos y no clasificables.

Epidemiológicamente, el linfoma primario gástrico puede aparecer a cualquier edad, si bien afecta, principalmente, a individuos de edad superior a los 50 años. No obstante, los pacientes con linfoma MALT de bajo grado son significativamente más jóvenes que aquéllos con MALT de alto grado (218). La incidencia de éstos se cifra en un 5% del total de los tumores gástricos, estando la incidencia en aumento.

A diferencia del intestino delgado y colon, el estómago carece de células linfoides. El tejido linfoide en la mucosa gástrica se ha observado en individuos infectados por *H. pylori*. La presencia de tejido MALT gástrico es precursora de linfoma MALT, por lo que parece evidente que la gran mayoría de estos linfomas gástricos derivan de gastritis por *H. pylori*. En una serie de experimentos, Hussel y colaboradores (219) han mostrado que las células del linfoma responden a extractos de *H. pylori*, siendo esta respuesta cepa específica. También han establecido que la proliferación de células B es dependiente de la presencia de células T no neoplásicas, activadas por la presencia de *H. pylori*. Crabtree y Spencer (220) han propuesto que la activación de células T puede provocar una proliferación incoordinada de células B, con expansión clonal de células centrocíticas. En un paso más avanzado, la neoplasia se establece tras alteraciones genéticas que permiten a las células escapar de los mecanismos de control.

La alteración genética más importante en la transformación del tejido MALT reactivo en linfoma MALT es la pérdida o la trisomía del cromosoma 3, que está presente en el 78% de los casos (221). Se han descrito otras alteraciones genéticas, como la translocación t(1;14) (222) o la t(11;18)(q21;q21) (223).

La asociación entre *H. pylori* y linfoma MALT gástrico se ha observado principalmente en los tumores de bajo grado, sin embargo, el hecho de que un 35% de los linfomas MALT gástricos de alto grado presenten focos de bajo grado hace suponer que una proporción de los tumores de alto grado deriven de los de bajo grado.

Según estas observaciones, la infección por *H. pylori* conduciría a la infiltración de la mucosa gástrica por linfocitos B y T y a la activación de ellos. En presencia de una alteración genética, principalmente en el cromosoma 3 de los linfocitos B, se produciría una proliferación monoclonal de estas células, mediada por las células T, estimuladas a su vez por *H. pylori*. Se constituiría así el linfoma MALT de bajo grado dependiente de *H. pylori*. Alteraciones genéticas posteriores, como la translocación t(11;18) o t(1;14) harían independiente al tumor de la presencia de *H. pylori* y de los linfocitos T. La transformación del linfoma de bajo grado en alto grado estaría explicada por otra alteración genética (224).

8. TRATAMIENTO

8.1. Criterios de selección de la terapia erradicadora (203, 225)

8.1.1. Eficacia

Excluyendo la toxicidad, la eficacia es el criterio más importante en la selección de la terapia. Actualmente, la eficacia se expresa en términos de intención de tratamiento, preferible al análisis por protocolo, que está supeditado al análisis de resultados de aquéllos que continúan en seguimiento médico.

8.1.2. Efectos secundarios

Los efectos secundarios derivados del tratamiento erradicador son leves y, aunque algunos de ellos son frecuentes, no impiden a la mayoría de los pacientes continuar el tratamiento. Una de las complicaciones más graves, y a su vez infrecuente, que se ha descrito es la colitis pseudomembranosa.

8.1.3. Simplicidad

La pauta de tratamiento más recomendable es la más simple. Se deben utilizar pautas que incluyan pocos comprimidos al día, preferibles en una sola dosis y durante un corto periodo de tiempo. Existen marcadas diferencias entre los diferentes regímenes de tratamiento, en términos de número de comprimidos al día y duración, factores a tener en cuenta en la selección de la terapia.

8.1.4. Cumplimiento

La mayoría de los ensayos clínicos no evalúan este dato, fundamental a la hora de iniciar una terapia.

8.1.5. Coste

Las diferentes pautas erradicadoras tienen costes diversos. Como ejemplo, una doble terapia con omeprazol y claritromicina es 10 veces más cara que una triple terapia estándar. La aplicación de estos criterios nos ayudan a una selección racional de las pautas de tratamiento.

8.2. Criterios de erradicación

Los criterios de erradicación, según las conclusiones de la Reunión de Consenso Europeo celebrada en Maastricht se resumen en el siguiente cuadro (203).

Cuadro 1.- Criterios de erradicación Maastricht 2000

A TRATAMIENTO FUERTEMENTE RECOMENDADO	
Indicaciones	Evidencia científica
Úlcera duodenal o gástrica (activa, inactiva o complicada)	1
Maltoma	2
Gastritis atrófica	2
Tras resección de un cáncer gástrico precoz	3
Familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico	3
Deseo del paciente (tras consulta con su médico)	4

B TRATAMIENTO ACONSEJADO	
Indicaciones	Evidencia científica
Dispepsia funcional	
La erradicación es una opción apropiada	2
En algunos pacientes la erradicación mejora la sintomatología a largo plazo.	2
Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)	
La erradicación de <i>H. pylori</i> :	
* No se asocia al desarrollo de ERGE	3
* No exacerba la ERGE previa	3
HP debería ser erradicado en los pacientes que requieran una importante supresión ácida.	3
AINES	
La erradicación de <i>Helicobacter pylori</i>	
* Previa al uso de AINES, reduce la incidencia de úlcera.	2
* No es suficiente para prevenir la recurrencia ulcerosa en los tomadores frecuentes de AINES	2
* No mejora la curación de las úlceras gastroduodenales en pacientes que reciben terapia antisecretora y continúan tomando AINES.	1
H. Pylori y AINES/AAS son factores de riesgo independientes para la úlcera duodenal.	2
Estas recomendaciones están basadas en 5 niveles de evidencia	
1 Estudios controlados bien diseñados 2 Estudios de cohorte o caso-control bien diseñados o con evidencia indirecta convincente 3 Comunicación de casos, con evidencia indirecta sugestiva. 4 Experiencia clínica 5 Evidencia insuficiente para emitir una opinión	

Es incontrovertible el tratamiento erradicador en la úlcera péptica porque la desaparición del microorganismo se asocia con una aceleración de la cicatrización ulcerosa, una reducción de las recidivas ulcerosas, la prevención de las recidivas hemorrágicas y, como consecuencia de todo ello, una reducción del coste económico (196).

Respecto al linfoma MALT, la demostración de que la infección por *H. pylori* es un hecho previo al desarrollo de linfoma (226), de que la incidencia de linfoma MALT se correlaciona estrechamente con la tasa de infección y de que la erradicación del microorganismo se sigue de la remisión histológica de los MALT de bajo grado, hacen de esta patología una indicación indiscutible de erradicación (227).

La evidencia científica sugiere también la erradicación en casos de gastritis graves con anomalías macroscópicas (gastritis erosiva grave no asociadas al consumo de fármacos gastroerosivos) y microscópicas (metaplasia intestinal, atrofia, displasia y gastritis hipertróficas), así como tras la resección de un carcinoma gástrico precoz (228), si bien se precisan más estudios para establecer definitivamente la indicación en estos casos.

8.3. Pautas de tratamiento

8.3.1. Dobles terapias

Los beneficios de la doble terapia con omeprazol y amoxicilina (escasos efectos secundarios y pocos comprimidos al día) se ven reducidos por sus desventajas (requieren una duración de dos semanas, es un tratamiento caro y con escasa eficacia).

La combinación de omeprazol con claritromicina, aunque consigue mejores tasas de erradicación, se asocia a más efectos secundarios y es considerablemente más cara. Este régimen incrementa además la posibilidad de desarrollar resistencia a claritromicina.

Por tanto, actualmente no se recomienda el empleo de monoterapias ni dobles terapias en la infección por *H. pylori*.

8.3.2. Triple terapia clásica

La triple terapia clásica se compone de la combinación de bismuto coloidal, metronidazol (o tinidazol) y tetraciclina (o amoxicilina). La tasa de erradicación de esta pauta depende de la sensibilidad de la cepa a metronidazol. En regiones con alta tasa de resistencia primaria a metronidazol se recomienda la sustitución de éste por claritromicina, obteniéndose resultados similares.

Los principales inconvenientes de esta pauta son la posibilidad de resistencia a los nitroimidazoles (42) y el frecuente abandono del tratamiento (229), motivado por el elevado número de comprimidos diarios y la frecuencia de efectos secundarios, que hacen difícil su cumplimiento.

En España, la eficacia se sitúa en torno al 75-80% tras cuatro semanas de tratamiento, disminuyendo al 65-70% cuando se emplea amoxicilina en lugar de tetraciclina, y al 45% si la cepa es resistente a metronidazol (230).

8.3.3. Inhibidores de la bomba de protones (IBP) y dos antibióticos

Las ventajas de estas combinaciones son su elevada eficacia erradicadora, la facilidad de seguimiento por parte del paciente (al administrarse una o dos veces al día, durante una semana) y los escasos efectos secundarios asociados.

La triple terapia más empleada en España es la que asocia un IBP con amoxicilina y claritromicina (OCA) durante una semana, lográndose una eficacia mayor del 80% (231). Otras pautas comprenden la asociación de omeprazol, claritromicina y un nitroimidazol, o bien, omeprazol, amoxicilina y nitroimidazol, siendo satisfactorios sus resultados. La resistencia a metronidazol no parece influir negativamente en la respuesta a las terapias triples que incluyen claritromicina. La sustitución de omeprazol por lansoprazol o pantoprazol a dosis equivalentes se asocia a tasas de erradicación cercanas al 90% (232).

La ventaja de la pauta OCA sobre la que utiliza nitroimidazoles es la escasa resistencia a amoxicilina, lo que previene el desarrollo de resistencias secundarias tras un eventual fracaso terapéutico (233).

8.3.4. Ranitidina citrato de bismuto y antibióticos

La ranitidina citrato de bismuto (RCB) es un fármaco supresor de ácido, protector de la mucosa y con propiedades anti*Helicobacter pylori*.

En 1997, en la Xª Reunión del Grupo Europeo para el estudio de *H. pylori* se presentaron por primera vez distintos trabajos que ponían de manifiesto la equivalencia de RCB e IBP en la triple terapia frente a este microorganismo. En la Conferencia de Asia Pacífico, se introdujo como alternativa válida de tratamiento la triple terapia con RCB, en sustitución de IBP (234).

La RCB se ha empleado ampliamente en doble terapia (asociada a un antibiótico durante 14 días) o en triple terapia (asociada a 2 antibióticos durante 7 días). La eficacia de la doble terapia con RCB y claritromicina empleada durante 14 días es variable, cifrándose en un 70-86% en estudios realizados en Estados Unidos y en un 82-96% en estudios europeos (235).

En un estudio multicéntrico realizado en el norte de Europa, sobre pacientes dispépticos con infección por *H. pylori*, se hallaron tasas de erradicación cercanas al 90% con RCB-claritromicina en doble terapia durante 14 días, en intención de tratamiento (236). En Italia, Cestari obtiene una tasa de curación de la infección del 67% al emplear la doble terapia, también en intención de tratamiento ($p=0.001$) (237).

El empleo de RCB en doble terapia, asociado a claritromicina, ha demostrado ser más eficaz, de forma significativa, que la doble terapia con IBP (238). Este hecho podría deberse al efecto sinérgico entre RCB y claritromicina frente a *H. pylori*.

Los resultados al emplear RCB en triple terapia son mejores que en doble terapia, sobrepasando el 85% (236, 237). En triple terapia, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre la terapia con omeprazol y con RCB. Así, Spadaccini (239) logra una eficacia similar con ambos fármacos asociados a claritromicina y tinidazol. Sung (240), asociando amoxicilina y claritromicina a RCB en pacientes ulcerosos, logra la misma eficacia que al emplear dicha pauta antibiótica asociada a IBP. Ravizza (241) tampoco halla diferencias entre las pautas triples que incluyen RCB y las que incluyen omeprazol.

8.3.5. Cuádruple terapia

La cuádruple terapia con IBP, subcitrate de bismuto, tetraciclina y metronidazol, durante una semana, constituye el tratamiento de elección como rescate cuando ha fracasado un primer intento erradicador (203, 204). Esta terapia logra la curación de la infección en el 98% de los pacientes, reduciéndose la eficacia al 80% en los pacientes con fracaso previo a alguna terapia. La asociación de omeprazol, bismuto, amoxicilina y metronidazol consigue resultados algo inferiores.

8.4. Factores relacionados con la eficacia terapéutica frente a H. pylori

8.4.1. Relacionados con el fármaco:

- a) Concentración que alcanza el fármaco en la mucosa gástrica: El pH gástrico sufre variaciones durante el día, siendo diferente en las distintas zonas del estómago (36). Esto ocasiona que la concentración de los fármacos a nivel gástrico no sea homogénea. La formulación de los fármacos también es otro factor que influye en la concentración.
- b) Estabilidad del fármaco frente al pH ácido gástrico.
- c) Frecuencia, dosis y duración del tratamiento.
- d) Administración con la ingesta, que aumenta el tiempo de contacto del fármaco con la mucosa gástrica, ayudando a su acción local.
- e) Uso junto a antiseoretos: los antiseoretos actúan disminuyendo el volumen intragástrico, aumentando la concentración de los antibióticos y aumentando el pH gástrico. Al aumentar la concentración de los antimicrobianos se alcanza más fácilmente la CMI de *H. pylori*. El omeprazol, además, tiene un efecto aditivo a los antibióticos, aumentando la efectividad de éstos (51).
- f) pH: la susceptibilidad de *H. pylori* a amoxicilina, eritromicina y claritromicina es menor a pH ácido que a pH neutro. La actividad bactericida de metronidazol y tetraciclina no se modifica con el pH (242).

8.4.2. *Relacionados con el paciente*

Es importante el cumplimiento de la terapia por parte del paciente, ya que su incumplimiento aumenta las tasas de resistencia.

8.4.3. *Relacionados con el microorganismo*

- a) Resistencia adquirida: la resistencia adquirida se debe al consumo de antibióticos en la comunidad para el tratamiento de diversas infecciones, principalmente ginecológicas y respiratorias.
- b) Fenómeno de biofilm: las bacterias adheridas al epitelio gástrico son menos sensibles al antibiótico que las que se encuentran en el moco gástrico (51).
- c) Carga bacteriana o inóculo: la densidad bacteriana a nivel de la mucosa gástrica es un factor importante que influye en la erradicación de *H. pylori*. A mayor carga bacteriana existirá estadísticamente más probabilidad de que aparezca una mutación responsable de la resistencia (243).
- d) Nicho ecológico: El antibiótico tiene mayor acción sobre las bacterias que están en el moco que sobre las situadas en el interior de las criptas glandulares o intraepiteliales.
- e) Genotipo: la presencia de cepas *cagA*- en pacientes dispépticos se asocia, significativamente, a un mayor riesgo de fracaso terapéutico (244).

II.- Objetivos

El aumento progresivo en la tasa de resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos conlleva al fracaso en la curación de su infección y a la necesidad de utilizar pautas más complejas con estos fines. El retratamiento exige el empleo de un mayor número de fármacos o la prolongación de la terapia, lo que redundaría en un mayor coste económico y en la posibilidad de efectos adversos.

Los hallazgos actuales sugieren que el mecanismo de adquisición de resistencias por *H. pylori* es genético, principalmente a través de mutaciones cromosómicas. La resistencia a los nitroimidazoles parece originarse por una mutación en el gen que codifica la NADPH nitrorreductasa de la bacteria, enzima necesaria para la reducción del grupo nitro del metronidazol y responsable de su activación.

Se ha descrito que *H. pylori* puede adquirir resistencia a los macrólidos a través de mutaciones puntuales en el gen 23rRNA, concretamente en el dominio V de la peptidiltransferasa. Estas mutaciones impedirían la unión de estos fármacos a los ribosomas bacterianos, al modificarse los puntos de unión a ellos, evitándose, así, su acción farmacológica.

El mecanismo de resistencia a amoxicilina no está suficientemente contrastado. Diferentes investigaciones sugieren que se debe al defecto de una de las proteínas de unión a este fármaco (concretamente la PBP-D, de 32 kD). Otros autores han observado que la permeabilidad de la membrana para dichos antibióticos está disminuida en las cepas resistentes.

No obstante, es posible que existan otros factores que puedan condicionar la resistencia, entre los que podríamos citar:

- a) La presencia de una gran carga bacteriana en la mucosa. La mayor densidad bacteriana aumentaría tanto la probabilidad de mutaciones naturales, provocadas por la rápida multiplicación de los microorganismos, como la selección de cepas resistentes.
- b) La situación de las bacterias en la mucosa gástrica. Los fármacos tendrían menor accesibilidad a las bacterias situadas en nichos o en la profundidad de las glándulas. Los microorganismos podrían adquirir resistencia como un mecanismo de adaptación a las bajas concentraciones farmacológicas a las que estarían expuestos.
- c) El genotipo bacteriano. Se ha observado la existencia de una menor eficacia farmacológica en las cepas no toxigénicas (status *cagA* negativo). La menor eficacia podría deberse a la asociación de estos genotipos con la resistencia a los antimicrobianos.

Teniendo presente lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es el análisis de aquellos factores que pueden condicionar la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos.

Serán objeto de análisis:

1. Las características de la población de estudio: edad, sexo, frecuencia de las lesiones gastroduodenales observadas endoscópica e histológicamente, frecuencia del consumo de tabaco, antibióticos y AINES y del tratamiento erradicador previo frente a *H.pylori*.
2. La prevalencia de la resistencia primaria y secundaria de *H. pylori* a los antimicrobianos en nuestro medio.
3. El estudio de la resistencia en función de las variables epidemiológicas de los individuos de la muestra.
4. La relación entre la densidad bacteriana en la mucosa gástrica y la resistencia a los antibióticos.
5. La profundidad que alcanza *H. pylori* en el estrato de la mucosa como condicionante en la sensibilidad a los antibióticos.
6. El fenotipo bacteriano (CagA y VacA) y su implicación en la resistencia a los antimicrobianos.

III.- Material y Métodos

Para responder a nuestro objetivo diseñamos un estudio transversal de tipo observacional descriptivo.

La población objeto de estudio se componía de 88 individuos con infección por *H. pylori*, remitidos a la Unidad de Endoscopia del Hospital Universitario Virgen Macarena entre Julio de 1999 y Julio de 2000, para la realización de una gastroscopia de forma programada. Se consideró diagnóstico de infección por *H. pylori* la positividad del cultivo de la bacteria o la positividad de dos o más de las siguientes pruebas: test de la ureasa rápida, histología, test del aliento o serología (245).

El muestreo se realizó por conveniencia, siendo voluntaria la incorporación de los sujetos al estudio, previa petición de consentimiento informado. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Virgen Macarena.

Se excluyeron del estudio los sujetos con hemorragia digestiva alta activa en el momento de la realización de la endoscopia y aquéllos con mala tolerancia a la prueba diagnóstica.

Podemos identificar cinco etapas en el desarrollo del presente trabajo de investigación:

1. Cumplimentación de una encuesta.
2. Toma de muestras de mucosa gástrica y su posterior procesamiento.
3. Extracción de una muestra de sangre de cada sujeto para la determinación serológica del fenotipo bacteriano.
4. Realización de un test del aliento a cada sujeto.
5. Recogida de datos y procesamiento estadístico de ellos.

1. Cumplimentación de una encuesta

A todos los sujetos se les solicitó la autocumplimentación de una encuesta antes de la realización de la endoscopia. En ella se registró la edad, el sexo, el consumo de tabaco, antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos, el antecedente de hemorragia digestiva alta, el antecedente de tratamiento frente a *H. pylori* y la sintomatología digestiva que presentaban.

2. Toma de muestras de mucosa gástrica y su posterior procesamiento

Todos los sujetos fueron sometidos a una gastroscopia y toma de biopsias de mucosa gástrica, siendo procesadas según la siguiente metodología:

2.1. Endoscopia y toma de biopsias

Las endoscopias fueron realizadas con videogastros copios Olympus® de la serie 110 y Fuji®. La descripción de las lesiones gastro duodenales se realizó según la terminología "Minimal Standard Terminology in Digestive Endoscopy" (246).

Las biopsias se tomaron con pinzas de biopsias serie 24K de Olympus®. Se tomaron 6 biopsias gástricas en cada paciente:

- Una de antro para cultivo y determinación de la CMI de los antimicrobianos.
- Una de antro para el test de la ureasa rápida.
- Una de antro y otra de cuerpo para estudio histológico.
- Una de antro y otra de cuerpo para estudio morfométrico.

2.2. Cultivo y antibiograma

Las muestras para cultivo se remitieron en tubos con suero salino mantenido a 4°C hasta su utilización, y se procesaron en el laboratorio en menos de una hora desde su obtención, por lo que no fue preciso la utilización de un medio de transporte.

Las muestras se sembraron inmediatamente en un medio selectivo (medio Dent Oxoid®) y otro no selectivo (agar chocolate Biomerieux®) y se incubaron en microaerofilia a 35°C (CampyGen, Oxoid®), durante siete días. El medio Dent se preparó con 500 ml de agar sangre Columbia base con suplemento de antibióticos (vial de 2 ml de agua destilada estéril con los siguientes antibióticos disueltos: vancomicina 5 mg, lactato de trimetoprim 2.5 mg, cefsulodín 2.5 mg, anfotericina B 2.5 mg), adicionado con 35 ml de sangre de caballo lacada.

Además se realizó una tinción de Gram modificada, empleando fucsina como contracolorante, en la cuál *H. pylori* aparece como bacilos gramnegativos espiralares. Las bacterias fueron identificadas mediante morfología de la colonia, tinción de Gram, producción de catalasa, ureasa y oxidasa.

La determinación de la CMI se realizó mediante el método de difusión en agar con tiras de E-test (AB Biodisk, Suecia®). Como inóculo se empleó una suspensión en suero fisiológico de bacterias crecidas durante tres días en agar chocolate, correspondiente a una densidad 2 de McFarland (1×10^7 - 1×10^8 ufc/ml). El medio empleado en el antibiograma fue Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero.

Las placas se inocularon con una torunda impregnada con el inóculo y después de 15 minutos de absorción, se colocaron tiras de E-test de los siguientes antimicrobianos: amoxicilina, metronidazol, claritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina. Las placas se incubaron en microaerofilia a 35° C durante 3 días. La lectura de la CMI se hizo en el punto de completa inhibición del crecimiento, incluyendo colonias aisladas o crecimiento residual.

Los puntos de corte (mg/l) empleados fueron: claritromicina ≥ 1 , metronidazol >8 , ciprofloxacino >4 , tetraciclina >2 y amoxicilina >4 .

2.3. Prueba de la ureasa

Como método de rápido diagnóstico de la infección por *H. pylori* se empleó la prueba de la ureasa. El test comercial utilizado fue Jatrox-HP®. Se consideraron positivas las muestras que viraron de color en las primeras 24 horas.

2.4. Estudio histológico

Las muestras de antro y cuerpo fueron conservadas en formol al 10% antes de su procesamiento. Según la técnica habitual, fueron fijadas y teñidas con hematoxilina-eosina y giemsa. La identificación de *H. pylori* se llevó a cabo mediante observación al microscopio de las biopsias teñidas con giemsa.

Los hallazgos histológicos fueron revisados por un patólogo experto, siendo clasificados según los criterios de Houston (156):

1. Sin hallazgos
2. Gastritis crónica no atrófica
3. Gastritis crónica atrófica
4. Actividad neutrofílica
5. Actividad inmunológica
6. Metaplasia intestinal

2.5. Estudio morfométrico

De las muestras de biopsia del cuerpo y del antro gástrico, obtenidas por endoscopia, se obtuvieron cortes de 3 micras de espesor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y giemsa, al objeto de analizar la presencia de *H. pylori*.

Las preparaciones histológicas fueron codificadas de manera que el observador no dispusiera de ningún dato referente al paciente del que provenían. El código de las biopsias incluía el número del paciente, la zona del estómago de donde procedía la biopsia y la tinción.

2.5.1. Valoración semicuantitativa de la densidad y la profundidad de la infección por H. pylori

Las muestras histológicas fueron analizadas con microscopía óptica. A 100 aumentos, se eligió la zona mejor orientada y se estableció de modo subjetivo la densidad de la infección por *H. pylori* y la profundidad hasta la cuál se observaba el germen, siguiendo la escala analógica visual descrita en Houston (156).

Densidad

Se utilizó una escala de 5 grados (0-4) para la estimación de la densidad de gérmenes, según el siguiente criterio:

0. Ausencia de gérmenes
1. Gérmenes escasos
2. Gérmenes frecuentes
3. Gérmenes abundantes
4. Gérmenes muy abundantes, formando nichos o microabscesos

Profundidad

Se estimó la profundidad hasta la que accedía la bacteria en función de la siguiente escala:

0. Ausencia de gérmenes
1. Gérmenes en el epitelio superficial de las criptas, sin que progresen al interior de las mismas
2. Gérmenes visibles en las criptas superficiales, en toda su longitud hasta el cuello glandular
3. Gérmenes presentes en las glándulas profundas, más abajo de los cuellos glandulares

Situaciones especiales

En este apartado se describió la presencia de gérmenes en zonas de metaplasia intestinal o en contigüidad con las células parietales del cuerpo gástrico, situaciones que inicialmente no eran previsibles.

2.5.2. Valoración automática de la densidad

De cada muestra se eligieron dos imágenes a 400 aumentos que fueron digitalizadas para su posterior análisis automático. Las imágenes seleccionadas fueron captadas por una cámara de televisión acoplada al microscopio y transmitidas en modo RGB a una estación de trabajo analizadora de imágenes.

El analizador de imágenes dispone de una tarjeta digitalizadora (frame grabber) IMAGING, en color de alta resolución, que sirve a un monitor digital de 21 pulgadas con una resolución de hasta 2100 X 1600 puntos. Las imágenes fueron digitalizadas en un formato de 768 X 512 píxeles y 65 píxeles de cabecera en modo monocromo de 8 bits de profundidad.

Estas imágenes fueron codificadas y archivadas en un disco magneto-óptico en subdirectorios específicos según se tratara de imágenes del cuerpo o del antro y, dentro de cada uno de estos directorios, separadas por el tipo de tinción (H-E y giemsa).

Con posterioridad, se procedió al análisis automático de las imágenes grabadas. Se utilizó para ello una estación de trabajo que dispone de un PC con procesador Intel® Pentium III a 800 MHz y 128 MB de RAM. Para este cometido se utilizó el programa VISILOG 5.0 (Noesis®, Canadá) bajo Windows 98. Se escribieron macrorrutinas en lenguaje C para la automatización del proceso. El programa definitivo consta de las siguientes etapas:

1. Lectura de las imágenes archivadas en el directorio de trabajo.
2. Apertura de un fichero de texto para incorporación de las variables resultantes del procesado.
3. Importación desde el disco de la imagen a analizar y paso al buffer de la tarjeta gráfica, previa traducción del formato de grabación.
4. Copia de la imagen original en una imagen de trabajo (IMA1).
5. Regulación interactiva de las condiciones de iluminación, brillo, contraste y zoom de la imagen original al nivel óptimo de visualización.
6. Delimitación manual del área glandular para crear una imagen binaria que contenga sólo la luz glandular (MASK1).
7. Incorporación de la imagen gris original a la máscara binaria (MASK1) obtenida en el paso anterior. De esta manera se consigue una imagen que sólo contiene la luz glandular (GLAND1) y, dentro de ella, los gérmenes.
8. Discriminación en función del nivel de gris de la imagen con el fin de seleccionar y posteriormente extraer de la imagen GLAND1 las estructuras que corresponden a los gérmenes (HP1).
9. Cálculo del área de la imagen MASK1 expresado en píxeles (ARGLAND).
10. Cálculo del área de la imagen HP1 (ARHP).
11. Cálculo del número de estructuras independientes en la imagen HP1 (NUMHP).
12. Incorporación de las variables ARGLAND, ARHP y NUMHP al fichero de resultados.
13. Borrado de todas las imágenes del análisis y puesta a cero de las variables numéricas para empezar el proceso de una nueva imagen. Este proceso iterativo (LOOPIMAGE) se repite hasta que se completa el análisis de todo el subdirectorío de trabajo de imágenes.
14. Cada nuevo set de variables, correspondiente a una imagen procesada, se añade al fichero de resultados.

15. El fichero de resultados es incorporado a EXCEL 2000 como fichero de texto codificado. En este programa se calcula, como porcentaje, la densidad de *H. pylori* en una glándula en función de la siguiente fórmula:

$$\text{DENSIDAD} = (\text{ARHP} * 100) / \text{ARGLAND}$$

Los parámetros DENSIDAD y NUMHP se incorporan a la base de datos final para su análisis estadístico.

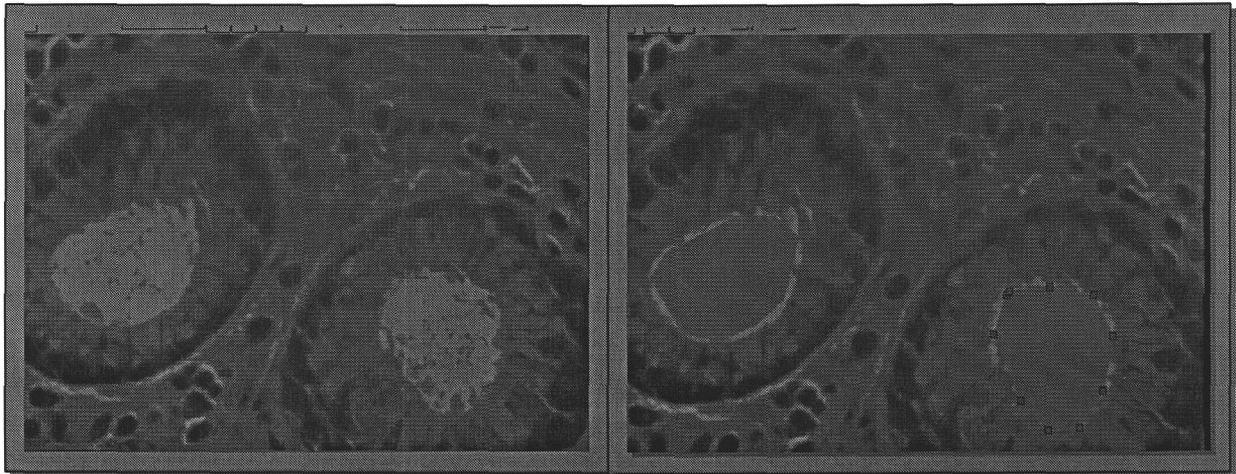


Figura 1.- Cálculo del área glandular

3. Determinación de anticuerpos IgG y del fenotipo bacteriano

A cada sujeto se le extrajo una muestra de sangre para la determinación de anticuerpos IgG frente a *H. pylori* y la identificación de anticuerpos frente a las proteínas CagA y VacA de *H. pylori* en suero. Se empleó para ello el test comercial RIDA® Blot Helicobacter, que consiste en un ensayo tipo Western Blot cualitativo *in vitro* para la identificación de anticuerpos frente a *H. pylori*. Este test permite identificar anticuerpos frente a distintas proteínas de *H. pylori*: cagA, vacA, ureA, ureB y flagelina.

4. Realización de un test del aliento (UBT)

Los sujetos del estudio fueron sometidos a un test del aliento con urea marcada con carbono isotópico ^{13}C , medido mediante espectrometría de masas. Se empleó el test comercial Taukit®. Se consideró positiva la prueba cuando la diferencia entre la muestra postdosis y la basal fue 5‰ (átomos de exceso).

5. *Análisis estadístico de los datos*

Tamaño muestral

Estimamos el tamaño muestral mínimo en 34 pacientes por grupo (sensibilidad, resistencia). Fijamos un error α del 5% y un error β del 20% (potencia del 80%) y obtuvimos un tamaño muestral global de 68 pacientes. El tipo de contraste de hipótesis utilizado para la obtención de este tamaño muestral fue bilateral, e hicimos uso de los métodos de cálculo de tamaños muestrales para la comparación de dos proporciones (sensibilidad-resistencia) en C categorías de la densidad bacteriana gástrica (escaso, frecuente, abundante) y de la profundidad (conducto glandular superficial, cuello glandular, glándula profunda).

El tamaño global de la muestra se incrementó hasta 88, al preverse, aproximadamente, un 20% de pérdidas (pacientes a los que no se les realizaría alguna prueba).

El paquete utilizado para la determinación de este tamaño de muestra fue el nQuery Advisor 4.0 del año 2000.

Análisis estadístico de los datos

Para la elaboración del análisis estadístico de los datos se procedió a la realización de las siguientes actividades:

- a) Depuración estadística de los datos: se realizó una verificación de la consistencia de la información previa a la introducción de los datos cuantitativos y durante la misma. Posteriormente, se completó mediante una exploración estadística, con métodos gráficos y analíticos que permitieran la detección de posibles observaciones aberrantes.
- b) Análisis descriptivo: se determinaron medias y varianzas de las variables cuantitativas. Para las cualitativas, realizamos tablas de frecuencias. Cuando se consideró oportuno, se construyeron representaciones gráficas al objeto de clarificar los resultados.
- c) Comparación de proporciones: para todas aquellas variables de tipo cualitativo, utilizamos el test de la Chi-cuadrado o test exacto de Fisher (tablas 2x2 poco pobladas).
- d) Comparación de medias: para la información de tipo cuantitativo, empleamos tests de comparación de medias, t-Student, U de Mann-Whitney y ANOVA.

Determinamos, siempre que fue posible, intervalos de confianza para diferencias de medias al 95%.

IV.- Resultados

1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Se incluyeron en el estudio a 88 sujetos con infección por *H. pylori*. Se consideró la existencia de infección por este microorganismo cuando el cultivo de la bacteria fue positivo o bien cuando 2 de las siguientes pruebas diagnósticas fueron positivas: test de la ureasa rápida, histología, serología o test del aliento. A continuación se engloban, sin separación, los datos referentes a los sujetos y a las bacterias.

1.1. Edad

La edad media de los 88 sujetos estudiados fue de 44 años, estando comprendida la edad de todos los individuos entre los 20 y los 80 años.

1.2. Distribución por sexo

El 60% de los sujetos estudiados eran varones y el 40%, mujeres.

1.3. Características de los individuos

Se realizó una estratificación de la muestra objeto de estudio en base a cuatro criterios de discriminación:

- Que los sujetos fueran fumadores o no
- En función del consumo habitual de AINES
- En razón al uso frecuente de antibióticos
- y, por último, en relación a si habían sido tratados previamente frente a la infección por *H. pylori*

Tal y como se puede apreciar en la tabla 1, un 45% de los individuos estudiados eran fumadores, un 20% eran consumidores habituales de AINES, un 10% tomaban frecuentemente antibióticos, y un 23% habían sido tratados con anterioridad frente a la infección por *H. pylori*.

Tabla 1.- Características de los individuos

	Fumadores		Consumidores habituales de AINES		Consumidores frecuentes de antibiótico		Tratados frente a <i>Helicobacter pylori</i> .	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Si	40	45%	18	20%	9	10%	20	23%
No	48	55%	70	80%	79	90%	68	77%
Total	88	100%	88	100%	88	100%	88	100%

En los 20 sujetos tratados con anterioridad frente a la infección por *H. pylori* se comprobó la persistencia de la infección a los 2 meses de finalizar el tratamiento mediante un test del aliento. Los pacientes habían realizado tratamiento con una triple o cuádruple terapia. La triple terapia comprendía el tratamiento con ranitidina citrato de bismuto o un IBP (omeprazol, lansoprazol o pantoprazol), claritromicina y amoxicilina o metronidazol. La cuádruple terapia consistía en la asociación de omeprazol, bismuto, claritromicina y amoxicilina. La combinación más frecuente fue omeprazol (20 mg/12h), claritromicina (500 mg/12h) y amoxicilina (1 gr/8h) durante 10 días (OCA 10). Esta pauta fue realizada por el 20% de los tratados.

1.4. Diagnóstico endoscópico

A todos los sujetos se les realizó una endoscopia digestiva alta, con fines diagnósticos y para la toma de biopsias. La distribución de las lesiones endoscópicas en la población de estudio se muestra en la figura 2.

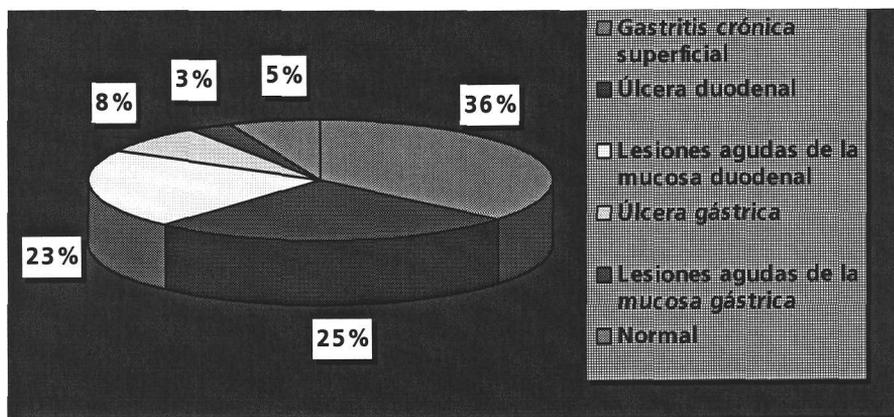


Figura 2.- Distribución de las lesiones gastroduodenales en los individuos

Las lesiones erosivas duodenales en su conjunto (úlceras duodenales y lesiones agudas de la mucosa duodenal) fueron el hallazgo más frecuente, estando presentes en el 48% (42/88) de los individuos. El segundo diagnóstico en frecuencia fue el de gastritis crónica superficial (36%, 32/88). En el 5% de los casos, la mucosa gastroduodenal presentaba un aspecto normal.

1.5. Diagnóstico histológico

Como se muestra en la figura 3, el patrón histológico más frecuentemente observado fue el de gastritis crónica no atrófica asociada a infiltrado neutrofilico, tanto en el antro como en el cuerpo gástrico. Además del infiltrado neutrofilico, existía infiltración linfocítica de la mucosa antral en el 18.2% de los individuos y, a nivel corporal, en el 11.8%. El patrón de normalidad en el antro sólo se halló en el

1% de los individuos, mientras que, en el cuerpo gástrico, fue un hallazgo más frecuente, estando presente en el 18% de los individuos.

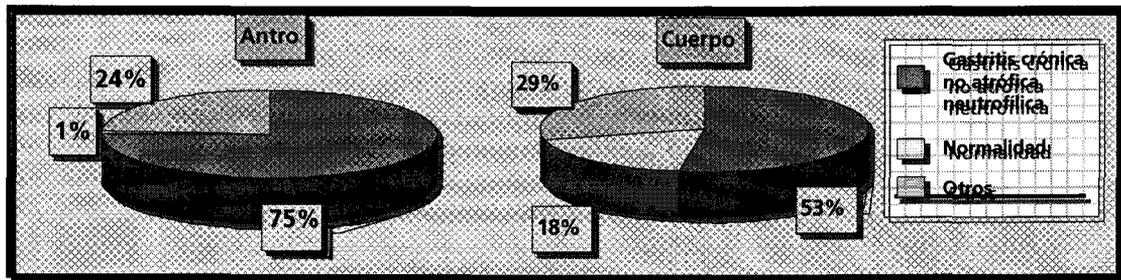


Figura 3.- Distribución de los hallazgos histológicos en los individuos

1.6. Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Se consideró diagnóstico de infección por *H. pylori* la positividad del cultivo de la bacteria o la positividad de dos o más de las siguientes pruebas: test de la ureasa rápida, histología, test del aliento o serología.

La sensibilidad del test de la ureasa rápida para diagnosticar la infección por *H. pylori* fue del 96%, de la serología del 89% y del estudio histológico del 95%. El test del aliento se consideró positivo cuando la diferencia entre la muestra postdosis y la basal fue 5‰ (átomos de exceso). Los valores oscilaron entre 7.92 y 88.96 átomos, siendo la sensibilidad del 91%. No existió correlación entre los valores del test del aliento y la densidad bacteriana en la mucosa gástrica estimada mediante el método semicuantitativo ($p=0.387$).

De los 88 sujetos con infección por *H. pylori* se logró cultivar el microorganismo en 82 (93%). En 6 casos (MV: 3/3) la tinción de gram y el cultivo de la bacteria fueron negativos. En 3 individuos todas las pruebas diagnósticas, excepto el cultivo, fueron positivas; en estos casos crecieron microorganismos contaminantes (presentes en la muestra) incluso en el medio de cultivo selectivo, lo que impidió la recuperación de *H. pylori*. En los otros 3 casos en los que fracasó el cultivo, sólo existió positividad para *H. pylori* en 2 pruebas diagnósticas (serología e histología en 2 individuos y test de la ureasa rápida e histología en un individuo). Los pacientes estaban diagnosticados de gastritis crónica superficial (4 sujetos) y úlcera duodenal (2 sujetos). Ninguno de ellos había realizado tratamiento previo frente a *H. pylori* ni eran consumidores frecuentes de antibióticos.

1.7. Prevalencia de la resistencia

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los diversos antimicrobianos se determinó tras el cultivo de una muestra de biopsia de antro gástrico de cada paciente. En los 82 casos en los que el cultivo fue positivo, se determinó la CMI mediante el método de difusión en agar con tiras de E-test.

El 50% de las cepas aisladas fueron sensibles a todos los antibióticos. El resto fueron resistentes a uno o varios antimicrobianos.

La prevalencia de la resistencia a metronidazol fue del 45% (37/82), a claritromicina del 15% (12/82) y a ciprofloxacino del 7% (6/82). No se hallaron resistencias a amoxicilina ni a tetraciclina. (Figura 4)

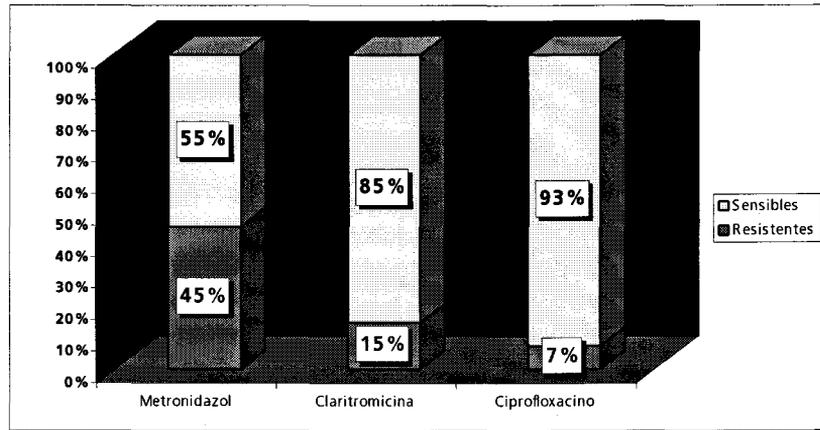


Figura 4.- Prevalencia de la resistencia de *H. pylori*

En el 13% (11/82) de los casos, las cepas presentaban resistencia a más de un antibiótico. La resistencia doble estaba presente en el 10% (8/82) de las cepas y la resistencia triple en el 4% (3/82). (Tabla 2).

Tabla 2.- Resistencia mixta

	n	Antimicrobianos
Resistencia Triple	3	metronidazol, claritromicina y ciprofloxacino
Resistencia Doble A	7	metronidazol y claritromicina
Resistencia Doble B	1	metronidazol y ciprofloxacino
Total	11	

El 91% (10/11) de los sujetos que presentaban multiresistencia habían sido tratados previamente frente a la infección por *H. pylori*, siendo las pautas realizadas más frecuentemente la asociación de omeprazol, claritromicina y amoxicilina durante 7 días y omeprazol, claritromicina y metronidazol durante 7 días. Todos los pacientes con resistencia triple (metronidazol, claritromicina y ciprofloxacino) y todos aquéllos con resistencia doble a metronidazol y claritromicina habían realizado tratamiento previo.

2. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS Y LA RESISTENCIA DE *H. pylori* A LOS ANTIMICROBIANOS

2.1. Edad

No se observaron diferencias en la edad media, entre el grupo de sujetos con infección por *H. pylori* resistente a alguno de los antibióticos, y el grupo con sensibilidad a todos los antibióticos.

2.2. Distribución por sexo

Estudiando la distribución de la resistencia en función del sexo, se observó que la infección por cepas resistentes a metronidazol fue significativamente más frecuente en mujeres que en hombres (59% vs 36%, $p= 0.032$). La infección por cepas resistentes a claritromicina y a ciprofloxacino también fue más frecuente en las mujeres que en los hombres, aunque sin observarse diferencias significativas. (Figura 5).

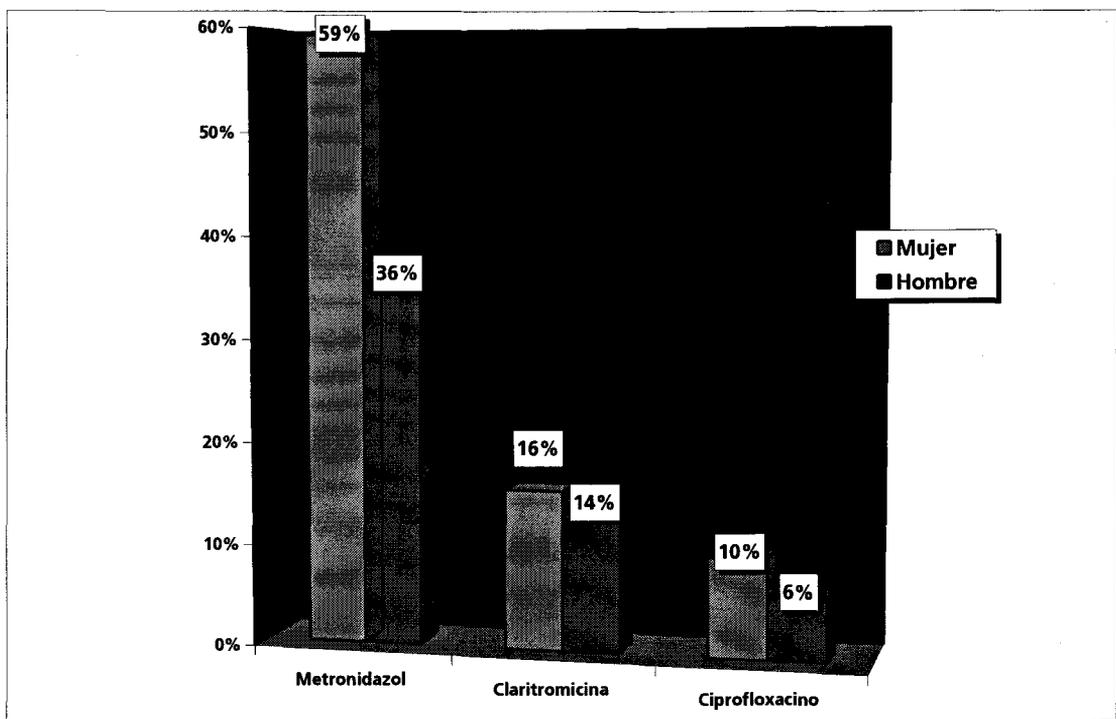


Figura 5.- Distribución por sexo de la resistencia a los distintos antimicrobianos.

2.3. Características de los individuos

Se estudió la asociación entre la sensibilidad y las distintas características que presentaban los sujetos en los que se pudo cultivar la bacteria ($n=82$), como el tabaquismo, el consumo habitual de AINES, el uso frecuente de antibióticos o el tratamiento erradicador previo.

Tal y como se puede apreciar en la tabla 3, tanto el tabaquismo como el consumo habitual de AINES y de antibióticos se observaron más frecuentemente entre los sujetos infectados por cepas resistentes que entre los sujetos con infección por cepas sensibles; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

Tabla 3.- Sensibilidad a los antimicrobianos según las características de los individuos.

		Fumadores		Consumidores frecuentes AINES		Consumidores antibióticos	
		%	n	%	n	%	n
MET	Resistente	59%	20	29%	10	14%	5
	Sensible	48%	20	17%	7	10%	4
CLAR	Resistente	75%	9	33%	4	25%	3
	Sensible	48%	31	20%	13	9%	6
CIPR	Resistente	83%	5	50%	3	17%	1
	Sensible	51%	35	20%	14	11%	8

El 23% de los sujetos de la población de estudio había realizado previamente tratamiento erradicador. En función de ello, se determinó la prevalencia primaria y secundaria de resistencia a los distintos fármacos.

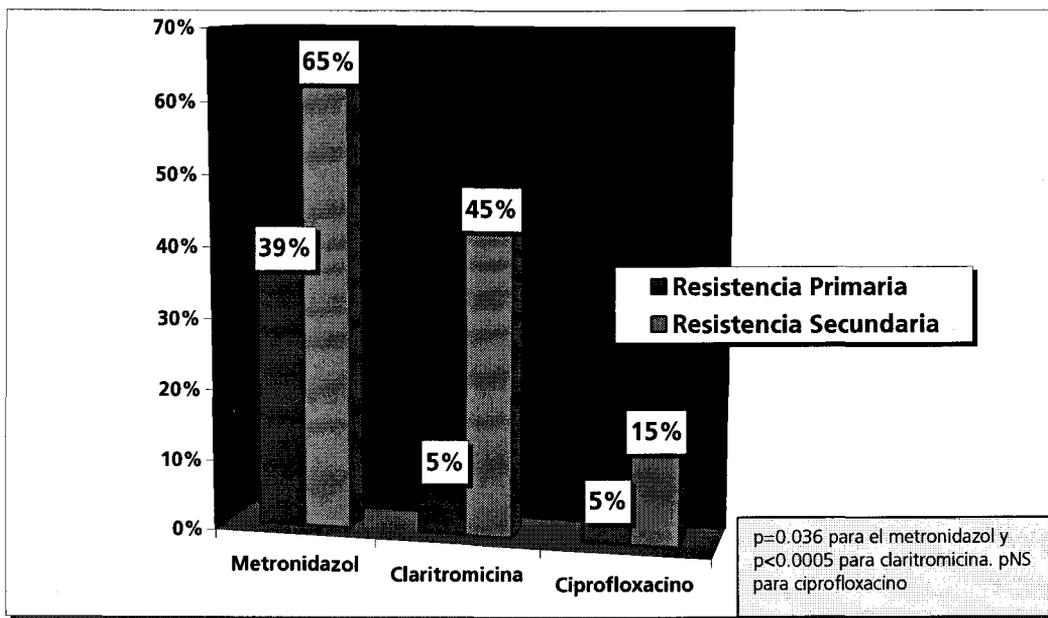


Figura 6.- Frecuencia de la resistencia primaria y secundaria de H. pylori.

Para el metronidazol, la tasa de resistencia primaria fue del 39% y la de resistencia secundaria del 65%, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.036$). La prevalencia de resistencia primaria a claritromicina fue del 5% y la de resistencia secundaria del 45%, siendo significativa esta diferencia ($p< 0.0005$). La tasa de resistencia a ciprofloxacino fue también mayor en los sujetos tratados

previamente que en los no tratados, aunque la diferencia observada no tuvo significación estadística (Figura 6). Se utilizó claritromicina en todas las pautas de tratamiento, siendo la pauta mayoritaria la compuesta por omeprazol, claritromicina y amoxicilina. Ninguna de las pautas realizadas contenían ciprofloxacino.

2.4. Diagnóstico endoscópico

Las lesiones en la mucosa gastroduodenal se distribuyeron de forma homogénea en el grupo con infección por cepas resistentes a algún antibiótico y en el grupo sensible a ellos. Las lesiones erosivas de la mucosa duodenal (úlceras y lesiones agudas de la mucosa) fueron el hallazgo más frecuente en ambos grupos (tabla 4).

Tabla 4.- Distribución de las lesiones en la mucosa gastroduodenal en función de la sensibilidad de las cepas de *H. Pylori*.

		Lesiones erosivas de la mucosa duodenal (1)		Lesiones erosivas de la mucosa gástrica (2)		Gastritis crónica superficial		Normalidad		Total
		n	%	n	%	n	%	n	%	
MET	Resistente	19	51%	5	14%	12	32%	1	3%	37
	Sensible	21	47%	5	11%	17	38%	2	4%	45
CLAR	Resistente	6	50%	0	0%	5	42%	1	8%	12
	Sensible	34	49%	10	14%	24	34%	2	3%	70
CIPR	Resistente	4	67%	0	0%	2	33%	0	0%	6
	Sensible	36	48%	10	13%	26	35%	3	4%	75

(1) Lesiones erosivas de la mucosa duodenal incluye úlcera duodenal y lesiones aguda de la mucosa duodenal.
 (2) Lesiones erosivas de la mucosa gástrica incluye úlcera gástrica y lesiones aguda de la mucosa gástrica.

2.5. Diagnóstico histológico

El patrón histológico predominante en los sujetos con infección por *H. pylori* fue el de gastritis crónica no atrófica neutrofílica, tanto en sujetos infectados por cepas sensibles a los antibióticos, como en los infectados por cepas resistentes a alguno de ellos.

Tabla 5.- Distribución de la resistencia en los individuos con metaplasia intestinal.

	n	Metronidazol		Claritromicina		Ciprofloxacino	
		Sensibles	Resistentes	Sensibles	Resistentes	Sensibles	Resistentes
MI antral	7	2	5	5	2	6	1
MI corporal	2	0	2	1	1	2	0

Se observó la presencia de metaplasia intestinal en el antro gástrico de 7 sujetos, estando presente en dos de ellos, además, en el cuerpo gástrico. En el 71% (5/7) de los sujetos con metaplasia intestinal se aislaron cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol. En el 43% (3/7) de los casos, existió multiresistencia. En 2 casos existió resistencia simultánea a metronidazol y claritromicina y en 1 caso, a metronidazol y ciprofloxacino. Sólo uno de los pacientes con multiresistencia (resistencia simultánea a metronidazol y claritromicina) había realizado tratamiento erradicador previo, con una pauta que contenía claritromicina y amoxicilina. No se observó relación estadísticamente significativa entre la presencia de metaplasia intestinal y la resistencia de las cepas a claritromicina (tabla 5).

3. RELACIÓN ENTRE LA DENSIDAD DE *H. pylori* EN LA MUCOSA GÁSTRICA Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

3.1. Densidad medida de forma semicuantitativa

La densidad bacteriana estimada de forma semicuantitativa fue definida como escasa, frecuente o abundante, siguiendo la clasificación de Houston (updated Sydney System) (156).

3.1.1. Densidad bacteriana en antro y cuerpo gástricos

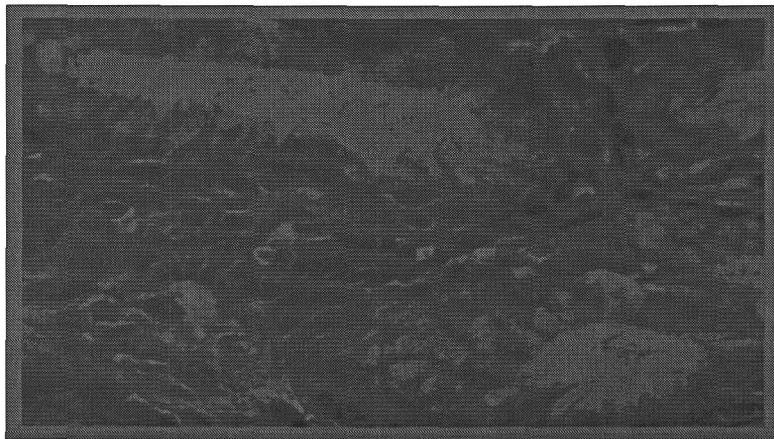


Figura 7.- Corte histológico de mucosa antral, donde se observan luces glandulares con *H. pylori* en su interior.

El patrón bacteriano prevalente en el antro gástrico fue el abundante (45% de las cepas sensibles y 63% de las resistentes a algún fármaco), mientras que en el cuerpo gástrico fue el frecuente (49% de las sensibles y 51% de las resistentes). No se pudo establecer la significación estadística de dicha prevalencia. (Figura 8).

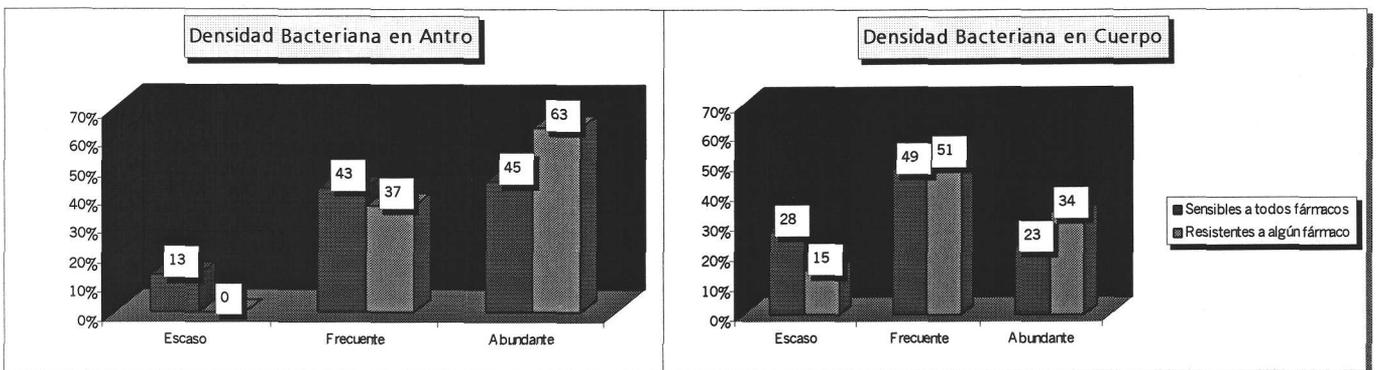


Figura 8.- Densidad bacteriana en antro y cuerpo.

3.1.2. Densidad bacteriana en antro y sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos

Como se refleja en la tabla 6, en ninguno de los casos infectados por cepas resistentes se observó una densidad bacteriana escasa a nivel del antro gástrico. A diferencia, en los casos infectados por cepas sensibles, la densidad escasa estaba presente, al menos, en el 7% de los sujetos.

El porcentaje de sujetos con densidad bacteriana abundante en antro fue mayor si la infección se debía a cepas resistentes que a sensibles, salvo para ciprofloxacino. No obstante, no se pudo conocer la significación estadística de dicha diferencia.

Tabla 6.- Densidad bacteriana en antro en relación a la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos

	Metronidazol				Claritromicina				Ciprofloxacino			
	Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Escasa	11%	5	0%	0	7%	5	0%	0	7%	5	0%	0
Frecuente	43%	19	35%	13	39%	27	42%	5	38%	28	50%	3
Abundante	46%	20	65%	24	54%	37	58%	7	55%	41	50%	3

3.1.3. Densidad bacteriana en cuerpo y sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos

En el cuerpo gástrico, el patrón bacteriano predominante fue el frecuente. No se observaron diferencias en la densidad bacteriana en función de la sensibilidad antimicrobiana a metronidazol y a claritromicina. En el caso de ciprofloxacino, el 50% de los sujetos infectados por bacterias resistentes a él presentaban una densidad abundante, frente al 27% de los infectados por bacterias sensibles a dicho antibiótico. (Tabla 7).

De forma global, no se observó relación entre la densidad bacteriana en el cuerpo gástrico y la resistencia a los antibióticos. ($p=0.5$)

Tabla 7.- Densidad bacteriana en cuerpo en relación a la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos

	Metronidazol				Claritromicina				Ciprofloxacino			
	Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Escasa	26%	11	16%	6	22%	15	17%	2	23%	17	0%	0
Frecuente	46%	20	54%	20	50%	34	50%	6	49%	36	50%	3
Abundante	28%	12	30%	11	28%	19	33%	4	27%	20	50%	3

3.2. Densidad estimada de forma automática

La densidad bacteriana media en antro, medida de forma automática, fue mayor que la densidad media en el cuerpo gástrico, sin que se observaran diferencias significativas (4.08 +/- 2.25 vs 3.78 +/- 2.49).

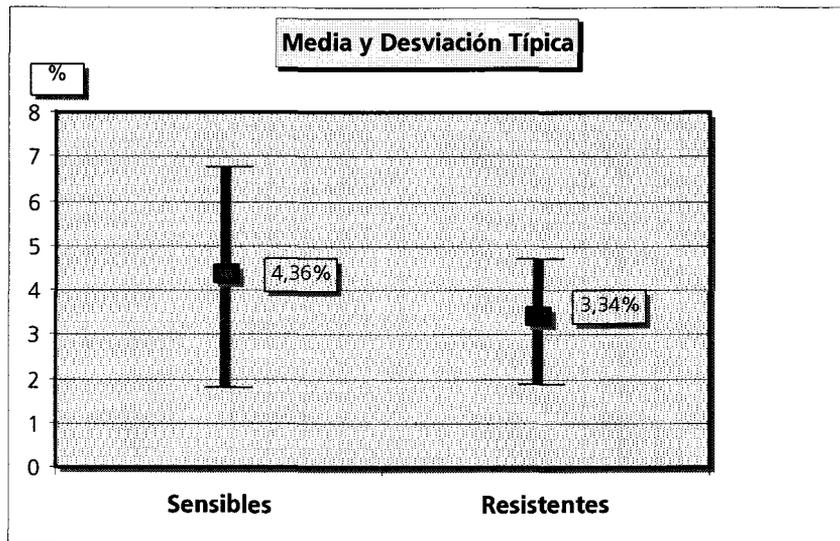


Figura 9.- Densidad bacteriana en antro, estimada mediante morfometría, en relación con la sensibilidad de las cepas a metronidazol.

En los sujetos infectados por cepas sensibles a metronidazol se obtuvo una densidad bacteriana de 4.36 +/- 2.46 y en los resistentes de 3.34 +/- 1.42. (p NS). (Fig. 9).

Reproducibilidad del método morfométrico automático

Para comprobar la reproducibilidad del método morfométrico automático, dos observadores repitieron en 3 momentos diferentes las mediciones en una muestra escogida aleatoriamente. No hubo diferencias significativas entre las distintas mediciones realizadas por cada observador (p=0.25 y p=0.2, respectivamente) ni entre las mediciones de los dos observadores (p=0.136).

4. RELACIÓN ENTRE LA PROFUNDIDAD DE *H. pylori* EN LA MUCOSA GÁSTRICA Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

4.1. Profundidad bacteriana en antro y cuerpo gástricos

La profundidad hasta la que accedían las bacterias en la mucosa gástrica fue estimada mediante valoración de los cortes histológicos. Definimos tres niveles en la glándula en función de la profundidad: conducto glandular superficial, cuello glandular y glándula profunda.

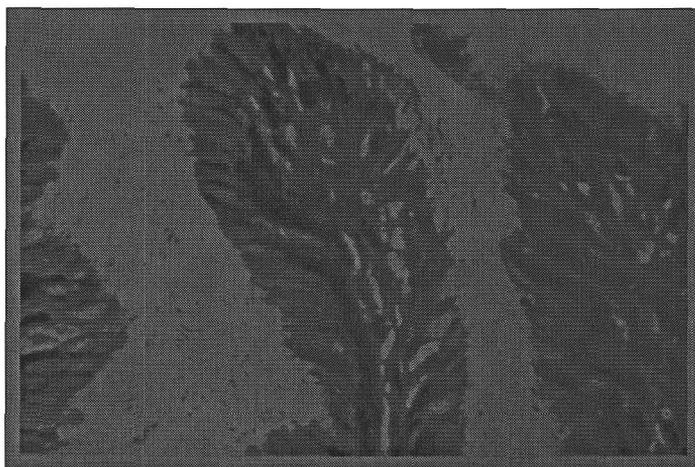


Figura 10.-Corte longitudinal de vellosidades gástricas. Entre ellas se dispone *H.pylori*.

Como se observa en la figura 11, en la mayoría de los casos, las bacterias se situaron en el cuello glandular, tanto en el antro (93% de las cepas sensibles y 80% de las resistentes a algún fármaco) como en el cuerpo gástrico (72% de las sensibles y 71% de las resistentes). La proporción de casos con infección en la glándula profunda fue mayor en el cuerpo que en el antro, sin que las diferencias observadas resultaran significativas.

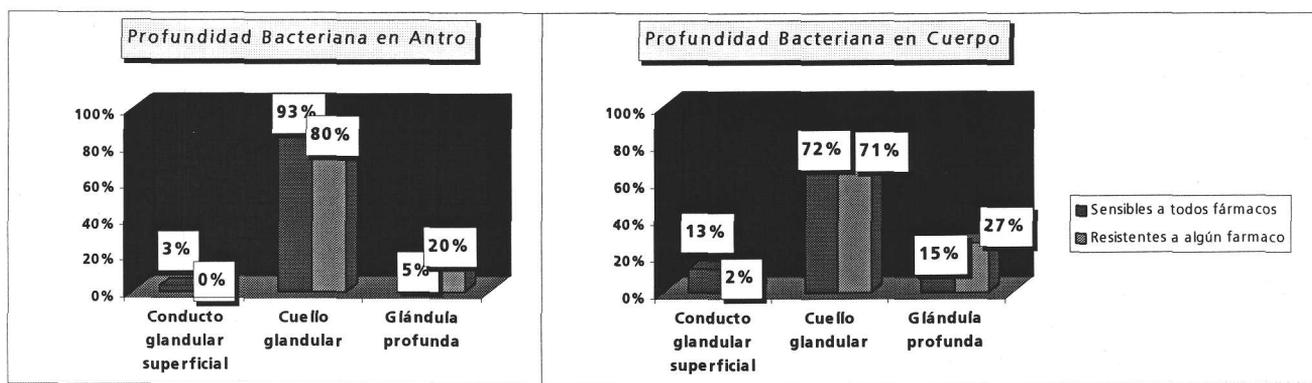


Figura 11.- Profundidad bacteriana en antro y cuerpo.

4.2. Profundidad bacteriana en antro y sensibilidad a los antibióticos

Se observaron bacterias en la profundidad de las glándulas del antro gástrico sólo en el 12% de los casos. En el 87% de los sujetos, las bacterias estaban situadas en la porción media de las glándulas, es decir, en los cuellos glandulares.

Analizando la profundidad a la que accedían las cepas, en relación a la sensibilidad de ellas, observamos que, aunque el porcentaje de casos con infección situada en la glándula profunda era mayor si la infección estaba producida por bacterias resistentes a alguno de los antibióticos, no existían diferencias significativas con respecto al grupo sensible ($p=0.07$). Como se muestra en la tabla 8, en todos los casos de infección por cepas resistentes las bacterias llegaron a regiones más profundas, más allá del conducto glandular superficial.

Tabla 8.- Profundidad bacteriana en el antro gástrico y sensibilidad a los antibióticos.

	Metronidazol				Claritromicina				Ciprofloxacino				Global			
	Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Conducto glandular superficial	2%	1	0%	0	1%	1	0%	0	1%	1	0%	0	3%	1	0%	0
Cuello glandular	91%	40	81%	30	88%	61	75%	9	87%	64	83%	5	93%	37	80%	33
Glándula profunda	7%	3	19%	7	10%	7	25%	3	12%	9	17%	1	5%	2	20%	8

4.3. Profundidad bacteriana en cuerpo y sensibilidad a los antibióticos

A nivel de la mucosa corporal gástrica, en el 72% de los individuos se encontraron cepas de *H. pylori* situadas en los cuellos glandulares, en el 20% en la profundidad glandular y, en el resto, en los conductos glandulares superficiales.

A semejanza de lo ocurrido en la mucosa del antro gástrico, la proporción de casos con microorganismos situados en la profundidad glandular fue mayor cuando la infección se debía a bacterias resistentes que a sensibles. No existieron, sin embargo, diferencias significativas. ($p=0.27$) (Tabla 9).

Tabla 9.- Profundidad bacteriana en el cuerpo gástrico y sensibilidad a los antibióticos.

	Metronidazol				Claritromicina				Ciprofloxacino				Global			
	Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes		Sensibles		Resistentes	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Conducto glandular superficial	11%	5	3%	1	9%	6	0%	0	8%	6	0%	0	13%	5	2%	1
Cuello glandular	70%	30	73%	27	71%	48	75%	9	71%	52	67%	4	72%	28	71%	29
Glándula profunda	19%	8	24%	9	21%	14	25%	3	21%	15	33%	2	15%	6	27%	11

5. FENOTIPO BACTERIANO Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La determinación de la presencia o ausencia de los anticuerpos frente a las proteínas CagA y VacA en el suero de los pacientes, reveló que el fenotipo CagA estaba presente en el 78.8% de las cepas aisladas y el fenotipo VacA en el 54.5%.

Se observó una mayor resistencia a metronidazol en las cepas CagA negativas y en las VacA negativas, mientras que la resistencia a claritromicina apareció con frecuencia superior en las cepas con fenotipo CagA positivo y en las VacA negativos. No obstante, las diferencias observadas en ambos casos no resultaron estadísticamente significativas. (Figuras 12 y 13).

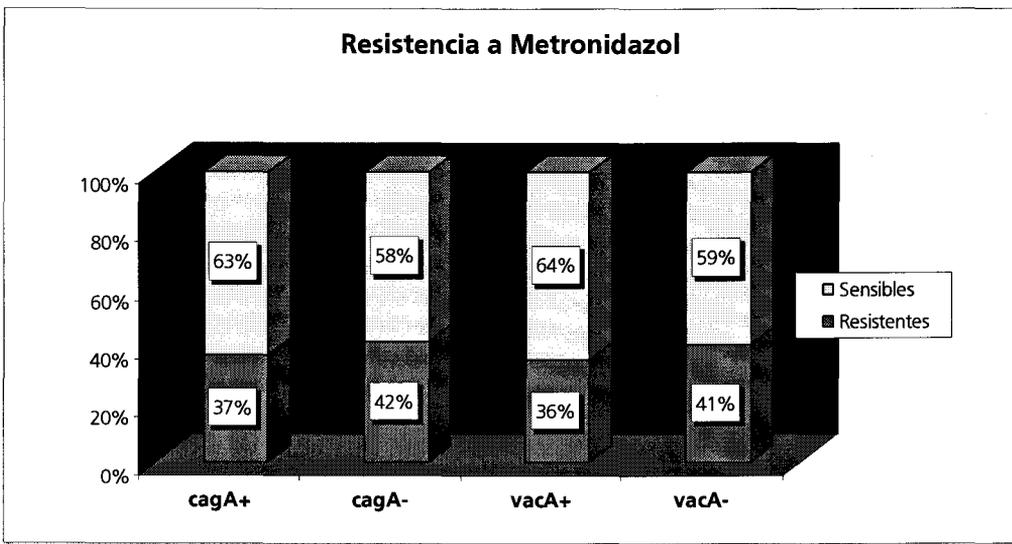


Figura 12.- Resistencia a metronidazol en función del fenotipo bacteriano.

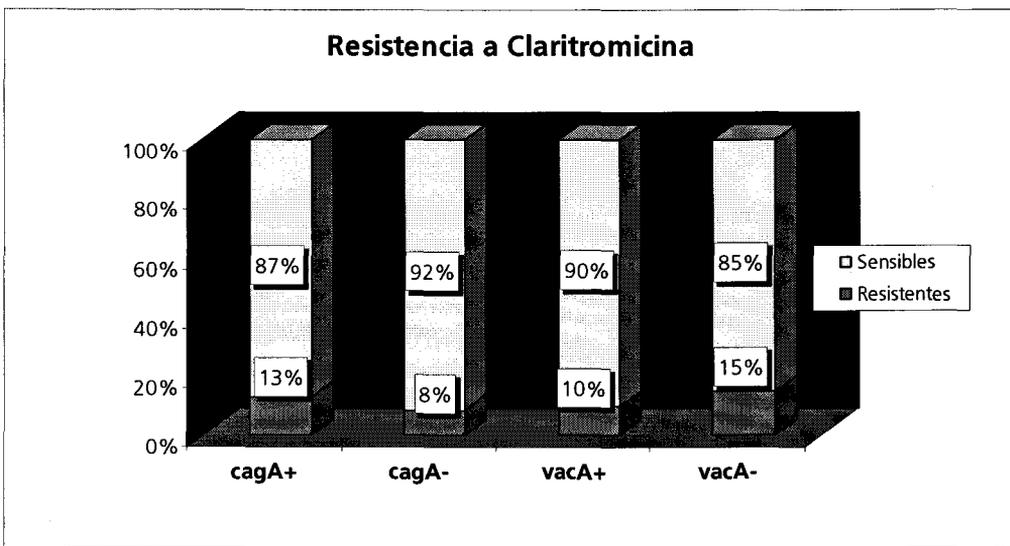


Figura 13.- Resistencia a claritromicina en función del fenotipo bacteriano.

V.- Discusión

El tratamiento de la infección por *H. pylori* ha supuesto una revolución en el campo de la gastroenterología, al conseguirse con él la curación definitiva de la úlcera péptica. La eliminación del microorganismo de la mucosa gástrica disminuye drásticamente el índice de recidiva de úlcera duodenal y previene las recidivas hemorrágicas ulcerosas. Por todo ello, el tratamiento erradicador constituye una creciente demanda. Con las pautas de tratamiento actuales (compuestas por la asociación de un IBP y dos antibióticos) se logra la erradicación del microorganismo en más del 80% de los casos, existiendo fracaso terapéutico en el resto de los pacientes tratados. Son múltiples los factores relacionados con el fallo terapéutico frente a *H. pylori*, destacando como factor predictivo más importante la presencia de resistencias a metronidazol y a claritromicina (36). Con el incremento progresivo de la prevalencia de resistencias de *H. pylori*, el beneficio obtenido con el tratamiento se ve comprometido. Cada vez es mayor el número de pacientes diagnosticados de infección por *H. pylori* con métodos no invasivos y tratados frente a ella por patologías no ulcerosas, de acuerdo con algunas guías terapéuticas publicadas (203), lo que está provocando que la resistencia tenga un mayor impacto clínico.

El tratamiento de la infección se realiza de forma empírica por lo que es esencial conocer la prevalencia local de resistencia de este microorganismo a los antibióticos. Las tasas de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos experimentan marcadas diferencias en función de la localización geográfica, siendo los datos obtenidos en otros países, o en otros puntos de España, difícilmente extrapolables.

Con estos antecedentes, nuestro primer objetivo al diseñar este trabajo fue conocer la prevalencia primaria y secundaria de resistencias en la población perteneciente a nuestra área hospitalaria.

Para el estudio de la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, procedimos al cultivo de las muestras gástricas de los 88 sujetos objeto de estudio. Para obtener una potencia estadística del 80% estimamos el tamaño muestral en 68 pacientes, si bien aumentamos la muestra hasta 88, al prever un 20% de pérdidas (pacientes que no se realizaran alguna prueba o cuyo cultivo fuera negativo). Exceptuando los estudios multicéntricos y las revisiones sistemáticas (247), que incluyen un gran número de pacientes, el número de pacientes estudiados en otras series ronda el centenar (248), si bien existen estudios que incluyen una muestra mayor (249, 250).

Se consideró diagnóstico de infección por *H. pylori* la positividad del cultivo del microorganismo o la positividad de 2 ó más de las siguientes pruebas diagnósticas: test de la ureasa rápida, histología, test del aliento o serología. Los métodos con mayor sensibilidad para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* fueron el test de la ureasa rápida (96%) y la histología (95%). La sensibilidad del cultivo fue del 93%, del test del aliento del 91% y de la serología del 89%.

La población de estudio la comprendieron 20 pacientes que habían sido tratados de la infección por *H. pylori* (fracasando el intento erradicador) y 68 pacientes que no habían recibido tratamiento previo. Las pautas de tratamiento recibidas por los 20 pacientes fueron la triple terapia con claritromicina y

amoxicilina o metronidazol o la cuádruple terapia (omeprazol, bismuto, claritromicina y amoxicilina). Todas las pautas contenían claritromicina. La combinación más frecuente fue OCA 10 (omeprazol 20 mg/12h, claritromicina 500 mg/12h y amoxicilina 1 g/8h durante 10 días), empleada en el 20 % de los sujetos.

El 48% de los individuos de la muestra presentaban lesiones en la mucosa duodenal (úlceras duodenales -25%- y lesiones agudas de la mucosa duodenal -23%-), el 36% gastritis crónica superficial y el 11% lesiones erosivas de la mucosa gástrica (úlceras gástricas -8%- y lesiones agudas de la mucosa gástrica -3%-).

1. PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA

El estudio debe comenzar con la preparación correcta del paciente antes de la toma de biopsias. Se requiere que el sujeto no esté expuesto a la acción de fármacos inhibidores de *H. pylori* que interfieran en su aislamiento. El tiempo óptimo de blanqueo debe ser de 28 días tras la toma de antibióticos (251), de 14 días tras el consumo de bismuto (252) y de 5 días tras el tratamiento con IBP (253). La localización de la biopsia no es crucial para el cultivo (254), ya que las paredes gástricas contactan entre sí tras el vaciamiento gástrico y la peristalsis permite la distribución del moco por las paredes y el lumen antral (255).

De cada paciente tomamos una muestra de antro para cultivo, según la metodología descrita en la literatura, aislándose *H. pylori* en las muestras de 82 sujetos (93% de las muestras sembradas). La tinción de gram y el cultivo fueron negativos en 6 sujetos. En 3 casos crecieron en el cultivo otras bacterias presentes en la muestra, impidiendo recuperar *H. pylori*, siendo los demás métodos (test de la ureasa rápida, serología, UBT e histología) positivos. En otros 2 individuos sólo se identificó la presencia de *H. pylori* mediante serología e histología, siendo el resto de las exploraciones diagnósticas negativas. Es posible que las bacterias no fueran viables en estos 2 casos, ya que ninguna de las exploraciones dependientes del metabolismo bacteriano (test de la ureasa rápida, UBT o cultivo) fueron positivas. En el otro individuo, el fracaso en el cultivo bacteriano pudo ser debido a muerte de la bacteria, ya que se han descrito cepas extremadamente sensibles que mueren en 20 minutos o bien por fallos en la atmósfera microaerófila creada en el laboratorio. En este caso, la presencia de *H. pylori* se detectó mediante el test de la ureasa rápida e histología. Podríamos descartar que el fracaso del cultivo fuera debido a un aclaramiento bacteriano, ya que ninguno de los 6 sujetos habían recibido tratamiento frente a *H. pylori* ni eran consumidores frecuentes de antibióticos.

H. pylori es una bacteria de crecimiento lento, muy sensible a la desecación, requiriendo unas condiciones óptimas de temperatura y humedad para su cultivo. Es imprescindible que el cultivo se realice en un ambiente microaerófilo, con alta humedad y con una temperatura de 35° a 37° C. Todas estas características conllevan a que el cultivo de la bacteria requiera unas condiciones indispensables. Por ello, algunos autores cultivan varias muestras de mucosa de distinta localización gástrica, con el objeto de disminuir la tasa de cultivos negativos. En el ensayo multicéntrico MACH 2 (247), llevado a cabo en varios países europeos, se determinó la toma de 4 biopsias gástricas de cada sujeto, 2 de antro y 2 de cuerpo, al igual que en el estudio multicéntrico diseñado por el Grupo Italiano para el Estudio de la Úlcera Péptica (GISU) (249). La sensibilidad del cultivo es mayor del 95% en los laboratorios con experiencia (68). En nuestro estudio obtuvimos una sensibilidad del 93%. La sensibilidad obtenida por otros autores europeos oscila entre el 67% (249) y el 99% (247).

Las biopsias deben remitirse al laboratorio de microbiología en el menor tiempo posible, debido a la alta sensibilidad del microorganismo a la desecación. Se aconseja la utilización de medios de transporte que garanticen la viabilidad del microorganismo. Los medios de transporte más empleados son suero salino,

glucosa al 20%, medio de Stuart, agar-chocolate y medio con glicerol. La mayoría de los estudios sugieren que la frecuencia de aislamiento de la bacteria es la misma independientemente del medio de transporte utilizado (255). Existen discrepancias en cuanto al tiempo en que *H. pylori* sobrevive a temperatura ambiente. Han (256) sugiere que el aislamiento de la bacteria se reduce significativamente después de 6 horas, independientemente del medio de transporte utilizado. Veenendaal (257), en contraposición, demuestra que *H. pylori* puede sobrevivir a temperatura ambiente durante 24 horas. Roosendaal (258) observa que la supervivencia de las bacterias en suspensión se afecta dramáticamente cuando se incuban a temperatura ambiente durante un tiempo superior a 6 horas. Este investigador compara la supervivencia de *H. pylori* en 5 medios diferentes, hallando que no existen diferencias significativas en la tasa de aislamiento de la bacteria de los distintos medios, incluso después de un periodo de 24 horas. Pérez-Pérez (255) opina que la composición del medio de transporte no es esencial para la supervivencia de este microorganismo si se procesa la muestra en menos de 24 horas, por lo que debe permitirse a cada laboratorio la elección del medio de transporte que crea más conveniente. No obstante, el transporte en el medio adecuado debe ser una prioridad en aquellas áreas en las que, por la falta de disponibilidad de un laboratorio de microbiología, se retrase el cultivo más de 24 horas. En nuestro estudio, procesamos las biopsias en menos de 1 hora desde su obtención, considerando oportuno el transporte de ellas en suero salino mantenido a 4° C.

Una vez que se recibieron las muestras en el laboratorio, se sembraron en dos medios, uno selectivo (medio Dent) y otro no selectivo (agar chocolate), siendo incubadas en microaerofilia durante 7 días. El uso paralelo de un medio selectivo y otro no selectivo aumenta la tasa de aislamiento de *H. pylori* (255). El medio selectivo aporta antibióticos al medio nutritivo, lo que evita el crecimiento de bacterias y hongos de rápido crecimiento que enmascararían el crecimiento más lento de *H. pylori*. No existe acuerdo respecto a los antibióticos que deben añadirse. La combinación más frecuente incluye vancomicina, anfotericina B, ácido nalidíxico y trimetoprim. Algunos autores (258) recomiendan el empleo de un medio selectivo que incluya cloruro de trifeniltetrazolio, ya que tiñe las colonias de rojo y facilita su reconocimiento. El tiempo de incubación ha sido objeto de estudio por diferentes investigadores (255). Aunque esta variable depende del tipo de medio de cultivo utilizado (selectivo o no selectivo), se recomienda esperar 10 días antes de considerar un cultivo como negativo.

La determinación de la sensibilidad de *H. pylori* a los antimicrobianos se llevó a cabo en los 82 casos en los que el cultivo de la bacteria fue positivo. Algunos autores consideran que el método de referencia en el estudio de la sensibilidad de *H. pylori* es la dilución en agar. El método utilizado por nosotros fue la difusión con tiras de épsilon-test (E-test). Este test, diseñado para la determinación cuantitativa de la sensibilidad a los antibióticos, es una modificación de los métodos de difusión en agar con discos. En nuestro laboratorio es el método utilizado rutinariamente para determinar la sensibilidad de bacterias fastidiosas o de crecimiento lento, por ser de fácil realización y proporcionar resultados rápidos con vistas al tratamiento del paciente, siendo esta característica de gran importancia cuando existe fracaso terapéutico. El E-test ha demostrado ser

tan preciso como la dilución en agar para medir la sensibilidad de microorganismos de crecimiento lento, si bien, su precisión en el estudio de la sensibilidad de *H. pylori* es objeto de discusión.

Algunos autores han resaltado la excelente correlación que existe entre los resultados obtenidos con el E-test y los obtenidos con la dilución en agar. Glupczynski (259) evalúa el E-test como método de estudio de la sensibilidad de *H. pylori* a los antibióticos. Para ello, lo compara con la dilución en agar en la determinación de la sensibilidad a 12 antimicrobianos, hallando que el 86% de los resultados obtenidos con el E-test y el 99.5% de los obtenidos con la dilución en agar se correlacionan en 1-2 diluciones; no obstante para ciprofloxacino y tetraciclina, los valores de CMI obtenidos con el E-test se sitúan 2 diluciones por debajo de los obtenidos con la dilución en agar. Hirschl (260), comparando los métodos en la determinación de la sensibilidad de *H. pylori* a metronidazol, halla una correlación elevada (r de 0.96), lo que traduce la alta precisión del E-test respecto al método de referencia. Este autor no halla diferencias significativas entre las CMI obtenidas por ambos métodos. Cederbrant (261) también evalúa este método, observando que el 81% de los valores de CMI obtenidos mediante el E-test se sitúan dentro de 1 dilución y el 93% dentro de 2 diluciones de los valores obtenidos mediante la dilución en agar. No obstante, los valores de CMI determinados por E-test fueron menores que los determinados mediante la dilución en agar. Van Horn (262), comparando ambos métodos en la evaluación de la actividad de 5 antimicrobianos, halla una correlación del 86%. La correlación obtenida por Piccolomini (263) es aún mayor (91.1%).

Sin embargo, otros autores han observado una falta de concordancia entre los dos métodos anteriores en la determinación de la resistencia a metronidazol. Mégraud (247) halla una discrepancia del 22% en la tasa de resistencia según el método empleado, hallando tasas más altas con el E-test. Osato (264) también describe diferencias significativas entre los dos procedimientos, obteniendo mayor proporción de cepas resistentes con el E-test. Von Recklinhausen (265) halla una discrepancia entre los dos métodos del 13.3%. Estos autores observan que las cifras de CMI se elevan cuando se utiliza el E-test, categorizándose más cepas como resistentes que con la dilución en agar. Por el contrario, ambas técnicas tienen una buena correlación en la determinación de la resistencia a claritromicina (247).

Para metronidazol, ninguno de los dos métodos ha sido clínicamente verificado, de tal forma que, la presencia de resistencia *in vitro* a este fármaco no predice siempre el fallo en el tratamiento. Mégraud sugiere que sólo se puede predecir el fallo en la terapia erradicadora cuando las cepas no inhiben su crecimiento con 32 $\mu\text{g/ml}$ de metronidazol (247).

No existe consenso actual sobre los puntos de corte de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori*. El NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) sólo ha definido la resistencia de *H. pylori* a claritromicina, considerando cepas resistentes aquéllas cuya CMI sea igual o mayor a 1 mg/l (266). Por este motivo y con la excepción de claritromicina, los puntos de corte para definir la resistencia en *H. pylori* dependen del criterio de los

distintos laboratorios, no existiendo unanimidad entre ellos. En nuestro estudio, hemos definido los puntos de corte para metronidazol en CMI >8 mg/l, para claritromicina en CMI \geq 1 mg/l, para amoxicilina en CMI >4 mg/l, para ciprofloxacino en CMI >4 mg/l y para tetraciclina en CMI >2 mg/l, basándonos en trabajos anteriores (247). La variación en estos valores puede modificar las cifras de prevalencia obtenidas, por lo que sería aconsejable que la determinación de la sensibilidad se realizara bajo las mismas condiciones en todos los laboratorios, con el fin de que los resultados pudieran ser comparables.

1.1. Resistencia primaria

En nuestra serie, el 50% de las cepas aisladas fueron resistentes a algún antibiótico. La resistencia primaria a metronidazol fue del 39%, a claritromicina, del 5% y a ciprofloxacino, del 5%. No hallamos resistencia a tetraciclinas ni a amoxicilina.

Es difícil obtener unas cifras precisas de la prevalencia en los distintos países, debido a la falta de estudios multicéntricos y a la escasa estandarización de la técnica para determinar la sensibilidad antimicrobiana.

Con respecto a metronidazol, la prevalencia en España varía notablemente entre los diversos estudios, oscilando entre el 12.5% y el 50%, siendo la prevalencia media del 26% (62). La diferencia geográfica de la sensibilidad se puso de manifiesto en un estudio de López-Brea, detectándose la máxima resistencia en la zona central de España y la mínima en la zona norte (48). Nuestro grupo había analizado previamente la prevalencia en nuestra área en el periodo 1998-1999, obteniendo una tasa de resistencia a metronidazol del 42% (64). Nuestros resultados actuales confirman la elevada resistencia a metronidazol que existe en Sevilla. Sólo en dos de los trabajos publicados en España se supera dicha tasa (62).

En Europa, se han llevado a cabo dos estudios multicéntricos para el análisis de la prevalencia de la resistencia. En el primero de ellos (41), se estudió la resistencia en 11 países, siendo la resistencia media a metronidazol del 27.5%, oscilando considerablemente entre unos países y otros (desde el 7% de España al 49% de Grecia). El segundo trabajo, más reciente, fue el estudio MACH 2 (247). En él se constató la gran divergencia que existe en las tasas de resistencia entre los diversos países, variando la resistencia primaria a metronidazol entre el 16% de Francia, y el 42% de Noruega.

Nuestros resultados se sitúan en la línea de los países europeos con mayor resistencia, sobrepasando los niveles de los países vecinos. En Italia, Pilotto (249) halla una prevalencia del 15%, mientras que en Portugal (267), se han comunicado cifras de resistencia primaria del 30.6%, cifra cercana a la obtenida en Bulgaria (61). Los valores de prevalencia en nuestro medio se asemejan a los obtenidos en los países orientales. Kim (268), en Korea, obtiene una resistencia a metronidazol del 40.5% y Wong (269), en Hong Kong, del 57%. En Estados Unidos, Osato (270), en una revisión sistemática, obtiene una prevalencia media de resistencia a este fármaco del 39% mediante E-test, y del 21.6% mediante

dilución en agar. Los niveles de resistencia más elevados se hallaron en el sureste de Estados Unidos (27.5%) y los más bajos en el noreste (22.1%), si bien estas diferencias no tuvieron significación estadística.

La tasa de resistencia a metronidazol se ha relacionado también con el número de muestras cultivadas. Wong (269), en un estudio reciente, obtiene una tasa de resistencia a metronidazol del 32% con el cultivo de una sola biopsia antral. Esta tasa se eleva hasta el 50% cuando se cultivan 3 biopsias gástricas, de antro, cuerpo y cardias. Este autor recomienda la toma de biopsias de distintas localizaciones, ya que este hecho parece estar relacionado con la coexistencia de cepas de distinto genotipo y distinta sensibilidad en un mismo individuo. La heterorresistencia a metronidazol, es decir, la coexistencia en un mismo individuo de cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes a este fármaco, se ha descrito en varios trabajos anteriores (271, 272). Jenks (273) observa la aparición de este fenómeno en ratones infectados por cepas de *H. pylori* inicialmente sensibles, tras la exposición de los animales a una terapia con metronidazol. Este autor ha observado que, a pesar de que las cepas resistentes surgen de una misma cepa sensible, el grado de resistencia de ellas es diferente, variando la CMI entre 8 y 64 µg/ml. Los métodos actuales de determinación de la sensibilidad de *H. pylori* pueden subestimar la tasa de resistencia a metronidazol en aquellos individuos coinfectados con cepas sensibles y resistentes, lo que puede tener una gran repercusión clínica si se confirma que la heterorresistencia ocurre frecuentemente tras la exposición a metronidazol.

La tasa de resistencia primaria a claritromicina fue del 5%, cifra en consonancia con las publicadas en la literatura e inferior a la que obtuvo nuestro grupo en el periodo 1998-1999 (64), sin que podamos conocer la causa. La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a claritromicina también varía según el lugar y el año de aislamiento de las cepas, estando aumentando de forma evidente en los últimos años. Uno de los primeros estudios para evaluarla se realizó en Francia (44). En él se observó un aumento de la tasa de resistencia desde el 1.9%, antes de 1993, al 6% en el periodo 1993-1995. En Bélgica (45), se han comunicado tasas del 8%, mientras que Holanda mantiene una de las tasas más bajas en Europa (1.7%) (46). En Europa se puede observar un gradiente norte-sur en la tasa de resistencias, encontrándose las tasas más bajas en el norte y las más altas en los países mediterráneos, donde oscilan entre un 10 y un 15%. En Estados Unidos (58), la resistencia media es del 8%, aunque en algunas zonas se han llegado a describir tasas del 14%. En Japón se han comunicado tasas mayores, obteniendo Kato (274) una tasa global del 18.7% en el periodo 1998-99. En España, la prevalencia media de resistencias es del 7.1%, siendo la prevalencia mínima comunicada del 1% y la máxima del 12.7% (62).

La tasa de resistencia primaria a ciprofloxacino fue del 5%. Las fluorquinolonas incluyen distintos fármacos con actividad frente a *H. pylori*. Su eficacia en el tratamiento de esta infección se ha limitado a pocos estudios, en los cuáles se ha utilizado como agente único o en combinación con otros. El aclaramiento bacteriano con el uso de ciprofloxacino en monoterapia es pobre, originando fácilmente resistencia en *H. pylori* (70). Existen pocas referencias

bibliográficas sobre la prevalencia de la resistencia a este grupo antibiótico, dado que se reserva como terapia de segunda línea, tras el fracaso de otras opciones terapéuticas. Entre los trabajos publicados, destaca el de Debets-Ossenkopp (250), que obtiene una resistencia a trovafloxacino del 4.7%, a pesar de que este fármaco no estaba comercializado en Holanda en el momento del estudio. Boyanova (61), en Bulgaria, obtiene una prevalencia primaria del 3.9%.

En contraste a la resistencia a claritromicina, metronidazol y ciprofloxacino, no hemos observado resistencia a amoxicilina. La resistencia estable a amoxicilina fue descrita por Van Zwet (67) en 1998, en un paciente que en los 6 años anteriores había recibido 12 ciclos de tratamiento con amoxicilina por infecciones respiratorias. En él se aisló una cepa de *H. pylori* resistente a 8 µg/ml de amoxicilina, permaneciendo estable la resistencia tras congelación a -80°C. En la mayoría de las cepas resistentes aisladas la resistencia suele ser inestable, perdiéndose esta característica tras la congelación de las bacterias. Este fenómeno ha sido descrito en otras especies bacterianas que muestran tolerancia a los betalactámicos, como *Streptococcus pyogenes* o *S. aureus* (275). Han (276) confirma que existe resistencia estable e inestable en *H. pylori*. Dore (277) observa que tras la pérdida del fenotipo de resistencia por congelación es posible su recuperación mediante el paso de las cepas por placas con gradientes de antibiótico. Este autor sugiere que el mecanismo de resistencia puede estar relacionado con el desarrollo de tolerancia por la cepa, definiéndose ésta como la razón entre la concentración mínima bactericida (CMB) y la CMI. La resistencia a amoxicilina se asoció con una razón CMB/CMI > 32. DeLoney (66) también ha conseguido aislar una cepa con resistencia estable, tras haberla mantenido congelada durante 6 meses. En contraposición a Dore, observa que el cociente CMB/CMI en las cepas resistentes a amoxicilina oscila entre 1 y 4, describiendo dos mecanismos de resistencia en *H. pylori*. En su estudio determina que existe una alteración en la PBP1, proteína de la membrana celular bacteriana que actúa como punto de unión a los betalactámicos. Las cepas resistentes tienen el mismo número de proteínas que las sensibles, pero su afinidad por los betalactámicos está reducida. En las cepas resistentes también ha observado que la permeabilidad de la membrana celular a amoxicilina es menor que en las cepas sensibles, lo que podría ser explicado por una alteración en alguna proteína de la membrana externa, como las porinas. En la cepa aislada por DeLoney se observó resistencia cruzada con otros betalactámicos, hallazgo también descrito por otros autores (276, 278).

En general, la prevalencia de resistencia a amoxicilina es escasa (247, 249, 250), aunque en algunos estudios se han hallado tasas inesperadamente altas. En Italia se han descrito tasas del 31% (279) y del 45% (280), considerándose resistentes con valores de CMI > 8 mg/l. En Brasil (248) la frecuencia de resistencia es del 29% (CMI > 8 mg/l) y en México (281), del 18.5% (CMI > 4 mg/l), si bien en este último caso las cepas presentaban resistencia inestable. En China (282) se ha descrito una prevalencia del 71.9% (CMI > 0.5 mg/l), lo que equivale a una frecuencia de 41.2% considerando el punto de corte en CMI > 8 mg/l.

En el presente trabajo tampoco hemos observado resistencia a tetraciclina. En el estudio que anteriormente se llevó a cabo en nuestro hospital (64), detectamos una cepa resistente en un paciente que había realizado previamente

tratamiento erradicador con una pauta cuya composición desconocemos. El uso extensivo de tetraciclina en el ámbito sanitario y veterinario, donde se emplea como factor de crecimiento en la alimentación animal, ha provocado la aparición de resistencias en casi todas las bacterias. Durante muchos años, se ha empleado en combinación con metronidazol y subcitrate de bismuto coloidal para el tratamiento de la infección por *H. pylori*. La resistencia de este microorganismo a tetraciclina fue descrita por Midolo (283), tras aislar una cepa resistente en un paciente que había recibido tratamiento frente a esta bacteria. En la mayoría de los estudios publicados no se ha observado resistencia a este fármaco (48, 250). En Italia, Realdi (284) observa una tasa de resistencia a tetraciclina del 14% y a doxiciclina del 33.3%, definiendo la resistencia para ambas a partir de CMI>2 mg/l. En Brasil (248), se ha observado una prevalencia del 7% (CMI>2 mg/l) y en China (282), del 58.8% (CMI>16 mg/l). Kwon (285) aísla 29 cepas resistentes a este antibiótico, permaneciendo estable la resistencia en 27 de ellas. En todas las cepas existió resistencia cruzada a metronidazol. La resistencia a tetraciclina y metronidazol se transfirió desde las cepas resistentes a tetraciclina a las sensibles, lo que sugiere que la resistencia a tetraciclina puede estar asociada con la resistencia a metronidazol, pero no al contrario. La resistencia cruzada entre los dos fármacos también ha sido observada por otros autores (61, 283). Se desconoce si este mecanismo forma parte del mecanismo de adquisición de multiresistencia observado en otras bacterias gram-negativas (286).

La heterogeneidad existente entre las distintas publicaciones en las cifras de prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los distintos antimicrobianos puede ser debida a la variabilidad metodológica, ya que no existe un método universalmente aceptado para evaluar la sensibilidad *in vitro* de *H. pylori* a los antibióticos. El empleo de E-test, en lugar de la dilución en agar, podría justificar las elevadas cifras de resistencia a metronidazol obtenidas en nuestra serie. Los puntos de corte empleados por cada autor para definir la resistencia también son diferentes, dado que no existen normas específicas que los definan, con excepción de claritromicina. Todo ello contribuye a que exista disparidad entre los resultados de los distintos estudios.

1.2. Resistencia secundaria

La tasa de resistencia a todos los antimicrobianos se elevó considerablemente en los individuos que habían realizado tratamiento erradicador previamente. El porcentaje de resistencia secundaria a metronidazol fue del 65%, frente al 39% de resistencia primaria, observándose una diferencia significativa en la prevalencia entre los expuestos y los no expuestos a tratamiento erradicador. No obstante, en sólo una minoría la pauta terapéutica erradicadora incluyó metronidazol. Jenks (273) comprueba, en un modelo animal, el efecto del tratamiento erradicador en la resistencia a metronidazol. Tras el fracaso de la terapia compuesta por omeprazol, claritromicina y metronidazol durante 7 días en cepas previamente sensibles, obtiene un 20% de resistencia a este fármaco. Estos resultados demuestran que *H. pylori* adquiere fácilmente resistencia a metronidazol *in vivo* y que el uso previo de antibióticos origina resistencias en cepas anteriormente sensibles.

El incremento más notable en las cifras de resistencia se observó con claritromicina. La prevalencia se elevó desde un 5% en los no tratados, a un 45% en los tratados, siendo la diferencia significativa ($p < 0.0005$). Este hecho podría tener su explicación en que todos los individuos realizaron tratamiento con pautas que contenían claritromicina, siendo la combinación más frecuente la compuesta por omeprazol, claritromicina y amoxicilina durante 10 días. Se confirmaría, así, que el fracaso de una primera pauta erradicadora con claritromicina causa la aparición de resistencias secundarias a este antibiótico. Por ello, tras el fracaso de una pauta con claritromicina no se debe aconsejar la inclusión de este fármaco en un segundo régimen.

La resistencia a ciprofloxacino fue tres veces mayor en los individuos que habían realizado tratamiento erradicador previo (5% en los no tratados y 15% en los tratados previamente), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. El hecho de no observarse significación estadística, en contraposición a lo que ocurre con metronidazol y claritromicina, puede deberse a que ninguno de los tratamientos realizados por los pacientes incluyeron quinolonas. Heep (287), en Alemania, describe una tasa de resistencia secundaria menor, del 9%.

1.3. Multirresistencia

La multirresistencia tiene una gran repercusión clínica, ya que disminuye la eficacia de las pautas terapéuticas y limita el empleo de pautas de rescate. Los antibióticos más eficaces frente a *H. pylori* pertenecen a 4 grupos, existiendo resistencia cruzada entre los fármacos de un mismo grupo. Debido a ello, la multirresistencia hace necesaria la búsqueda de nuevos componentes activos frente a esta bacteria.

En el presente estudio hemos obtenido una tasa de multirresistencia elevada (13%), en comparación con la referida por otros autores en países como Holanda (250), con un 2.6% de resistencia doble (metronidazol y claritromicina o trovafloxacino), o Japón (274), con un 2.3% (metronidazol y claritromicina). Hallamos resistencia doble en el 10% de las cepas (la mayoría a metronidazol y a claritromicina) y triple (metronidazol, claritromicina y ciprofloxacino) en el 4%. Todos los pacientes con resistencia triple y con resistencia doble a metronidazol y claritromicina habían sido tratados previamente frente a la infección por *H. pylori* con pautas de tratamiento que contenían claritromicina. En un caso existió resistencia doble a metronidazol y ciprofloxacino, sin que existiera antecedente de tratamiento erradicador.

Las cifras obtenidas se mantienen en la línea de países como Brasil, donde la prevalencia de resistencia primaria a los antimicrobianos es mayor (248). Torres (281), en México, observa que el 30% de las cepas aisladas presentan multirresistencia, siendo el 18% de ellas resistentes simultáneamente a metronidazol y claritromicina y el 8.7% a metronidazol, claritromicina y amoxicilina, si bien la resistencia a esta última fue inestable. Estas cifras tan altas hay que interpretarlas dentro del contexto de un país donde la prevalencia de resistencia primaria es, de igual forma, muy elevada (77% a metronidazol, 24% a claritromicina y 18.5% a amoxicilina). En China, Wu (282) observa que el 39.2%

de las cepas presentan resistencia simultánea a metronidazol, amoxicilina y tetraciclina. La elevada prevalencia de multirresistencia en China puede ser secundaria al uso extensivo de estos antibióticos en dicha región.

2. RESISTENCIA Y VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

En este trabajo hemos estudiado la posible influencia de distintos factores determinados por el huésped en la resistencia de *H. pylori*.

2.1. Edad

En nuestra serie comparamos la edad media entre el grupo de pacientes infectados por cepas sensibles y el grupo infectado por cepas resistentes, sin que halláramos diferencias significativas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, como Pilotto (249) o Kim (268), los cuáles tampoco observan relación entre la edad y la resistencia. Otros autores han estudiado la resistencia por grupos de edad. Osato (270) observa diferencias en el patrón de resistencias a metronidazol y a claritromicina en función de la edad, observando un descenso significativo en la resistencia a partir de los 70 años. Fraser (288) observa que la resistencia a metronidazol, pero no a claritromicina, se asocia significativamente a la edad juvenil. Parsons (289) coincide con este último autor, hallando relación significativa entre la resistencia a metronidazol y la juventud ($p < 0.0001$), pero no entre ésta y la resistencia a los macrólidos ($p = 0.16$). Perri (290), en un estudio sobre los factores predictivos de fracaso terapéutico, considera la edad mayor de 45 años como factor predictivo de éste, con una odds ratio de 2.35, aunque no parece que este hecho esté relacionado con la resistencia a los antimicrobianos. Las discrepancias observadas en las distintas publicaciones pueden ser debidas a los diferentes criterios utilizados en la clasificación de los grupos etarios.

2.2. Distribución por sexo

Estudiando la distribución de la resistencia en función del sexo, observamos que la infección por cepas resistentes a cualquiera de los antibióticos fue más frecuente en mujeres que en hombres (59% vs 36% para metronidazol, 16% vs 14% para claritromicina, 10% vs 6% para ciprofloxacino), siendo sólo significativa para el caso del metronidazol. El sexo femenino ha sido identificado como factor de riesgo para la resistencia a metronidazol (270, 291), aunque no todos los estudios coinciden en ello (274). La causa de las diferencias en la prevalencia de la resistencia observadas entre sexos parece ser el uso más frecuente de metronidazol por las mujeres que por los hombres, dada la acción de este fármaco en el tratamiento de las infecciones ginecológicas. Ha quedado bien establecido que una sola terapia con metronidazol induce resistencias a este fármaco en *H. pylori* (273). Parsons (289) observa diferencias en la distribución de la resistencia según el sexo hasta los 60 años, edad a la cuál se equiparan las incidencias.

2.3. Tabaco

Estudiamos si existía relación entre el tabaquismo y la resistencia a los antimicrobianos, debido a que en algunos estudios se ha publicado que la eficacia

de las pautas de tratamiento es menor en los pacientes fumadores. Perri (290) identifica el tabaco como factor predictivo de fallo terapéutico, con una odds ratio de 1.37.

Al igual que lo observado por Pilotto (249), los resultados de este estudio no muestran la existencia de relación entre ambas variables. Witteman (292), sin embargo, encuentra una asociación significativa entre la resistencia a metronidazol y el hábito tabáquico, si bien su estudio está limitado por la escasa población que estudia.

2.4. Consumo frecuente de antibióticos

Otra de las variables estudiadas fue la influencia del consumo frecuente de antibióticos en la resistencia. Analizamos el consumo de antibióticos de forma global, ya que no tuvimos acceso a conocer las distintas familias de antimicrobianos recibidas por los pacientes, al ser un dato recordado en pocas ocasiones por ellos. El desconocimiento de este dato pudo suponer la introducción de un sesgo en el estudio de esta variable. El consumo frecuente de antibióticos fue un antecedente más frecuente entre los individuos infectados por cepas resistentes (resistentes vs sensibles: 14% vs 10% a metronidazol; 25% vs 9% a claritromicina; 17% vs 11% a ciprofloxacino), aunque no de forma significativa (tabla 3).

Actualmente se piensa que la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos es una consecuencia directa del consumo de antibióticos en la comunidad, al igual que ocurre en otras especies bacterianas. La estrecha asociación entre el uso generalizado de los antibióticos y la aparición de cepas resistentes es una evidencia de ello. Ello se debe a que el uso extensivo de los antimicrobianos favorece la selección de cepas resistentes por eliminación de los competidores sensibles. En Japón, la prevalencia de resistencia primaria a metronidazol es del 12.4% y a claritromicina del 12.9% (274). Dado que en dicho país no está aprobado el uso de antibióticos en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, las tasas de resistencia descritas se deben, con gran probabilidad, al uso de estos fármacos en el tratamiento de otras infecciones de la comunidad, bien génitourinarias o respiratorias.

En los países desarrollados, la prevalencia de resistencia a metronidazol oscila entre el 10 y el 50%, mientras que en los países subdesarrollados se acerca al 100% (36). La elevada prevalencia en estos últimos parece tener relación con el uso frecuente del nitroimidazol en el tratamiento de algunas infecciones parasitarias, como la amebiasis y la giardiasis. En un estudio multicéntrico europeo (41) se puso de manifiesto que los sujetos tratados previamente con nitroimidazoles para el tratamiento de otras infecciones tenían una mayor tasa de resistencia. Jenks (273), a través de un modelo animal en ratones, demuestra que *H. pylori* adquiere resistencia estable *in vivo* tras un ciclo de tratamiento con metronidazol en monoterapia. Estos resultados confirman que la exposición de una población clonal de *H. pylori* a las dosis de metronidazol normalmente utilizadas para el tratamiento de la infección por bacterias anaerobias o parásitos, origina resistencia a este fármaco. Wang (293) observa que la preincubación de *H.*

pylori con 2 µg/ml de metronidazol aumenta la frecuencia de mutaciones espontáneas que confieren resistencia a él. En consonancia con ello, Sisson (294) determina que el metronidazol es mutagénico, actuando a través de la fragmentación del ADN en *H. pylori*. No obstante, según Debets-Ossenkopp (250), aunque el consumo de metronidazol sea similar en una población, se pueden observar diferentes tasas de resistencia a este fármaco en ella.

La diferencia en la prevalencia de resistencia a claritromicina también refleja el uso variable de este fármaco en los diferentes países. Así, en los países mediterráneos, donde la política antimicrobiana es menos estricta que en los países del norte de Europa, las tasas de resistencia son mayores. En este sentido, el creciente uso de los macrólidos, sobre todo en el tratamiento de las infecciones respiratorias, repercute en la prevalencia de resistencias bacterianas. Un análisis llevado a cabo en Finlandia (295) confirmó que los niveles de resistencia a eritromicina entre las cepas de *S. pyogenes* se correlacionan significativamente con el consumo de este fármaco por la población. En Japón (296), el aumento del consumo de eritromicina durante los años 70 provocó un rápido incremento en la tasa de resistencia de *S. pyogenes* a este antibiótico. La asociación del uso intensivo de antimicrobianos con la resistencia se ha demostrado en repetidas ocasiones en las últimas décadas, en bacterias como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Neisseria gonorrhoeae* (297), por citar algunos ejemplos. Melander (298) observa, en la población infantil, una correlación significativa entre el uso de antibióticos y la frecuencia de resistencia de *Streptococcus pneumoniae* en la comunidad.

Seppälä (295) demuestra que es posible el descenso en el consumo de antibióticos en la comunidad tras la aplicación de unas normas para su uso y, lo que es más importante, que tras el seguimiento de ellas, se logra una disminución de la resistencia antimicrobiana. Por ello, es necesario el control y la vigilancia de la resistencia, aplicando medidas que disminuyan el consumo de antibióticos en los hospitales, en las granjas de animales y en la comunidad. Para que esta política llegue a ser una medida de salud pública efectiva se requiere la información y educación de médicos, veterinarios y pacientes.

2.5. Consumo habitual de AINES

La relación entre la resistencia y el consumo frecuente de AINES por los pacientes fue otro de los aspectos contemplados en nuestro estudio. Los consumidores habituales de estos fármacos estaban infectados más frecuentemente por cepas resistentes a los antibióticos, aunque no existió relación significativa entre ambas variables (resistentes vs sensibles: 29% vs 17% a metronidazol; 33% vs 20% a claritromicina; 50% vs 20% a ciprofloxacino).

2.6. Diagnóstico endoscópico e histológico

Las lesiones gastroduodenales se distribuyeron de forma similar en el grupo de pacientes infectados por cepas sensibles y en el infectado por cepas resistentes, tanto macroscópica como histológicamente (Tabla 4). Las lesiones erosivas de la

mucosa duodenal (úlceras duodenales y lesiones agudas de la mucosa duodenal) fueron el hallazgo endoscópico más frecuente, en los sujetos infectados por cepas sensibles y en los infectados por cepas resistentes. El segundo diagnóstico en frecuencia en ambos grupos fue la gastritis crónica superficial. Nuestros hallazgos coinciden con los de otros autores (249, 268), que tampoco observan diferencias en las lesiones gastroduodenales producidas por cepas sensibles y resistentes. De estas observaciones podría deducirse que las lesiones gastroduodenales producidas por *H. pylori* no dependen de la resistencia de esta bacteria a los antibióticos.

Dore (279) observa que los pacientes infectados por cepas sensibles a amoxicilina presentan un patrón histológico de gastritis crónica activa más severo que los infectados por cepas resistentes. Este autor sugiere que las cepas tolerantes a amoxicilina crecen de forma más lenta que las sensibles, lo que originaría una menor tasa de muerte celular y una menor liberación de productos bacterianos. De esta forma, habría una menor estimulación de las citoquinas del huésped y una menor inflamación de la mucosa.

Un hallazgo interesante en nuestro estudio fue la alta tasa de resistencia encontrada en los sujetos con metaplasia intestinal antral. De los 7 casos en los que se observó histológicamente la presencia de metaplasia intestinal en el antro gástrico, sólo se aislaron cepas sensibles a todos los antibióticos en 2 de ellos. En el 71% (5/7) de los sujetos con metaplasia intestinal en el antro gástrico se aislaron cepas resistentes a metronidazol (tabla 5). No pudimos establecer la magnitud de la relación entre ambas variables, ya que, aunque aplicamos el test exacto de Fisher para muestras poco pobladas, más de 2 casillas de la tabla de contingencia presentaban una frecuencia esperada menor al valor 5, lo que invalidaba el resultado del test. En el 43% (3/7) de los casos con metaplasia intestinal, la infección fue debida a cepas multirresistentes. En 2 casos existió resistencia a metronidazol y claritromicina y en 1 caso, a metronidazol y ciprofloxacino. Respecto a la claritromicina, no observamos relación estadísticamente significativa entre la metaplasia intestinal y la resistencia de las cepas a ella. Dado que la metaplasia intestinal no es un hallazgo frecuente, se precisan estudios con mayor número de pacientes para determinar la relación entre este patrón histológico y la resistencia a metronidazol.

3. RESISTENCIA Y DENSIDAD BACTERIANA

El análisis de la densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica ha preocupado a los patólogos y gastroenterólogos desde el conocimiento de esta bacteria por su posible relevancia en las enfermedades digestivas y su importancia epidemiológica.

El grado de colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* se ha considerado un factor determinante de virulencia y patogenicidad. En estudios previos se ha observado una relación directa entre la densidad bacteriana y la infiltración de la mucosa gástrica por neutrófilos y linfocitos (299). La densidad abundante también se ha correlacionado con la lesión epitelial en términos de degeneración epitelial y depleción de moco, habiéndose constatado que los sujetos con úlcera duodenal tienen una mayor densidad antral (300). Atherton (301) demuestra que la densidad bacteriana en el antro de los pacientes ulcerosos es 5 veces mayor que en los no ulcerosos ($p=0.005$). Cuando estudia la distribución de las cepas en el antro, observa que la densidad media de las cepas más virulentas (*cagA+VacA s1*) es 4 veces mayor que la de las cepas *cagA-VacA s2* ($p=0.02$). Este autor defiende la hipótesis de que el genotipo bacteriano determina el grado de infiltración bacteriana. Khulusi (300) observa que en el antro gástrico de los pacientes ulcerosos la densidad es 7 veces mayor que en los no ulcerosos, existiendo un valor de densidad de la infección crítico (10^5 ufc/mg), por debajo del cuál no se observan lesiones ulcerosas en la mucosa. Hui (302) halla que la densidad antral aumenta la tasa de recurrencia ulcerosa y Banerjee (303) observa una relación directa entre el grado de densidad bacteriana y la producción basal de ácido.

Otros autores han destacado la importancia de la carga bacteriana en el fracaso del tratamiento erradicador. Moshkowitz (243) describe una significativa reducción en la tasa de erradicación con la triple terapia clásica en aquellos sujetos con una densidad antral abundante. Así, en los pacientes con baja densidad bacteriana (actividad ureásica medida mediante el test del aliento menor a 200 cpm) la tasa de erradicación fue del 87.8%, en los pacientes con densidad intermedia (200-400 cpm) del 69.5% y en los de alta densidad (>400 cpm) del 37.5% ($p < 0.05$). En esta línea, Perri observa que la densidad bacteriana es un factor predictivo del fallo de la triple terapia formada por un IBP, claritromicina y amoxicilina (290). Peterson (304), sin embargo, no halla correlación entre la densidad bacteriana y la eficacia del tratamiento erradicador con claritromicina en monoterapia.

Los trabajos previos que relacionan la densidad bacteriana con el fracaso terapéutico nos hicieron plantearnos si, en estos casos, el fracaso farmacológico sería secundario a la resistencia de esta bacteria a los antibióticos. Hasta el momento, todos los mecanismos conocidos de resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori* son genéticos (293). *H. pylori* adquiere resistencia a través de mutaciones puntuales en el genoma. Las mutaciones puntuales ocurren de forma espontánea (51). Las bacterias se multiplican rápidamente, dependiendo la adquisición de resistencia de la frecuencia de las mutaciones naturales que las confieren. Wang (293) determina la frecuencia y la tasa de mutaciones de las cepas de *H. pylori* que adquieren resistencia. La frecuencia de mutaciones espontáneas para la

adquisición de resistencia a rifampicina osciló entre 5×10^{-8} y 1.5×10^{-8} , siendo similar a la frecuencia para ciprofloxacino. La tasa de mutaciones que confieren resistencia a claritromicina y metronidazol se estimó en menor a 10^{-9} por división bacteriana, tasa 20 veces menor que aquélla para rifampicina. Desde este punto de vista, la resistencia puede considerarse un fenómeno estadístico. Cuanto mayor sea el número de microorganismos, mayor tasa de multiplicación bacteriana y mayor probabilidad de adquisición de resistencias habrá. Nuestra hipótesis de trabajo se centró en estudiar si la densidad bacteriana en la mucosa gástrica era un determinante de la resistencia a los antibióticos.

H. pylori se distribuye por toda la mucosa gástrica, habiéndose descrito en antro, cuerpo y cardias. La distribución bacteriana no es homogénea, siendo la infección mayor en el antro, si bien, autores como Genta (305), Carvahlo (306) y Bayerdörffer (307) defienden la homogeneidad de la distribución. Dada la dificultad metodológica del estudio de múltiples biopsias gástricas, y aun conociendo los posibles errores de muestreo, decidimos tomar sólo dos biopsias gástricas de cada paciente, una del antro y otra del cuerpo gástricos para el estudio de la densidad. Las biopsias se tomaron de la misma localización en todos los sujetos.

La densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica fue determinada mediante dos métodos, uno semicuantitativo y otro automático.

3.1. Estudio semicuantitativo

El estudio morfológico de las biopsias fue el método empleado para realizar la valoración semicuantitativa de la densidad. Las preparaciones histológicas fueron estudiadas al microscopio óptico por un observador experimentado, siendo todas ellas revisadas por la misma persona. La densidad fue estimada de forma subjetiva, según la metodología de Houston (updated Sydney System) (156), escala a la que añadimos un quinto grado, determinado por abundantes microorganismos formando nichos o microabscesos. El estudio histológico es el método de referencia para el estudio de la densidad bacteriana en la mucosa gástrica. Presenta el inconveniente de estar sometido a la subjetividad del observador, dependiendo, en gran medida, de su experiencia. Para intentar disminuir la diferencia de criterios entre observadores, se introdujo una escala análoga visual, que permite una mayor concordancia entre los observadores (156). Esta escala estandarizada representa gráficamente la mucosa gástrica con distintos grados de infiltración por *H. pylori*. No obstante, la escala no logra obviar algunas dificultades del diagnóstico. Estas dificultades se hacen más aparentes en los casos en los que existe metaplasia intestinal en alguna porción de la biopsia, la cuál no suele estar colonizada por los microorganismos. La opinión de los observadores sobre si debe estimarse la densidad en la pieza entera o sólo en la región que presenta epitelio gástrico no es unánime (156).

En todas las biopsias estudiadas observamos bacterias, siendo clasificadas dentro de los grados 1, 2 y 3, es decir, presencia de escasos, frecuentes y abundantes gérmenes. En nuestro estudio encontramos que la densidad bacteriana en el antro era más frecuente que en el cuerpo gástrico (densidad

abundante en antro vs cuerpo: 45% vs 23% en los sensibles a todos los antibióticos; 63% vs 34% en los resistentes a algunos. Figura 8), lo que se ajusta a los estudios ya publicados. No pudimos establecer la significación estadística de esta relación, debido a que algunos de los subgrupos estudiados (densidad escasa en antro) estaban poco representados en la población de estudio, no siendo válida la aplicación del test estadístico. Este patrón topográfico se mantuvo tanto en los casos infectados por cepas sensibles como en los infectados por cepas resistentes a algún antibiótico. Un hallazgo interesante es que en ninguno de los individuos infectados por cepas resistentes observamos escasas bacterias en el antro (tabla 6).

La carga bacteriana fue más abundante en el caso de infección por cepas resistentes, tanto en el antro como en el cuerpo gástrico (resistentes vs sensibles: 63% vs 45% en el antro; 34% vs 23% en el cuerpo). En el cuerpo gástrico esta relación careció de significación estadística (tabla 7). En el antro gástrico no pudimos establecer la significación estadística porque algunos patrones de densidad (densidad escasa en los individuos infectados por cepas resistentes) fueron poco frecuentes entre la población de estudio, lo que invalidó el test estadístico (tabla 6). Partimos de un tamaño muestral inicial de 88 casos. Como el cultivo bacteriano fue positivo en el 93% de los sujetos, la población de estudio disminuyó a 82 casos. Al estudiar la densidad en este grupo, observamos que el patrón bacteriano escaso fue infrecuente en la población (5 casos entre los sensibles a metronidazol y ningún caso entre los resistentes a este antibiótico), por lo que sería necesario ampliar el tamaño muestral para poder conocer la significación estadística de esta relación.

3.2. Estudio morfométrico automático

La morfometría es especialmente útil para evaluar cambios cuantitativos, propósito para el cuál es superior a la descripción visual. Es de gran utilidad para cuantificar parámetros morfológicos que hasta ahora eran descritos de manera subjetiva. El grosor de la mucosa, el conteo de células o el cálculo de áreas de estructuras, por ejemplo, pueden ser calculados automáticamente con la ayuda de un analizador de imágenes, lo que elude la participación del observador, permitiendo el análisis a ciegas de las muestras. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en diversos campos de la investigación. Se ha demostrado que es un método fidedigno y reproducible para la evaluación de la severidad y extensión de la fibrosis hepática (308). Zaitoun (309) estudia el tejido hepático en pacientes con hepatitis crónica C mediante un sistema computerizado de análisis de imágenes. En las biopsias hepáticas cuantifica distintos parámetros, como el grado de esteatosis o la fracción de área de tejido con fibrosis. Aplicando este método, Oloffson (310) estudia la frecuencia y distribución de las poblaciones leucocitarias en las amígdalas palatinas y Salvato (311) establece el número y porcentaje de área que ocupa el lecho vascular en el bronquio en los pacientes asmáticos. El grupo de Mittal (312) aplica una modificación del método para medir los cambios en el grosor de la musculatura esofágica durante la deglución. En la mucosa gástrica se ha empleado para cuantificar la masa de células parietales (313), para cuantificar las células G (314) o para medir la atrofia gástrica antral (315). Valenzuela (316) estudia la densidad celular y el área canalicular de las células parietales gástricas.

Basándonos en los trabajos anteriores, nos propusimos aplicar el método morfométrico en el estudio de la densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica. No existen referencias bibliográficas de que se haya empleado anteriormente en la cuantificación bacteriana, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con otros trabajos. El procedimiento que aplicamos, y que ha quedado descrito en el método, es una variación del método diseñado por Valenzuela (316).

La densidad bacteriana media en el antro fue mayor que en el cuerpo gástrico (4.08 ± 2.25 vs 3.78 ± 2.49 , p NS) (figura 9), siendo estos resultados concordantes con los que obtuvimos con la evaluación semicuantitativa de las muestras. Estudiamos la posible relación entre la densidad bacteriana antral y la sensibilidad de las cepas a metronidazol, sin que observáramos relación estadísticamente significativa entre ellos (densidad de las cepas sensibles: 4.36 ± 2.46 ; densidad de las resistentes: 3.34 ± 1.42 , p NS). Smith (317) investiga *in vitro* el efecto de la densidad bacteriana en la activación del metronidazol. En contra de nuestra hipótesis, observa que la resistencia a metronidazol se ve comprometida cuando existe una alta densidad bacteriana en el cultivo. Este hallazgo parece ser debido a que la alta densidad bacteriana crea un microambiente con bajo redox y baja tensión de oxígeno, lo que permite que se reduzca el metronidazol y, con ello, se active.

Distintos autores han intentado encontrar métodos de medida cuantitativos, que añadan precisión y que obvien la subjetividad del observador. Rauws (318) ha utilizado el test respiratorio de la urea (UBT) como método cuantitativo para medir la carga bacteriana. En su estudio halla una buena correlación entre este método y la histología. Posteriormente, este procedimiento se ha validado en otros estudios (243). En nuestro trabajo no hemos hallado correlación entre los valores obtenidos en el test del aliento y la densidad bacteriana en la mucosa gástrica ($p=0.387$). Por tanto, pensamos que el UBT no es un método preciso para la cuantificación bacteriana en la mucosa gástrica. La precisión de la técnica depende de muchos factores, como el vaciamiento gástrico, el consumo de antibióticos o IBP en los días previos o la existencia en el estómago de otras bacterias productoras de ureasa. El resultado del test no sólo depende de la cantidad de bacterias presentes en la mucosa, sino también de la capacidad ureásica de éstas.

Atherton (301) ha desarrollado el cultivo cuantitativo como medida más reproducible que la histología para determinar la densidad bacteriana, estimando la carga bacteriana a partir del número de colonias. En el antro gástrico, la correlación entre ambos métodos fue de $r=0.44$ ($p=0.027$), mientras que en el cuerpo la relación fue más pobre ($r=0.26$, $p=0.2$). Este método también presenta limitaciones. En los casos en que la infección es abundante, más de un microorganismo puede contribuir a la formación de una sola colonia, por lo que la cuantificación de ellas no es una estimación exacta de la densidad.

El método cuantitativo desarrollado por nuestro grupo es útil como herramienta para medir la densidad bacteriana, siendo un método aplicable en investigación clínica. Como ventaja frente al método semicuantitativo, permite la

cuantificación numérica de la densidad bacteriana, estimando de forma más exacta el número de bacterias de la mucosa gástrica; por ello, este método es más preciso que el semicuantitativo para la determinación de la carga bacteriana.

Un inconveniente del método semicuantitativo, que obvia este método, es la subjetividad del observador. La lectura de la densidad, que en el método semicuantitativo depende directamente del observador y, por tanto, de su experiencia y preparación, pasa a ser un proceso automatizado, dependiente de la computadora, siendo el observador un sujeto pasivo que interviene sólo en la selección del área a estudiar. La automatización del proceso aporta reproducibilidad a la técnica. Para comprobarla, dos observadores repitieron en tres momentos diferentes las mediciones en una muestra escogida aleatoriamente, no observándose diferencias intraobservador, ni interobservador.

El método cuantitativo presenta, no obstante, ciertas limitaciones. Para que sea válido, las muestras gástricas deben presentar unas condiciones ideales, condiciones que son difíciles de reunir en la práctica diaria. Los cortes histológicos deben ser de 3 μm de espesor, conteniendo todo el grosor de la mucosa, incluyendo la *muscularis mucosa*. Los cortes deben estar bien orientados, es decir, deben observarse todas las capas celulares de la mucosa. Las glándulas deben estar cortadas longitudinalmente, para que se estime la densidad bacteriana en la glándula completa. El espesor de la mucosa y la orientación que presentan las preparaciones dependen, en gran medida, de la forma en que se toman las biopsias así como del procesado de las muestras. Los defectos en la tinción también empobrecen los resultados de la técnica, ya que interfieren en la discriminación del rango de grises que lleva a cabo la computadora, fundamental para seleccionar y extraer de la imagen de la mucosa las estructuras correspondientes a los microorganismos. Por todo ello, la precisión de la técnica depende del correcto procesado de las biopsias y de la mínima variabilidad que exista entre las preparaciones histológicas de los sujetos.

4. RESISTENCIA Y PROFUNDIDAD BACTERIANA EN LA MUCOSA

La sensibilidad a los antibióticos en *H. pylori* es mayor *in vitro* que *in vivo*, hecho que puede atribuirse a las condiciones especiales de la cavidad gástrica. Es posible que algunos antibióticos no alcancen concentraciones superiores a la CMI de *H. pylori* en la mucosa gástrica, o que éstas no permanezcan elevadas el tiempo suficiente. Cooreman (319) demuestra que la amoxicilina alcanza la CMB de *H. pylori* en la capa mucosa gástrica sólo en la mitad de los individuos tratados y que, en aquéllos en los que la alcanza, dicha concentración se mantiene menos de 60 minutos. En su trabajo observa que tanto en el fundus como en el cuerpo gástrico la concentración de los antibióticos es menor a la CMB de *H. pylori*. El estómago es, por tanto, un medio hostil para el uso eficaz de los antimicrobianos. El variable pH gástrico, la secreción activa, la gruesa capa mucosa, el vaciamiento gástrico y la descamación celular dificultan la acción farmacológica.

La terapia tópica frente a *H. pylori* es poco efectiva, debido a que no logra alcanzar concentraciones suficientes en el lugar donde las bacterias residen y se multiplican. *H. pylori* ocupa muchos nichos, adhiriéndose a las superficies celulares y habitando en el interior de las glándulas mucosas, sitios donde la difusión de los antibióticos está limitada. Se ha observado que la menor tasa de crecimiento alcanzada por las bacterias situadas en nichos provoca un aumento en la tasa de resistencias, si bien esta observación no ha sido estudiada en *H. pylori* (320, 321). Según Jorgensen (271), la situación de *H. pylori* debajo de la capa de moco y en el interior de las glándulas, lugares donde la penetración antibiótica es menor, puede explicar la propensión al desarrollo de resistencias.

Con el fin de conocer la profundidad hasta la cuál accedían las bacterias en la mucosa gástrica, estudiamos cortes histológicos de mucosa gástrica orientados, en los cuáles se apreciaban las glándulas en toda su longitud. Los cortes histológicos fueron observados al microscopio óptico a 100 aumentos. En dichas preparaciones observamos que las bacterias accedieron hasta el cuello glandular en la mayoría de los casos, tanto en el antro (87% de los sujetos) como en el cuerpo gástrico (72%).

Ante la hipótesis de que las bacterias situadas más profundamente en las glándulas adquirieran mayor tasa de resistencia, derivada de la adaptación a la exposición a concentraciones bajas del fármaco, estudiamos la relación entre la profundidad y la sensibilidad farmacológica.

En nuestro análisis observamos que la proporción de casos con infección en la glándula profunda era mayor si la infección se debía a cepas resistentes a algún antibiótico que a cepas sensibles, tanto en el antro (20% vs 5%) como en el cuerpo gástrico (27% vs 15%), aunque esta relación careció de significación estadística. No existen precedentes en la literatura que hayan estudiado esta relación y puedan, por tanto, corroborar estos resultados. De nuestros resultados se deriva el hecho de que, probablemente, la menor eficacia farmacológica relacionada con la situación de las bacterias en la mucosa se deba a un mecanismo de dosis farmacológica y no a un mecanismo de resistencia.

Otros autores han estudiado la relación entre la situación de *H. pylori* en la mucosa gástrica y la resistencia de este microorganismo a los antimicrobianos. Mégraud (322), a través de un modelo *in vitro*, observa que la sensibilidad a amoxicilina es mayor en las cepas de *H. pylori* que se encuentran dispersas en el moco que en aquéllas que están adheridas a las células. En contraposición, Simala-Grant (323) observa que la adherencia de esta bacteria a las células de cultivo celulares humanos no incrementa la resistencia a los antimicrobianos. Este autor demuestra que la sensibilidad a claritromicina y amoxicilina es idéntica en los microorganismos adheridos y en los dispersos en el moco.

Varios autores (324, 325) han observado la presencia de *H. pylori* en el interior de las células epiteliales gástricas. Björkholm (326) demuestra el proceso de invasión activa de las bacterias hasta situarse en el citoplasma celular. Es posible que esta localización constituya un santuario para las bacterias, donde son resistentes a los antibióticos de acción extracelular, como la amoxicilina.

5. RESISTENCIA Y FENOTIPO BACTERIANO

La determinación del fenotipo bacteriano fue realizada mediante un ensayo tipo Western Blot en suero, que nos permitió la determinación en el suero de los pacientes de la presencia de anticuerpos frente a CagA y VacA. Actualmente la PCR es considerada como la técnica de referencia para la detección de los factores de virulencia *cagA* y *vacA*. Esta técnica determina el genotipo bacteriano en muestras gástricas, siendo más sensible y específica que el Western Blot en suero. Otra ventaja frente a éste es que permite la determinación de los subtipos s y m del gen *vacA*, subtipos relacionados con la virulencia. Como inconvenientes, es mucho más cara y requiere mayor especialización que el Western Blot, motivos que nos hicieron escoger ésta como técnica diagnóstica.

El fenotipo CagA estuvo presente en el 78.8% de las cepas aisladas. El 37% de las cepas CagA-positivas presentaron resistencia a metronidazol, y el 13% de ellas, a claritromicina, sin observarse relación significativa entre el fenotipo CagA y la resistencia. El fenotipo VacA estuvo presente en el 54.5% de las cepas aisladas. El 36% de las cepas VacA-positivas fueron resistentes a metronidazol y el 10%, a claritromicina. Tampoco se observó relación significativa entre el fenotipo VacA y la resistencia de las cepas a metronidazol y a claritromicina.

Existen pocos trabajos en la literatura que hayan estudiado la relación entre el fenotipo bacteriano y la resistencia. Dámaso (327) publicó un estudio donde observa que las cepas más virulentas (*cagA*-positivo y *vacA s1*) muestran menores porcentajes de resistencia a claritromicina y metronidazol. En nuestro estudio, observamos que las cepas CagA-positivas presentaban un menor porcentaje de resistencia a metronidazol (CagA-positivas vs CagA-negativas: 37% vs 42%), pero no a claritromicina (CagA-positivas vs CagA-negativas: 13% vs 8%), si bien sin diferencias significativas. La determinación del genotipo en el estudio de Dámaso fue llevada a cabo mediante PCR. El método empleado por él para la determinación de la sensibilidad fue dilución en agar, mientras que nuestro grupo utilizó el E-test. La diferente metodología empleada en ambos trabajos puede explicar la diferencia observada en los resultados.

Otros autores han estudiado la relación entre el genotipo bacteriano y el fracaso terapéutico frente a *H. pylori*. López-Brea (328) no halla relación entre los genotipos de las cepas y el fallo terapéutico frente a ellos, como sería esperable si hubiera relación entre los genotipos de las cepas y la resistencia de éstas. Van Doorn (329), por el contrario, observa que la eficacia del tratamiento es significativamente mayor en los sujetos infectados por cepas *cagA+/vacA s1*. Atribuye este hecho a que estas cepas, más virulentas, provocan mayor inflamación de la mucosa, siendo éste el ambiente donde mejor difunden los antibióticos. Broutet (330) coincide en sus hallazgos con los de Van Doorn, ofreciendo otra posible explicación. Según este autor, el crecimiento de las cepas *cagA+* podría ser más rápido que el de las *cagA-*, por lo que los fármacos serían más eficaces en dichas cepas, al ser éstos más activos durante la división celular. Tras los resultados obtenidos en nuestro estudio, podríamos concluir que no hemos encontrado relación entre el fenotipo de *H. pylori* y la resistencia de esta bacteria a los antimicrobianos.

VI.- Conclusiones

1. El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basó en la positividad del cultivo o de dos o más de las siguientes pruebas: test de la ureasa rápida, histología, serología o test del aliento. Bajo estos criterios, la sensibilidad del test de la ureasa rápida para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* fue del 96%, de la serología del 89%, del estudio histológico del 95%, del test del aliento del 91% y del cultivo del 93% .
2. En nuestra área sanitaria, la prevalencia de resistencia primaria de *H. pylori* a metronidazol es del 39%, a claritromicina, del 5% y a ciprofloxacino, del 5%. No se han observado resistencias a tetraciclina ni a amoxicilina.
3. La tasa de resistencia secundaria de *H. pylori* a metronidazol es del 65%, a claritromicina del 45% y a ciprofloxacino del 15%.
4. La tasa de resistencia de *H. pylori* a metronidazol es significativamente mayor en las mujeres que en los hombres (59% vs 36%, $p=0.032$). No hemos observado diferencias en función del sexo en la tasa de resistencia a claritromicina y ciprofloxacino.
5. En nuestro estudio no hemos observado que el consumo de tabaco, AINES o antibióticos influyan en la tasa de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos.
6. El fracaso previo en el tratamiento de la infección por *H. pylori* se asocia, de forma significativa, con la resistencia a metronidazol (tratados vs no tratados: 65% vs 39%, $p=0.036$) y a claritromicina (tratados vs no tratados: 45% vs 5%, $p<0.0005$).
7. La tasa de resistencia a metronidazol y ciprofloxacino se eleva tras el fracaso del tratamiento erradicador frente a *H. pylori*, aunque estos fármacos no se utilicen en la pauta erradicadora.
8. Los individuos infectados por cepas de *H. pylori* resistentes a los antimicrobianos presentan una mayor densidad bacteriana en la mucosa antral que los infectados por cepas sensibles, aunque no pudimos establecer la significación estadística de esta relación. No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la densidad bacteriana en el cuerpo gástrico y la resistencia de las bacterias a los antibióticos.
9. El método morfométrico automático desarrollado por nuestro grupo es un método reproducible, con aplicaciones en investigación clínica.
10. En nuestra experiencia, el porcentaje de sujetos con infección por *H. pylori* situada en la profundidad glandular fue mayor cuando la infección se debía a bacterias resistentes a algunos de los antibióticos que a bacterias sensibles, aunque no encontramos significación estadística.
11. No encontramos relación entre los fenotipos bacterianos CagA y VacA y la resistencia de *H. pylori* a metronidazol y claritromicina.

VII.- Bibliografía

1. Kidd M, Modlin IM. A century of *Helicobacter pylori*. Paradigms lost-paradigms regained. Digestion 1998; 59/1:1-15.
2. Black JW. Histamine H-receptor antagonists and gastric acid secretion – a progress report. Klin-Wochenschr 1976;54(19):911-4.
3. Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. J Clin Pathol 1975;28:639-646.
4. Warren RJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1:1273.
5. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. Med J Aust 1985;142:436-439.
6. Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol 1987;82:192-199.
7. Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1:1273.
8. McNulty CA, Gearty JC, Crump B, Davis M, Donovan IA, Melikian V, Lister DM, Wise R. *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis: Investigator blind, placebo controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate. Br Med J (Clin Res Ed) 1986;293:645-649.
9. Borody TJ, Cole P, Noonan S, Morgan A, Lenne J, Hyland L, Brandl S, Borody EG, George LL. Recurrence of duodenal ulcer and *Campylobacter pylori* infection after eradication. Med J Aust 1989;151:431-435.
10. Graham DY, Lew GM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD. Effect of triple therapy (antibiotics plus bismuth) on duodenal ulcer healing. A randomized controlled trial. Ann Intern Med 1991;115:266-269.
11. Graham DY, Lew GM, Klein PD, Evans DG, Evans DJ, Saeed ZA, Malaty HM. Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. A randomized, controlled study. Ann Intern Med 1992;116:705-718.
12. NIH Consensus Conference. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 272:65-69.
13. Anonymous. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61:1-241.
14. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. Eur J Microbiol Infect Dis 1990;9:1-13.
15. Hazell SL. Microbiology and taxonomy of *Helicobacter pylori* and related bacteria. En: Marshall BJ, McCallum RW, Guerrant RL (Eds). *Helicobacter pylori* in peptic ulceration and gastritis. Blackwell Scientific Publications, Boston 1991;19-31.
16. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Gorelick Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp nov, a microaerophilic

- bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 1993;32:1238-1245.
17. Fox JG, Yan LL, Dewhirst FE, Paster BJ, Shames B, Murphy JC, Hayward A, Belcher JC, Mendes EN. *Helicobacter bilis* sp nov, a novel *Helicobacter* species isolated from bile, liver, and intestinal of aged, inbred mice. J Clin Microbiol 1995;33:445-454.
 18. Bode G, Mauch F and Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993;111:483-490.
 19. Nilius M, Strohle A, Bode G and Malfertheiner P. Coccoid like forms of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993;280:259-272.
 20. Taylor DE, Eaton M, Chang N and Salama SM. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. J Bacteriol 1992;174:6800-6806.
 21. Kersulyte D, Akopyants NS, Clifton SW, Roe BA, Berg DE. Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. Gene 1998;223:175-186.
 22. Dunn BE, Campbell GP, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1990;265:9464-9469.
 23. Go MF, Kapur V, Graham DY and Musser JM. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. J Bacteriol 1996;178:3934-3938.
 24. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, Van der Ende A and Van Doorn LJ. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol Microbiol 1999;32:459-470.
 25. Alm RA, Lee LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B et al. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999;397:176-180.
 26. Doig P, Exner M, Hancock R and Trust T. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1995;177:5447-5452.
 27. Ilver D, Arnquist, Ogren J, Frick I, Kersulyte D et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science 1998;279:373-377.
 28. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock RE, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. analysis of the outer membrane protein families. Infect Immun 2000;68:4155-4168.
 29. Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB and Dunn BE. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock

- protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 1996;64:905-912.
30. Exner MM, Doig P, Trust TJ and Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995;63:1567-1572.
 31. Appelmek BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T et al. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 1996;64:2031-2040.
 32. Mendz GL, Burns BP, Hazell SL. Characterisation of glucose transport in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Acta* 1995;1244:269-276.
 33. Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. The Entner-Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*. *Arch Biochem Biophys* 1994;312:349-356.
 34. Mendz GL, Hazell SL. Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*. *J Biochem Cell Biol* 1995;27:1085-1093.
 35. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(suppl.1):43-53.
 36. Mégraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;115:1278-1282.
 37. Smith MA, Edwards DI. The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:453-61.
 38. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:115-20.
 39. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdXa) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998;28(2):383-93.
 40. Debets-Ossenkopp, Goodwin A, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Pot RGJ et al. IS605 insertion in the nitroreductase (rdxA) gene is responsible for metronidazole resistance in *H. pylori* NCTC11638. *Gut* 1998;43(suppl 2):A1.
 41. Glupczynski Y and European Multicenter Study Group on antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicenter European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:777-781.
 42. Glupczynski Y, Burette A, De Koster E y cols. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:976-977.
 43. Ching CK, Leung KP, Yung RWH, Lam SK et al. Prevalence of metronidazole resistant *Helicobacter pylori* strains among Chinese peptic ulcer disease patients and normal controls in Hong Kong. *Gut* 1996;38:675-678.

44. Dekoster E, Cozzoli A, Jonas C, Ntounda R, Butzler JP, Deltenre M. Resistance of *Helicobacter pylori* to macrolides and imidazoles: a six years surveillance study. *Gastroenterology* 1996;110:A9307.
45. Glupczynski Y, Burette A, Lamy V, Garrino MG. Evolution of *H. pylori* primary resistance to antimicrobial agents in Belgium between 1995 and 1998. *Gut* 1998;43(suppl 2):A48.
46. Van Zwet AA, De boer WA, Scheeberger PM et al. Prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:861-864.
47. Van der Wouden EJ, Van Zwet AA, Vosmaer GD et al. Rapid increase in the prevalence of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in the Netherlands. *Emerg-Infect-Dis* 1997;3(3):385-9.
48. López-Brea M, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997;40:279-281.
49. Banatvala N, Davies GR, Abdi et al. High prevalence of *H. pylori* metronidazole resistance in migrants to east London: relation with previous nitromidazole exposure and gastroduodenal disease. *Gut* 1994;35:1562-1566.
50. Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, Capobianco. Tight binding of clarithromycin, its 14-R-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1496-500.
51. Graham D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 1998;115:1272-1277.
52. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Mégraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(12):2724-2728.
53. Versalovic J, Shortridge D, Kliber K. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477-480.
54. Van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG et al. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1500-1504.
55. Taylor DE, Zhongming GE, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequences analysis of two copies of a 23 rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2621-2628.
56. Hultén K, Gilbreel A, Sköld O, Engstrand L. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2550-2553.

57. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Pina MP, Reddy R et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:283-286.
58. Weissfeld A, Haber M, Rose P, Kids S, Siejman N. Geographical distribution in the United States of primary resistance to clarithromycin and metronidazole in patients infected with *Helicobacter pylori* (abstr). *Gastroenterology* 1997;112:A328.
59. Best ML, Haldane DJM, Bezanson GS, Veldhuyzen van Zanten SJO. *Helicobacter pylori*. primary susceptibility to clarithromycin *in vitro* in Nova Scotia. *Can J Gastroenterol* 1997;11:298-300.
60. Bazzoli F, Zagari RM, Mégraud F, Pozzato P et al. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in a large population of duodenal ulcer patients in Italy. *Gut* 2000;47(suppl III):A343.
61. Boyanova L, Stancheva I, Spassova Z et al. Primary and combined resistance to four antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* in Sofia, Bulgaria. *J Med Microbiol* 2000;49(5):415-8.
62. Gisbert JP, Pajares JM. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina en España. Una revisión sistemática. *Med Clin (Barc)* 2001;116:111-116.
63. Ferrero M, Ducons JA, Montoro M, Santolaria S, Sicilia B, Gomollón F. Análisis de la resistencia de *Helicobacter pylori* a antibióticos en nuestro medio. *Gastroenterol Hepatol* 1999;22:552.
64. Rojas M, Suárez AI, Conejo C, Hergueta P, Romero R, Herrerías JM. Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos en un área hospitalaria de Sevilla. *Rev Esp Enf Dig* 2000;92:793-5.
65. Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. PBP-D a novel penicillin-binding protein is involved in amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;114:A109.
66. DeLoney C, Schiller NL. Characterization of an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(12):3368-3373.
67. Van Zwet AA, Vandenbrouke-Grauls CMJE, Thijs JC et al. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998;352,1595.
68. Dunn BE, Cohen H and Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:720-741.
69. Realdi G, Dore MP, Atzei M, Carta A et al. Importance of antibiotic resistance for choosing the best therapy for *H. pylori*. *Gut* 1998;43 (Suppl 2):A83.
70. Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:107-111.

71. Burette A, Glupzinsky Y, Deprez C et al. Omeprazol alone or in combination with clarithromycin for eradication of *H. pylori*: results of randomized double-blind controlled study. *Gastroenterology* 1993;104:49.
72. Glupzinsky Y, Labbé M, Burette A et al. Treatment failure of ofloxacin in *Campylobacter pylori* from the stomach. *J Antimicrob Chemoter* 1998;22:92-95.
73. Mégraud F, Bouffant F, Camous-Juncas C. *In vitro* activity of rifaximin against *H. pylori*. *Eur J clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(14):184-186.
74. Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE y cols. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: Public health implications. *Infect Immun* 1994;62:2367-2374.
75. Mégraud F, Broutet N. Review article: have we found the source of *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14 (suppl 3):7-12.
76. Grubel P, Hoffman S, Chong FK, Barstein NA, Mepani C, Cave DR. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1300-1303.
77. Osato MS, Ayub K, Le HH, Reddy R, Graham DY. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1998;36/9:2796-2788.
78. Husson MO, Legrand D, Spik G, Leclerc H. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*. Importance of human lactoferrin. *Infect Immun* 1993;61:2694-2697.
79. Mujumdar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol* 1990;9:271-272.
80. Ferguson DA, Li CH, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993;31:2802-2804.
81. Shames B, Krajden S, Fuksa M, Babida C, Penner JL. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol* 1989;27:2849-2850.
82. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992;340:1194-1195.
83. Albenque M, Tall F, Mégraud F. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Rev Esp Enferm Dig* 1990;48(supl 1):48.
84. Miyaji H, Kohli Y, Azuma T y cols. Endoscopic cross-infection with *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1995;345:464.
85. Gullini S, Boccini S, Contarini D y cols. Is transmission of *Campylobacter pylori* by endoscopy examination possible? *Endoscopy* 1988;20:162.
86. Mégraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989;27:1870-1873.

87. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* 1991;100:1495-1501.
88. Teh BH, Lin JT, Pan WK y cols. Seroprevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Taiwan. *Anticancer Res* 1994;14:1389-1392.
89. Morris A, Nicholson G, Lloyd G, Haines D, Rogers A, Taylor D. Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*. *N Z Med J* 1986;99:657-659.
90. Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL y cols. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* 1991;88:578-582.
91. Eurogast Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* 1993;34:1672-1676.
92. Malaty HM, Engstrand L, Pederson N, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* 1994;120:982-986.
93. Pounder RN, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:(Suppl 2):33-39.
94. Pérez-Pérez GI, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med* 1988;109:11-17.
95. Bateson MC. *Helicobacter pylori* infection with age. *Lancet* 1992;339:1121.
96. Blecker U, Mehta DI, Vandenplas Y. Sex ratio of *Helicobacter pylori* infection in childhood. *Am J Gastroenterol* 1994;89:293.
97. Reina J, Salva F, Alomar P. Análisis de la prevalencia de anticuerpos anti-*Campylobacter pylori* detectados en la población humana sana. *Rev Esp Enferm Dig* 1989;76:151-154.
98. Alfonso V, González-Granda D, Alonso C y cols. ¿Los pacientes con úlcera duodenal transmiten el *Helicobacter pylori* a sus familiares? *Rev Esp Enferm Dig* 1995;87:109-113.
99. Navarro F, Coll P, Sainz S y cols. Evaluación de dos preparados comerciales para la detección de anticuerpos específicos de *Helicobacter pylori* en pacientes sometidos a gastroscopia. Estudio de la seroprevalencia en la población asintomática. *Enf Infec Microbiol Clin* 1992;10:190-194.
100. Boixeda D, Martín de Argila C, Cantón R, Álvarez Baleriola I, Gisbert JP y cols. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos sintomáticos. *Rev Esp Enf Digest* 1994;86:569-576.
101. Mur Villacampa M, Gimeno Esteras E, Guerrero Navarro L, Cabeza Lamban F, Sainz Samitier R. Prevalencia del *Helicobacter pylori* en patología gástrica en Aragón. *Rev Esp Enferm Dig* 1992;82:311-316.
102. Hergueta P, Salas E, Rojas M, Gómez B, Romero R, González Vilches J y Herrerías JM. Seroprevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en

- donantes de sangre en Sevilla. En: Libro de la VII Reunión del Servicio de Aparato Digestivo Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, 1999.
103. Parsonnet JE. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9(suppl 2):45-52.
 104. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Peña S, Midolo P et cols. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999;116:823-830.
 105. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997;40:701-703.
 106. Marais A, Monteiro L, Lamouliatte H, Samoyeau R, Mégraud F. Cag-negative status of *Helicobacter pylori* is a risk factor for failure of PPI-based triple therapies in non-ulcer dyspepsia. *Gastroenterology* 1998;114:A214.
 107. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with cagA positive or cagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301.
 108. Patchett S, Beattie S, Leen E, Keane C, O'Morain C. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer recurrence. *Am J Gastroenterol* 1992;87:24-27.
 109. Xia HX, Gilvarry J, Beatte S, Hamilton H, Keane Ct, Sweeney EC et al. Recrudescence of *Helicobacter pylori* infection in patients with healed duodenal ulcer after treatment with different regimens. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1221-1225.
 110. Gisbert JP. Reinfeción por *Helicobacter pylori* tras su erradicación: ¿Un temor infundado? *Med Clin* 1998;111:380-384.
 111. Coelho LGV, Passo MC, Chausson Y, Costa EL, Maia AF, Branao MJ et al. Duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. A 18 months follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:362-366.
 112. Nayoung K, Seon HL, Kye HL, Hyun CJ, In SS, Chung YK et al. *H. pylori* reinfection rate and duodenal ulcer recurrence (resumen). Washington, DC:Digestive Disease Week, 1997;A-926:3696.
 113. Gosciniak G, Przondo-Mordarska A, Poniwierka E. Serological and microbiological results of a 48-months follow-up: recurrence of *Helicobacter pylori* infection after eradication (resumen). *Gut* 1995;37(Supl 1):95.
 114. Aydin A, Ersöz G, Özütemiz Ö, Tuncyürek M, Cavusoglu H. Reinfection rate of *Helicobacter pylori* infection in Türkiye, a developing country (resumen). *Gut* 1996;39(supl 3):61.
 115. Goh KL, Navaratnam P, Peh SC. Reinfection and duodenal ulcer relapse in south-east Asian patients following successful *Helicobacter pylori* eradication: results of a 2 years follow-up. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1157-1160.

116. Boulai Mr, Khediri MF, Ben Rejeb A, Abdelli MN, Hila A, Ben Moussa M et al. Low reinfection rate of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients (resumen). Washington, DC. Digestive Disease Week, 1997;A-926:3697.
117. Mitchell HM, Hu PJ, Chen MH, Chi Y, Li YY, Hazell SL. Low rate of reinfection in duodenal ulcer patients from a country with a high prevalence of *Helicobacter pylori* infection (resumen). Gut 1997;41(supl 1):34.
118. Monés J, Sáinz S, Sola-Vera J, Ricart E, Sancho FJ, Balanzó J. *Helicobacter pylori* eradication with omeprazole, amoxicillin and clarithromycin: one week versus two weeks and reinfection rate at one year (resumen). Washington, DC: Digestive Disease Week, 1997;A-553:2206.
119. García Valriberas R, Santander C, Moreno Monteagudo JA, García Grávalos R, Pajares JM. Annual reinfection rate in *Helicobacter pylori*+ peptic ulcers in patients from Spain succesfully eradicated (resumen). Gastroenterology 1996;110(supl):114.
120. Rowland M, Kumar D, O'Connor P, Daly LE, Drumm B. Reinfection with *Helicobacter pylori* in children (resumen). Washington, DC: Digestive Disease Week, 1997;A-1122:4478.
121. Gisbert JP, Boixeda D, Martín de Argila C, Bermejo F, Moreno L, Ramos F et al. Estudio de la incidencia y de las variables que influyen en la reinfección por *Helicobacter pylori* tras su erradicación. Revista de la Asociación Castellana de Aparato Digestivo 1998; 14:47-56.
122. Borody TJ, Andrews P, Mancuso N, McCauley D, Jankiewicz E, Ferch N et al. *Helicobacter pylori* reinfection rate, in patients with cured duodenal ulcer. Am J Gastroenterol 1994;89:529-532.
123. Bell GD, Powell KU. *Helicobacter pylori* reinfection after apparent eradication-the Ipswich experience. Scand J Gastroenterol 1996;31(supl 215):96-104.
124. Manés G, Domínguez-Muñoz JE, Uomo G, Gigliotti T. Maintenance therapy with ranitidine enhances reinfection with *Helicobacter pylori* after succesful eradication (resumen). Gut 1996;39(supl 2):21.
125. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect Immun 1989;57:1119-1125.
126. Doig P, De Jonge BL, Alm RA, Brown ED, et al. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. Microbiol Mol Biol Rev 1999;63:675-707.
127. Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H and Opferkuch W. Ultraestructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1995;38:371-377
128. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 1993;262:1892-1895.

129. Wirth HP, Yang M, Karita M, Blaser MJ. Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis^x and Lewis^y by *Helicobacter pylori* isolates is related to cagA status. *Infect Immun* 1996;64:4598-4605.
130. Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ, Graham DY, Lee CH. Cloning and nucleotide sequence and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1993;175:674-683.
131. Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JJ, Sobala G, Rathbone BJ, Axon AT et al. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* 1990;31:134-138.
132. Trust TJ, Doig P, Emody L, Kienle Z, Wadström T, O'Toole P. High affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1991;59:4398-4404.
133. Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterology* 1992;102:720-727.
134. Bode G, Malfertheiner P, Lehnhardt G, Nilius M, Ditschuneit H. Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med Microbiol Immunol* 1993;182:233-242.
135. Xu JK, Goodwin CS, Cooper M, Robinson J. Intracellular vacuolization caused by the urease of *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 1990;161:1302-1304.
136. Vargas M, Lee A, Fox JG, Cave DR. Inhibition of acid secretion from parietal cells by non-human-infecting *Helicobacter* species: A factor in colonization of gastric mucosa? *Infect Immun* 1991;59:3694-3699.
137. Langton SR, Cesareo SC. *Helicobacter pylori* associated phospholipase A₂ activity: a factor in peptic ulcer production? *J Clin Pathol* 1992;45:221-224.
138. Salmela KS, Roine RP, Koivisto T, Höök-Nikane J, Kosunen TU, Salaspuro M. Characteristics of *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. *Gastroenterology* 1993;105:325-330.
139. Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994;269:10566-10573.
140. Atherton JC, Cao P, Peek RMJ, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-17777.
141. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:92-99.
142. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of

- Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided in two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995;63:94-98.
143. Pan ZJ, Van der Hulst RWM, Feller M, Xiao SD, Tygat GNJ, Dankert J et al. Equally high prevalences of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* in chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis- associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1344-1347.
 144. Peek RM, Thompson SS, Atherton JA, Blaser MJ, Miller GG. Expression of iceA, a novel ulcer-associated *Helicobacter pylori* gene, is induced by contact with gastric epithelial cells and is associated with enhanced mucosal IL-8. *Gut* 1996;39(Suppl 2):A71.
 145. Mooney C, Keenan J, Munster D, Wilson I, Allardyce R, Bagshaw P et al. Neutrophil activation by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1991;32:853-857.
 146. Evans DJ Jr, Evans DJ, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995;63:2213-2220.
 147. Kurose I, Granger DN, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Miyasaka M et al. *Helicobacter pylori*-induced microvascular protein leakage in rats: role of neutrophils, mast cells, and platelets. *Gastroenterology* 1994;107:70-79.
 148. Rachmilewitz D, Karmeli F, Elizkim R, Stalnikowica R, Ackerman Z, Amir G et al. Enhanced nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients. *Gut* 1994;35:1394-1397.
 149. Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. Helicobacter-specific cellmediated immune response displays a predominant Th₁ phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol* 1996;156:4729-4738.
 150. Quintero Carrión E, Salido Ruiz E. Influencia de *Helicobacter pylori* y del huésped en la patogenia de la úlcera péptica. *Gastroenterología y Hepatología* 1998;21(Supl 1):8-14.
 151. Azuma T, Konishi J, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T et al. Contribution of HLA-DZA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1994;343:542-543.
 152. Bontkes HJ, Veenendaal RA, Pena AS et al. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in patients with chronic active gastritis and duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:129-33.
 153. Mitchell HM, Mascord K, Hazell SL and Daskalopoulos G. Association between the IgG subclass response, inflammation and disease status in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:149-155.
 154. Owen DA. The morphology of gastritis. *Yale J Biol Med* 1996;69(1):51-60.
 155. Price AB. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:209-22.

156. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996;20:1161-1181.
157. Stolte M, Stadelmann O, Bethke B, Burkard G. Relationships between the degree of *Helicobacter pylori* colonisation and the degree of gastritis, surface epithelial degeneration and mucus secretion. Z Gastroenterol 1995;33:89-93.
158. Stolte M, Eidt S. Chronic erosions of the antral mucosa: a sequela of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. Z Gastroenterol 1992;30:846-50.
159. Graham DY, Genta RM. Reinfection with *Helicobacter pylori*. In: Hunt RH, Tytgat GNJ, eds. *Helicobacter pylori*. basic mechanisms to clinical cure. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994:113-20.
160. Solcia E, Villani L, Fiocca R et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* on gastritis in duodenal ulcer patients. Scand J Gastroenterol Suppl 1994;201:28-34.
161. Genta RM. Recognizing atrophy: another step toward a classification of gastritis. Am J Surg Pathol 1996;20(suppl 1):S23-S30.
162. Tosi P, Filipe MI, Luzi P et al. Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. J Pathol 1993;169:73-78.
163. Iida F, Kusama J. Gastric carcinoma and intestinal metaplasia; significance of types of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. Cancer 1982;50:2854-2858.
164. Segura DI, Montero C. Histochemical characterization of different types of intestinal metaplasia in gastric mucosa. Cancer 1983;52:498-503.
165. Barwick KW. Chronic gastritis. The pathologist's role. Pathol Ann 1987;22 (pt 2):223-251.
166. Genta RM, Güver IE, Graham DY, Krishnan B, Segura AM, Gutiérrez O, Kim JG, Burchette JL. Adherence of *Helicobacter pylori* to areas of incomplete intestinal metaplasia in the gastric mucosa. Gastroenterology 1996;111:1206-1211.
167. Hiroyoshi O, Tsutomu K, Shigemi N, Hala E, Kim JG, Graham DY, Genta RM. Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. Human Pathol 1998;29(8):846-850.
168. Silva S, Filipe MI, Pinho A. Variants of intestinal metaplasia in the evolution of chronic atrophic gastritis and gastric ulcer. A follow up study. Gut 1990;31:1097-1104.
169. Guidelines for clinical trials in *Helicobacter pylori* infection. Technical annex: test used to assess *Helicobacter pylori* infection. Gut 1997;41 (Suppl 2):S10-S18.

170. Gisbert JP. Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol 2000;23:135-143.
171. Sáinz R, Borda F, Domínguez E, Gisbert JP, Grupo Conferencia Española de Consenso. Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Esp Enferm Digest 1999;91:777-784.
172. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology 1995;109:136-141.
173. Negrini R, Lisato L, Cavazzini L, Maini P, Gullini S, Basso O et al. Monoclonal antibodies for specific immunoperoxidase detection of *Campylobacter pylori*. Gastroenterology 1989;96:414-420.
174. Husson MO, Leclercq H. Detection of *Helicobacter pylori* in stomach tissue by use of a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1991;29:2831-2834.
175. Montgomery EA, Martin DF, Peura DA. Rapid diagnosis of *Campylobacter pylori* by Gram's stain. Am J Clin Pathol 1988;90:606-609.
176. Pérez-Trallero E, Montes M, Alcorta M, Zubillaga P, Tellería E. Non-endoscopic method to obtain *Helicobacter pylori* for culture. Lancet 1995;345:622-623.
177. Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon A, Deltenre M, Dixon M et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. Lancet 1999;354:30-33.
178. Bermejo G, Boixeda D, Gisbert JP, Redondo C, Moreira V, San Román AL et al. Concordancia entre la prueba rápida de la ureasa y los métodos histológicos para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en la úlcera gástrica. Rev Esp Enferm Dig 1997;89(Supl 1):78.
179. Stone G, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J et al. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23 rRNA gene mutations in clarithromycin-resistance *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:712-714.
180. Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP, Mégraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. J Clin Microbiol 1998;36(11):3285-90.
181. Logan RPH. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. Gut 1998;43 (Supl 1):S47-S50.
182. Martín de Argila C, Boixeda D, Cantón R, Valdezate S, Mir N, De Rafael L et al. Usefulness of the combined IgG and IgA antibody determinations for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997;9:1191-1196.
183. Kosunen TU, Seppälä K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM titres after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1992;339:893-895.

184. Chey WD, Murthy U, Shay S, Zawadski A, Montague W, Lincheer W et al. A comparison of three fingerstick, whole blood antibody tests for *Helicobacter pylori* infection: a United States, multicenter trial. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1512-1516.
185. Graham DY, Malaty HM, Go MF. Are there susceptible hosts to *Helicobacter pylori* infection? *Scand J Gastroenterol* 1994;29(suppl.205):6-10.
186. Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Blaser MJ, Cover TL. Specific *Helicobacter pylori* vacA genotypes are associated with presence of duodenal and gastric ulceration, and degree of gastric inflammation. *Gut* 1995;37(suppl 1):A3.
187. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Mutation of the cytotoxin-associated cagA gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994;62:2609-2613.
188. Tee W, Lambert JR, Dwyer B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J Clin Microbiol* 1995;33:1203-1205.
189. Martín Guerrero JM, Hergueta Delgado P, Esteban Carretero J, Romero Castro R, Pellicer Bautista FJ, Herrerías Gutiérrez JM. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA-positive strains: gastroduodenal peptic lesions marker. *Rev Esp Enf Dig* 2000;92(3):160-73.
190. Coghlan JG, Gilligan D, Humphries H y cols. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers. A 12-month follow-up study. *Lancet* 1987;2:1109-1112.
191. George LL, Borody TJ, Andrews P y cols. Cure of duodenal ulcer after eradication of *Helicobacter pylori*. *Med J Aust* 1990;153:145-148.
192. Borody TJ, George LL, Brandl S y cols. Smoking does not contribute to duodenal ulcer relapse after *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1390-1393.
193. Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJE y cols. Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven-year follow up. *Lancet* 1994;343:258-261.
194. Hosking SW, Ling TKW, Chung SCS y cols. Duodenal ulcer healing by eradication of *Helicobacter pylori* without anti-acid treatment: Randomised controlled trial. *Lancet* 1994;343:508-510.
195. Gisbert JP, Boixeda D, Martín de Argila C, Álvarez de Baleriola I, Abraira V, García Plaza A. Unhealed duodenal ulcers despite *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:643-650.
196. Graham DY, Hepps KS, Ramírez GM, Lew GM, Saeed ZA. Treatment of *Helicobacter pylori* reduces the rate of rebleeding in peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:939-942.
197. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HPM. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9 (Suppl 2):59-69.

198. Boixeda D, Gisbert JP, Cantón R y cols. *Helicobacter pylori*, úlcera gástrica y antiinflamatorios no esteroideos. Med Clin (Barc)1996;106:209-212.
199. Heresbach D, Raoul JL, Donnio PY y cols. *Helicobacter pylori*. A risk and severity factor in NSAIDs induced gastropathy. Gastroenterology 1991;100:A82.
200. Graham KY, Lidsky MD, Cox AM. Long-term nonsteroidal antiinflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology 1991;100:1653-1656.
201. Laine L, Marin-sorensen M, Weinstein WM. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastric ulcers do not require *Helicobacter pylori* for their development. Am J Gastroenterol 1992;87:1398-1402.
202. Chan FKL, Sung JJY, Chung SCS, et al. Randomised trial of eradication of *Helicobacter pylori* before non-steroidal anti-inflammatory drug therapy to prevent peptic ulcers. Lancet 1997;350:975-79.
203. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C y cols. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht Consensus Report. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997;9:1-2.
204. Malfertheiner P et al. Current Concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht Consensus Report 2000 (en prensa)
205. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS y cols. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. Lancet 1995;345:1525-1528.
206. Correa P, Fox J, Fontham E y cols. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. Serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. Cancer 1990;66:2569-2574.
207. Crespi M, Citarda F. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: What is the real risk. Gastroenterology 1998;6/1:16-20.
208. Menegatti M, Vaira D, Miglioli M y cols. *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer and nongastric cancer. Am J Gastroenterol 1995;90:1278-1281.
209. Loffeld RJ, Willems I, Flendrig JA, Arends JW. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. Histopathology 1990;17:537-540.
210. Sipponen P. Gastric cancer-A long-term consequence of *Helicobacter pylori* infection? Scand J Gastroenterol 1994;29(Suppl 201):24-27.
211. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation. BMJ 1991;302:1302-1305.
212. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-1131.

213. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991;325:1132-1135.
214. Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Lancet 1993;341:1359-1362.
215. Hansson L, Engstrand L, Nyren O y cols. *Helicobacter pylori* infection: Independent risk in indicator of gastric adenocarcinoma. Gastroenterology 1993;105:1098-1103.
216. Isaacson PG, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer 1983;52:1410-1416.
217. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group- Blood 1994;84:1361-1392.
218. Taal BG, Boot H, Van Heerde P et al. Primary non-Hodgkin lymphoma of the stomach: endoscopic pattern and prognosis in low versus high grade malignancy in relation to the MALT concept. Gut 1996;39:556-561.
219. Hussen T, Isaacson PG, Crabtree JEE, Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. Lancet 1993;342:571-574.
220. Crabtree JE, Spencer J. Immunologic aspects of *Helicobacter pylori* infection and malignant transformation of B cells. Semin Gastrointest Dis 1996;7:30-40.
221. Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. Blood 1995;85:2000-2004.
222. Wotherspoon AC, Pan LX, Tiss TC, Isaacson PG. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. Cancer Genet Cytogenet 1992;58:35-38.
223. Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM et al. T(11,18)(q21,q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. Ann Oncol 1997;8:979-985.
224. Domínguez Muñoz JE. Linfoma MALT. Revis Gastroenterol 1998;1:187-198.
225. Penston JG and McColl KEL. Eradication of *Helicobacter pylori*. an objective assessment of current therapies. Br J Clin Pharmacol 1997;43:223-243.
226. Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L y cols. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994;330:1267-1271.
227. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC y cols. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993;342:575-577.
228. Uemura N, Mukai T, Okamoto S y cols. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic

- resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:639-642.
229. Graham DY, Lew GM, Maluty HM y cols. Factors influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy. *Gastroenterology* 1992;102:493-496.
230. Gisbert JP, Boixeda D, De Rafael L, Martín de Argila C, Bermejo F, García Plaza A. Efecto de la triple terapia sobre la erradicación de *Helicobacter pylori* y la cicatrización de la úlcera duodenal. Estudio inicial y a los seis meses. *Rev Esp Enferm Dig* 1995;87:193-198.
231. Gisbert JP, Mur M, Boixeda D, Cena G, Martín dA, Alvarez B, I, Abaira V, Garcia PA. One-week treatment with omeprazole, clarithromycin and amoxicillin: high efficacy in the eradication of *Helicobacter pylori* and cicatrization of duodenal ulcer. *Med Clin (Barc)* 1997;108:524-529
232. Lamouliatte H, Cayla R, Forestier S y cols. Dual therapy versus triple therapy: High dose of lansoprazole plus amoxicillin in combination or not with clarithromycin for *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997(Supl 1):A92.
233. Bell GD, Powell KU, Burridge SM. Experience with triple anti*Helicobacter pylori* eradication therapy: side effects and importance of testing the pre-treatment bacterial isolate for metronidazole resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 1992;6:427-431.
234. Lam SK, Talley NJ. *Helicobacter pylori* Consensus. Report of the 1997 Asia Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1-12.
235. Dixon JS, Pipkin GA, Mills JG, Wood JR. Ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* 1997;48 suppl 4:47-58.
236. Gudjonsson H, Bardhan KD, Hoie O, et al. High *Helicobacter pylori* eradication rate with a one-week triple regimen containing ranitidine bismuth citrate. *Gut* 1997;41:A99.
237. Cestari. Ranitidine bismuth citrate based triple therapy for 7 days is more effective than RBC plus clarithromycin for 14 days in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*;12/10:991-996.
238. Pare P, Farley A, Romaozinho JM, Bardhan KD et al. Comparison of ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin with omeprazole plus clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(8):1071-8.
239. Spadaccini A, De Fanis C, Sciampa G et al. Lansoprazole or ranitidine bismuth citrate based triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication: results of an open randomized study. *Gut* 1997;41(suppl 1):A105.
240. Sung JY, Leung WK, Ling TKW et al. One-week use of ranitidine bismuth citrate, amoxicillin and clarithromycin for the treatment of *Helicobacter pylori*-related duodenal ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12/8:725-730.

241. Ravizza M, Cappelletti F et al. *Helicobacter pylori* eradication therapy: three different one-week regimen comparisons. *Gastroenterology* 1998;114(4):A-294.
242. Sjöström JE and Larsson H. Factors affecting growth and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*. effect of pH and urea on the survival of a wild-type strain and a urease-deficient mutant. *J Med Microbiol* 1996;44:425-433.
243. Moshkowitz M, Konikoff FM, Peled Y et al. High *Helicobacter pylori* numbers are associated with low eradication rate after triple therapy. *Gut* 1995;36:845-847.
244. Broutet N, Marais A, Liu D, Lamouliatte H, Samoyeau R, Mégraud F. Cag negative status: a risk factor for failure of *Helicobacter pylori* triple therapies in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1998;43(suppl 2):A270.
245. Kuipers EJ, Schenk BE, Meuwissen GM. *Helicobacter pylori*. Who is positive and who is not? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:533-536.
246. Joint Committee for Minimal Standard Terminology of ESGE, ASGE, OMED. Minimal Standard Terminology in Digestive Endoscopy. *Endoscopy* 2000;32:159-188.
247. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH2 study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999;43(11):2747-2752.
248. Mendonça S, Ecclissato C, Sartori MS, Ortiz AP et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 2000;5(2):79-83.
249. Pilotto A, Rassa M, Leandro G, Franceschi M et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicenter study. *Dig Liver Dis* 2000;32(9):763-768.
250. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid AJ, Pot RG, Kuipers E et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999;43:511-515.
251. Rauws EAJ, Langenberg W, Houthoff HJ, et al. *Campylobacter pyloridis* associated chronic active antral gastritis. *Gastroenterology* 1998;94:33-40.
252. Logan RPH, Polson RJ, Baron JH, et al. Follow-up after anti-*Helicobacter pylori* treatment. *Lancet* 1991;337:562-563.
253. Chey WD. Proton pump inhibitors and the urea breath test: How long is long enough? *Am J Gastroenterol* 1997; 92:720-721.
254. Yousfi MM, Reddy R, Osato MS, Graham DY. Is antrum or corpus the best site for culture of *H. pylori*? *Helicobacter* 1996 Jun;1(2):88-91.
255. Pérez-Pérez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000 Dec;29(4):879-84.

256. Han SW, Flamm R, Hachem CY, et al. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:349-352.
257. Veenendaal RA, Lichtendahl-Bernards AT, et al. Effect of transport of medium and transportation time on culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1993;46:561-563.
258. Roosendaal R, Kuipers EJ, et al. Recovery of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens is not dependent on the transport medium used. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2798-2800.
259. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E-test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *H. pylori*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2072-2075.
260. Hirschl AM, Hirschl MM, Rotter ML. Comparison of three methods for the determination of the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 1993 Jul;32(1):45-9.
261. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. The E test for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 1993 Jan;31(1):65-71.
262. Van Horn K, Modiga O, Dworkin B. E-test for susceptibility of *Helicobacter pylori*, poster C-325, p.547. In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
263. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E-test, agar dilution and broth microdilution for testing susceptibilities of *H. pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997;35:1842-1846.
264. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Graham DY. Comparison of the E-test and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17(1):39-44.
265. Von Recklinghausen G and Ansorg R. Metronidazole susceptibility testing of *H. pylori* with the PDM epilometer test (E-test). *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1995;282:83-85.
266. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement (aerobic dilution) M100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
267. Cabrita J, Oleastro M, Matos R, Manhente A et al. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother* 2000;46(6):1029-31.
268. Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JG, El-Zaatari F, Osato MS, Graham DY, Kwon DH. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of

- Helicobacter pylori* isolates from Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001;47:459-461.
269. Wong BCY, Wang WH, Berg DE, Fung FMY et al. High prevalence of mixed infections by *Helicobacter pylori* in Hong Kong: metronidazole sensitivity and overall genotype. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:493-503.
270. Osato MS, Reddy R, Reddy S, Penland R, Malaty H, Graham DY. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. Arch Intern Med 2001;161:1217-1220.
271. Jorgensen, M., G. Daskalopoulos, V. Warburton, H. M. Mitchell, and S. L. Hazell. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. J. Infect. Dis. 1996;174:631-635.
272. Taylor, N. S., J. G. Fox, N. S. Akopyants, D. E. Berg, N. Thompson, B. Shames, L. Yan, E. Fontham, F. Janney, F. M. Hunter, and P. Correa. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1995;33:918-923.
273. Jenks PJ, Labigne A, Ferrero RL. Exposure to metronidazole *in vivo* readily induces resistance in *Helicobacter pylori* and reduces the efficacy of eradication therapy in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Apr;43(4):777-81.
274. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R et al. Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000;44(8):2214-2216.
275. Mayhall CG, Apollo E. Effect of storage and changes in bacterial growth phase and antibiotic concentrations on antimicrobial tolerance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1980 Nov;18(5):784-8.
276. Han, S.-R., S. Bhakdi, M. J. Maeurer, T. Schneider, and S. Gehring. Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? J. Clin. Microbiol. 1999;37:2740-2741.
277. Dore, M. P., M. S. Osato, G. Realdi, I. Mura, D. Y. Graham, and A.R. Sepulveda. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. J. Antimicrob. Chemother. 1999;43:47-54.
278. Dore, M. P., D. Y. Graham, A. R. Sepulveda, G. Realdi, and M. S. Osato. Sensitivity of amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* to other penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. 1999;43:1803-1804.
279. Dore, M. P., A. Piana, M. Carta, A. Atzei, B. M. Are, I. Mura, G. Massarelli, A. Maida, A. R. Sepulveda, D. Y. Graham, and G. Realdi. Amoxicillin resistance is one reason for failure of amoxicillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. Aliment. Pharmacol. Ther. 1998;12:635-639.

280. Dore, M.P., Sepulveda, A.R., Mura, I., Realdi, G., et al. Explanation for variability of omeprazole amoxicillin therapy? Tolerance of *H. pylori* to amoxicillin. Gastroenterology 112, A105 (abstract).
281. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Madrazo-De la Garza A, Dehesa M, Gonzalez-Valencia G, Munoz O. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. J Clin Microbiol. 2001 Jul;39(7):2677-80.
282. Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxycillin. J Antimicrob Chemother. 2000 Jul;46(1):121-3.
283. Midolo, P. D., M. G. Korman, J. D. Turnidge, and J. R. Lambert. *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. Lancet 1996;347:1194-1195.
284. Realdi G, Dore MP, Piana A, Atzei A et al. Pretreatment antibiotic resistance in *H. pylori* infection: results of three randomized controlled studies. Helicobacter 1999;4(2):106-112.
285. Kwon DH, Kim JJ, Lee M, Yamaoka Y, Kato M, Osato MS, El-Zaatari FA, Graham DY. Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Nov;44(11):3203-5.
286. Nikaido, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1996;178:5853-5859.
287. Heep M, Kist M, Strobel S, Beck D, Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:538-541.
288. Fraser AG, Moore L, Hackett M, Hollis B. *Helicobacter pylori* treatment and antibiotic susceptibility: results of a five-year audit. Aust N Z J Med 1999;29(4):512-6.
289. Parsons HK, Carter MJ, Sanders DS, Winstanley T, Lobo AJ. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Sep;15(9):1473-8.
290. Perri F, Villani MR, Festa V, Quitadamo M, Andriulli A. Predictors of failure of *Helicobacter pylori* eradication with the standard "Maastricht triple therapy". Aliment Pharmacol Ther 2001;15:1023-1029.
291. Rautelin H, Seppala K, Renkorien O et al. Role of metronidazole resistance in therapy of *Helicobacter pylori* infection. Antimicrob Agent Chemother 1992;36:163-166.
292. Witteman EM, Hopman WP, Bex MC et al. Short report: smoking habits and the acquisition of metronidazole resistance in patients with *Helicobacter pylori* related gastritis. Aliment Pharmacol Ther 1993;7(6):683-7.

293. Wang G, Wilson TJ, Jiang Q, Taylor DE. Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar;45(3):727-33.
294. Sisson, G., J. Y. Jeong, A. Goodwin, L. Bryden, N. Rossler, S. Lim-Morrison, A. Raudonikiene, D. E. Berg, and P. S. Hoffman. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori* RdxA⁺ (nitroreductase) gene. J. Bacteriol. 2000;182:5091-5096.
295. Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila A et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finish Study Group for Antimicrobial Resistance. N Engl J Med 1997;337:441-446.
296. Maruyama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. Prevalence of resistance to erythromycin in Japan. Am J Dis Child. 1979 Nov;133(11):1143-5.
297. Swartz MN. Use of antimicrobial agents and drug resistance. N Engl J Med. 1997 Aug 14;337(7):491-2.
298. Melander E, Ekdahl K, Jonsson G, Molstad S. Frequency of penicillin-resistant pneumococci in children is correlated to community utilization of antibiotics. Pediatr Infect Dis J 2000 Dec;19(12):1172-7.
299. Satoh K, Kimura K, Yoshida Y, Kasano T et al. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis: quantitative assessment of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. Am J Gastroenterol 1991;86:285-91.
300. Khulusi S, Mendall MA, Patel P, Levy J, Badve S, Northfield TC. *Helicobacter pylori* infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. Gut 1995;37:319-324.
301. Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Cover TL, Blaser MJ. Density of *Helicobacter pylori* infection *in vivo* as assessed by quantitative culture and histology. The Journal of Infectious Diseases 1996;174:552-6.
302. Hui WM, Ho J, Lam SK. Pathogenetic role of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer disease. Multivariate analysis of factors affecting relapse. Dig Dis Sci. 1991 Apr;36(4):424-30.
303. Banerjee S, El-Omar E, Mowat A, Ardill JE, Park RH, Watson W, Beattie AD, McColl KE. Sucralfate suppresses *Helicobacter pylori* infection and reduces gastric acid secretion by 50% in patients with duodenal ulcer. Gastroenterology. 1996 Mar;110(3):717-24.
304. Peterson WL, Graham DY, Marshall B, Blaser MJ, Genta RM, Klein PD, Stratton CW, Drnec J, Prokocimer P, Siepmann N. Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*. a randomized, double-blind trial. Am J Gastroenterol 1993 Nov;88(11):1860-4.

305. Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*. a topographic study of *Helicobacter pylori* density and distribution. *Gastrointest Endosc* 1994;40:342-345.
306. Carvahlo AS, Queiroz DM, Mendes EN et al. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa or symptomatic children. *Braz J Med Biol Res* 1991;24:163-6.
307. Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R et al. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* 1992;102:1575-82.
308. Duchatelle V, Marcellin P, Giostra E, Bregeaud L, Pouteau M, Boyer N, Auperin A, Guerret S, Erlinger S, Henin D, Degott C. Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis C: quantitative assessment by a morphometric method. *J Hepatol*.1998 Jul;29(1):20-8.
309. Zaitoun AM, Al Mardini H, Awad S, Ukabam S, Makadisi S, Record CO. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol*. 2001 Jun;54(6):461-5.
310. Olofsson K, Hellstrom S, Hammarstrom ML. The surface epithelium of recurrent infected palatine tonsils is rich in gammadelta T cells. *Clin Exp Immunol*.1998;111(1):36-47.
311. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax*. 2001;56(12):902-6.
312. Pehlivanov N, Liu J, Kassab GS, Puckett JL, Mittal RK. Relationship between esophageal muscle thickness and intraluminal pressure: an ultrasonographic study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Jun;280(6):G1093-8.
313. Perasso A, Testino G, Ansaldi F. Gastric chief cell mass in duodenal ulcer. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1993;23:5-11.
314. Inman L, Lee SK, Shah IA et al. Effect of truncal vagotomy on parietal cell mass and antral gastric cell mass in dogs. *Gastroenterology* 1990;99:1581-92.
315. Ruiz B, Garay J, Johnson W, Li D, Rugge M, Dixon MF, Fiocca R, Genta RM, Hattori T, Lechago J, Price AB, Sipponen P, Solcia E, Watanabe H, Correa P..Morphometric assessment of gastric antral atrophy: comparison with visual evaluation. *Histopathology* 2001 Sep;39(3)235-42.
316. Valenzuela M, Martín-Ruiz JL, Caballero-Plasencia A et al. Parietal cell hyperactivity is not due to *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 1996;91(10):2114-2119.
317. Smith MA, Edwards DI. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39(3):347-53.

318. Rauws EAJ, Royen VEA, Langenberg W et al. C-14 urea breath test in *Campylobacter pylori* gastritis. *Gut* 1989;30:798-803.
319. Cooreman MP, Krausgrill P, Hengels KJ. Local gastric and serum amoxicillin concentrations after different oral application forms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Jul;37(7):1506-9.
320. Gilbert, P. & Brown, M.R. Biofilms and β -lactam activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;41, 571–2.
321. Ashby, M. J., Neale, J. E., Knott, S. J. & Crichley, I. A. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1994;33, 443–52.
322. Megraud, F., Trimoulet, P., Lamouliatte, H. & Boyanova, L. Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an *in vitro* model using epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991;35, 869–72.
323. Simala-Grant JL, Zopf D, Taylor DE. Antibiotic susceptibility of attached and free-floating *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 2001 May;47(5):555-63.
324. Noach LA, Rolf TM, Tytgat GNJ. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994;47:699–704.
325. Ko GH, Kang SM, Kim YK, Lee JH, Park CK, Youn HS, Baik SC, Cho MJ, Lee WK, Rhee KH. Invasiveness of *Helicobacter pylori* into human gastric mucosa. *Helicobacter* 1999;4:77–81.
326. Bjorkholm B, Zhukhovitsky V, Lofman C, Hulten K, Enroth H, Block M, Rigo R, Falk P, Engstrand L. *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. *Helicobacter* 2000 Sep;5(3):148-54.
327. Dámaso D, Alarcón T, Prieto N, López-Brea M. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Rev Esp Quimioter* 1999;12(4):340-5.
328. López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a paediatric population. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24(2):183-8.
329. Van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP et al. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut* 2000;46:321-326.
330. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, Mascarel A et al. CagA status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1319-13.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. MARIA ROJAS FERIA

titulada Resistencia de Helicobacter pylori a los antimicrobianos y factores que la condicionan

acordó otorgarle la calificación de SOBRESACIENTE CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

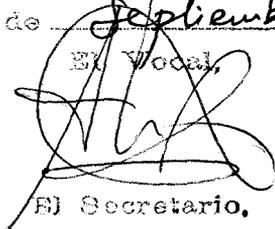
Sevilla, 17 de Septiembre

2002

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

