



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

“Relación entre la variabilidad genotípica de los factores de virulencia *vacA* y *cagA* y la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de adultos mexicanos con padecimientos gástricos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M. en C. Lilia Chihu Amparán

Cotutores:

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Dr. Humberto González Márquez

Asesor:

Dr. Jesús Silva Sánchez

México, D.F.

Agosto 2006.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Patógenos, en el Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, en el Instituto Nacional de Salud Pública.

El doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se encuentra actualmente en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) SEP/CONACYT catalogada de alto nivel.

El presente trabajo fue realizado gracias a la Beca-crédito para estudios de Doctorado otorgada por el CONACYT, Número de registro 169621.

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la presente tesis el día 25 de agosto de 2006.

Dr. Pablo Damian Matzumura
Presidente

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar
Vocal

Dr. Humberto González Márquez
Vocal

Dra. Irma Romero Alvarez
Vocal

Dr. Carlos Eslava Campos
Secretario

COMITÉ TUTORIAL

TUTORES:

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar
Dr. Humberto González Márquez

ASESOR

Dr. Jesús Silva Sánchez

DEDICATORIAS

A mi esposo Alejandro Sánchez por su amor y apoyo durante todos los aspectos de nuestra vida.

A mi mamá Lilia Amparán quién ha sido la luz en mi camino, por tu amor y por ser simplemente tu.

A mis hermanos Jesús y Dinorah por todo el amor que son capaces de brindar hoy y siempre.

A mis tíos Angélica, Aquiles, Andrés, Rosita y Sis mis grandes cariños.

A mi prima Rita y toda su familia, gracias por ser como eres y por sobre todas las cosas por el gran amor que le brindas a mamá.

A mis amigas de siempre Ofelia, Alicia y Rosario, que siempre me han animado y apoyado. Por los grandes momentos compartidos.

A todos les dedico esta tesis y les agradezco su amor y comprensión. A todos los amo profundamente!!

AGRADECIMIENTOS.

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas.

A la Dra. Guadalupe Ayala por permitirme formar parte de tu grupo, por darme la oportunidad de hacer esta tesis. Por compartir conmigo tus conocimientos sobre *Helicobacter pylori*. Gracias por tu entusiasmo, por tu paciencia, por siempre tener tiempo para escucharme, por apoyarme en mis decisiones y por brindarme tu amistad.

Al Dr. Humberto González Márquez por aceptar ser mi tutor sin conocerme. Por todos tus comentarios y brillantes aportaciones a este trabajo y al artículo.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Jesús Silva Sánchez por admitirme en tu laboratorio. Y por todos tus consejos y valiosas recomendaciones al presente trabajo.

Dr. Pablo Damián Matzumura, Dr. Carlos Eslava y a la Dra. Irma Romero miembros del jurado, les agradezco sus valiosos comentarios y aportaciones al presente trabajo.

Al Dr. Mario Henry Rodríguez por permitirme nuevamente llevar a cabo mis objetivos y por el apoyo que me ha otorgado siempre.

A la Q. Geny Fierros Zarate gracias por introducirme en el cultivo de la bacteria, por ser una excelente persona y por brindarme tu amistad.

A la Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, a la M. en C. Ma. Elena Velázquez Meza, al M. en C. Adolfo Pedroza Saavedra por honrarme con su amistad y sus valiosos consejos.

ABREVIATURAS

ARH₂: antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina

ATCC: American Type Culture Collection

cagA: gen asociado a la citotoxina

CMI: concentración mínima inhibitoria

CG: cáncer gástrico

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

GCA: gastritis crónica activa

GCAF: gastritis crónica activa folicular

IL8: interleucina 8

kb: kilo bases

kDa: kilo dalton

IBP: inhibidor de la bomba de protones

LPS: lipopolisacáridos

MALT: linfoma asociado a la mucosa gástrica

MI: metaplasia intestinal

NAP: proteína activadora de neutrófilos

PAI: isla de patogenicidad

pb: pares de bases

PBP: proteína fijadora de penicilina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis de campos pulsados

RAPD: amplificación al azar de DNA polimórfico

RBC: ranitidina-citrato-bismuto

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RNAr: ácido ribonucleico ribosomal

Tox: citotoxina

UFC: unidades formadoras de colonias

UPGMA: método de grupo de pares no ponderado con media aritmética

urea-¹³C: prueba del aliento con carbono¹³

urea-¹⁴C: prueba del aliento con carbono¹⁴

vacA: gen que codifica para la citotoxina vacuolizante

VacA: citotoxina codificada por el gen *vacA*

Índice

1	Resumen.....	5
2	Summary.....	6
3	Antecedentes.....	7
3.1	Historia.....	7
3.2	Microbiología.....	8
3.2.1	Características morfológicas.....	8
3.2.2	Genoma y plásmidos.....	9
3.3	Taxonomía.....	11
3.4	Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i>	14
3.4.1	Infección por <i>H. pylori</i>	14
3.4.1.1	Infección aguda.....	15
3.4.1.2	Gastritis crónica.....	15
3.4.1.3	Gastritis crónica atrófica.....	15
3.4.1.4	Úlcera péptica.....	16
3.4.1.5	Metaplasia intestinal.....	17
3.4.1.6	Displasia epitelial gástrica.....	17
3.4.1.7	Cáncer gástrico.....	18
3.5	Epidemiología.....	19
3.6	Factores de virulencia.....	19
3.6.1	Flagelos.....	20
3.6.2	Adhesinas.....	20
3.6.3	Ureasa.....	21
3.6.4	Catalasa.....	22
3.6.5	Lipopolisacáridos (LPS) y Antígenos Lewis.....	22
3.6.6	Proteína Activadora de Neutrófilos (NAP).....	23
3.6.7	Citotoxina vacuolizante (VacA).....	23
3.6.8	Isla de patogenicidad <i>cagPAI</i>	24
3.6.8.1	Citotoxina asociada al gen A (CagA).....	25
3.7	Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	25
3.7.1	Cultivo.....	26
3.7.2	Pruebas bioquímicas.....	26
3.7.2.1	Oxidasa.....	27
3.7.2.2	Catalasa.....	27
3.7.2.3	Ureasa.....	28
3.7.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
3.7.4	Prueba rápida de la urea.....	28

3.7.5	Pruebas histológicas.....	28
3.7.6	Serología.....	29
3.7.7	Prueba del aliento de la urea.....	29
3.7.8	Detección de antígenos en heces.....	30
3.8	Tratamiento.....	30
3.8.1	Inhibidores de la bomba de protones (IBP).....	32
3.8.2	Antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina (ARH ₂).....	33
3.8.3	Macrólidos.....	33
3.8.4	Nitroimidazoles.....	36
3.8.5	Beta lactámicos.....	38
3.8.6	Factores de virulencia asociados a la resistencia antimicrobiana....	38
3.9	Marcadores genéticos.....	39
3.9.1	Electroforesis por campos pulsados (PFGE).....	39
3.9.2	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)..	40
3.9.2.1	RFLP-Southern blot.....	40
3.9.2.2	RFLP-PCR.....	40
3.9.3	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR).....	40
3.9.4	Ribotipificación.....	42
3.9.5	Amplificación azarosa de DNA polimórfico (RAPD).....	42
4	Justificación.....	43
5	Objetivo general.....	44
5.1	Objetivos particulares.....	45
6	Hipótesis.....	45
7	Materiales y métodos.....	45
7.1	Pacientes.....	45
7.2	Cepas bacterianas.....	46
7.3	Recuperación de las cepas.....	46
7.4	Extracción de DNA genómico.....	46
7.5	Cuentas viables.....	47
7.6	Estandarización de pruebas de susceptibilidad.....	47
7.7	Pruebas de susceptibilidad.....	47
7.8	Detección de mutaciones del gen del RNAr 23S.....	48
7.9	Caracterización molecular de los aislamientos clínicos de <i>Helicobacter pylori</i>	49
7.9.1	Gen del RNAr 16S.....	49

7.9.2	Caracterización de los alelos s/m del gen <i>vacA</i>	50
7.9.3	Detección de <i>cagA</i>	50
7.9.4	Cultivo de células HeLa.	51
7.9.5	Ensayos de citotoxicidad.	51
7.9.6	RAPD.....	52
7.9.6.1	Método UPGMA.	52
7.10	Análisis Estadístico.	53
8	Resultados.....	53
8.1	Características de los pacientes.	53
8.2	Estandarización de pruebas de susceptibilidad.	54
8.3	Pruebas de susceptibilidad.	55
8.3.1	Detección de mutaciones en el gen RNAr 23S.....	56
8.4	Caracterización molecular de los aislamientos clínicos de <i>H. pylori</i>	58
8.4.1	Detección de <i>H. pylori</i> por amplificación por PCR del gen RNAr 16S..	58
8.4.2	Identificación de los alelos de <i>vacA</i>	58
8.4.3	Detección del gen <i>cagA</i>	58
8.4.4	Correlación entre <i>cagA</i> y <i>vacA</i> y la citotoxicidad.	58
8.4.4.1	Análisis de los genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> y su correlación con el padecimiento.	59
8.4.4.2	<i>cagA</i> y <i>vacA</i> y su correlación con la susceptibilidad.	60
8.4.5	Actividad citotóxica en células HeLa.....	61
8.4.6	RAPD.....	62
8.4.6.1	Método UPGMA.	62
9	Discusión.....	64
10	Conclusiones.....	69
11	Perspectivas.....	70
12	Bibliografía.....	72

1 Resumen.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, microaerofílica que coloniza el estómago de los humanos. Es el agente causal de la gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico. En México, la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori* es una prioridad debido a la elevada seroprevalencia, sin embargo existe poca información acerca de las tasas de resistencia a antibióticos en aislamientos de *H. pylori* en nuestro país. El incremento en la resistencia a antibióticos constituye un problema mundial y dificulta el tratamiento de las infecciones por *H. pylori*. Con el objetivo de determinar la relación entre la resistencia, la presencia y variabilidad de los genes de virulencia *vacA* y *cagA*; analizamos la frecuencia de la resistencia a los antibióticos claritromicina, metronidazol y amoxicilina en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferentes padecimientos gástricos. Se realizó la caracterización de un total de 49 aislamientos clínicos de *H. pylori* provenientes de 49 pacientes con padecimientos de gastritis crónica activa, gastritis crónica activa folicular, metaplasia intestinal y cáncer gástrico, los cuales fueron reclutados en el servicio de endoscopia del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en 1997, 2000 y 2001. Se analizó la susceptibilidad a los antimicrobianos claritromicina, metronidazol y amoxicilina. Todos los aislamientos fueron susceptibles a amoxicilina, mientras que 28 (57%) fueron resistentes a metronidazol y 2 (4%) fueron resistentes a metronidazol y claritromicina. La prevalencia de la resistencia a metronidazol incrementó del 35% en 1997, a 54% en 2000 y 74% en 2001. El análisis de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 23S del RNA ribosomal de las dos cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol y claritromicina mostró que una de ellas tenía la mutación A2142G y la otra las mutaciones A2143G y T2182C. Todas las cepas presentaron el gen *vacA* y el 77.5% de las muestras el gen *cagA*. El 84.8% de las cepas citotóxicas son *cagA*⁺, de las cuales el 89.2% tienen el genotipo s1m1. La resistencia a metronidazol se asoció con cepas *cagA*⁻, con una frecuencia de 82% (9/11). No se encontró una correlación significativa entre los alelos *vacA* s/m y la resistencia a metronidazol. El análisis del polimorfismo genético de los aislamientos, mediante la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD), no mostró relación genética entre las cepas.

2 Summary.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative microaerophilic bacteria, that inhabits the stomach of humans. *H. pylori* is the causal agent of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Eradication of *Helicobacter pylori* infection in Mexico is a priority due to the elevated seroprevalence, however, there is yet very little information about antibiotic resistance rates in *H. pylori* isolates in our country. The increased prevalence of antibiotic resistance has become a world wide problem and makes difficult the treatment of *H. pylori* infection. The aim of this study was to determine the relation between antibiotics resistance and presence and variability of the virulence associated *vacA* and *cagA* genes. Susceptibility to clarithromycin, metronidazole, and amoxicillin of *H. pylori* strains isolated from patients with different clinical outcome was analyzed. We made the characterization of 49 *H. pylori* strains isolated from patients with active chronic gastritis, active chronic gastritis with lymphoid follicles, intestinal metaplasia and gastric cancer, and all patients were recruited in the Instituto Nacional de Cancerologia (INCAN) at endoscopy unit during 1997, 2000 and 2001. Antimicrobial susceptibility to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin was analyzed. All isolated strains were susceptible to amoxicillin, 28 (57%), metronidazole resistant and 2 (4%) were both clarithromycin and metronidazole resistant. The prevalence of resistance to metronidazole increased from 35% in 1997 to 54% in 2000 and to 74% in 2001. Sequence analysis of the 23S rRNA encoding gene of the two clarithromycin resistant strains showed the A2142G mutation in one, and the A2143G and T2182C mutations in the other. The *vacA* gene was detected in all the studied strains and *cagA* gene could be identified in 77.5% of the strains. With regard to cytotoxicity 84.8% were *cagA*⁺, of which 89.2% had the s1m1 genotype. Metronidazole resistance was associated with *cagA*⁻, strains with a frequency of 82 % (9/11). No significant correlation was found between *vacA* s/m alleles and metronidazole resistance. Typing by random amplified polymorphic DNA (RAPD) showed no genetic relation among the strains.

3 Antecedentes.

3.1 Historia.

El descubrimiento de la presencia de bacterias en los tejidos gástricos se remonta a 1875, cuando Bottcher y Letulle demostraron la presencia de colonias de bacterias en el piso de una úlcera y en los márgenes de su mucosa. Klebs, en 1881, reportó un organismo parecido a un bacilo libre en el lumen de las glándulas gástricas y entre las células de las glándulas con su correspondiente “infiltración interglandular de células pequeñas redondas”. En 1889, Jarwoski fue el primero en describir en detalle organismos espirales en los sedimentos de lavados de estómago, obtenidos de necropsias de humanos, encontrando una bacteria con apariencia de hélice y sugirió que podría jugar un papel patogénico en la enfermedad gástrica. Bizzozero, en 1893, identificó espiroquetas en las células parietales de la mucosa gástrica de perros, concluyó que las bacterias pueden vivir en el estómago donde se produce ácido y pueden ser tolerantes a éste (193). En 1896, Salomon observó espiroquetas en la mucosa gástrica y las transfirió experimentalmente a ratones, mientras que Krienitz, en 1906, encontró espiroquetas en especímenes gástricos de un paciente con cáncer gástrico (193). En 1938, Doenges reportó espiroquetas en aproximadamente 40% de necropsias de estómagos de humanos; dos años después, Freedburg y Barron reportaron espiroquetas en el 46% de los especímenes frescos de cirugías de estómagos de humanos con úlcera o carcinoma. En 1975, Steer describió bacterias en los bordes de las úlceras (232). Todos estos hallazgos apoyaron la idea de que los microorganismos no eran únicamente contaminaciones *post mortem*, sino patógenos gástricos. La dificultad para relacionar el papel de la bacteria espiral con la patología gástrica humana era el no poder cultivar el organismo del estómago. Finalmente, en 1983, Warren y Marshall lograron aislar una bacteria microaerófila de lento crecimiento; esto ocurrió de forma fortuita cuando, por accidente, dejaron cajas con agar con muestras de biopsias de estómago en la incubadora durante un tiempo más prolongado que el usado rutinariamente, logrando así cultivar la bacteria que había sido observada por muchos y que nunca se había aislado(172). Para probar la teoría de que la bacteria que se había aislado era la causante de la gastritis, el profesor Marshall, en 1985, se infectó con un cultivo líquido de la bacteria que ahora conocemos como *Helicobacter pylori* (169). Al realizarle la endoscopía se encontró que su estómago se encontraba inflamado, la histología de la mucosa gástrica mostró la presencia de la bacteria y las células epiteliales mostraban cambios morfológicos. Inicialmente denominaron a este microorganismo *Campylobacter pyloridis*

(171) y posteriormente debido a las reglas internacionales de la nomenclatura se cambió a *Campylobacter pylori* (170). Al analizar la composición de ácidos grasos de la pared celular de *C. pylori* encontraron que existían diferencias con respecto a las otras especies del género *Campylobacter*. Al analizar mediante microscopía electrónica biopsias de la mucosa gástrica observaron que la superficie de *C. pyloridis* era suave y no rugosa y presentaba múltiples flagelos unipolares (100,102). Al realizar comparaciones de las secuencias parciales del gen que codifica a la subunidad 16S del RNA ribosomal entre especies representativas del género *Campylobacter* (*C. jejuni* VC79, *C. fetus* supsp. *fetus* VC78, *C. coli* VC80, *C. laridis* VC187, *C. sputorum* subs. *sputorum* VC188) y *C. pylori* 5443, encontraron que las cepas de *Campylobacter* formaban un grupo filogenético bien definido con una homología interespecies del 92.4 al 98.1%, con excepción de *C. pylori* que mostró una reducida homología interespecie del 84.6 al 85.5%. La distancia entre el grupo *Campylobacter* y *C. pylori* era más intragénero que intraespecie (98,207,217). En 1989, Godwin y cols. (98) mostraron que la bacteria no pertenecía al género *Campylobacter* y la renombraron como *Helicobacter* (del griego, “bacteria espiral”) *pylori* por su apariencia *in vivo* de hélice y su sitio más común de aislamiento, el píloro del estómago (102,190).

3.2 Microbiología.

3.2.1 Características morfológicas.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, existe en diversas formas: bacilo, espiral corta, hélice, aunque también se puede encontrar en forma de coco. Esta última forma es inducida por estrés ambiental en condiciones de cultivo desfavorables, como pH alcalino, temperatura elevada, aumento en la tensión de oxígeno, cultivo prolongado o en presencia de antibióticos. *H. pylori* mide aproximadamente 2.5-5.0 µm de largo y 0.5-1.0 µm de diámetro. Posee de 2 a 6 flagelos unipolares que le dan una gran movilidad, lo que le permite penetrar rápidamente a través del moco gástrico en la mucosa gástrica y soportar las contracciones gástricas (102,103,154) (Fig. 1a). Cada flagelo mide 30 µm de largo y aproximadamente 2.5 nm de ancho (103). La forma cocoide se ha observado en el estómago de humanos, la cual es metabólicamente activa pero inviable para cultivarse *in vitro* (Fig. 1b), la participación de las formas cocoides en la transmisión y patogénesis de *H. pylori* no se ha aclarado aún (270).

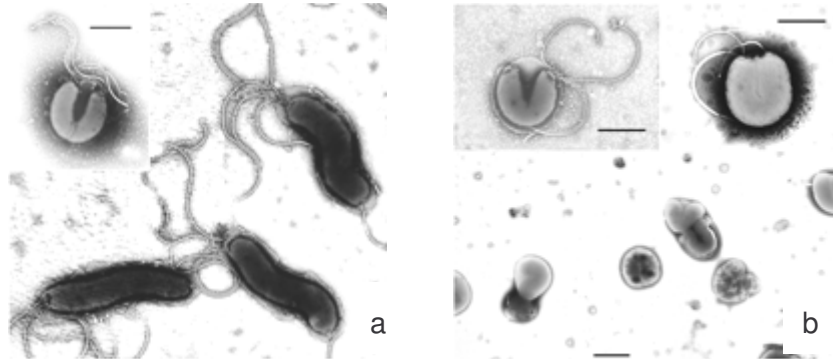


Figura 1. *Helicobacter pylori* a) en la fase exponencial de crecimiento, b) en la fase tardía de crecimiento mostrando la formación de cocos (270).

El principal reservorio de *H. pylori* es el estómago humano, encontrándose principalmente en la mucosa gástrica, no obstante, en un momento dado sólo una pequeña fracción parece adherirse al epitelio gástrico (25), principalmente en la región del antro y el píloro y no coloniza áreas del estómago ya transformadas con displasia o metaplasia intestinal (102,154). En cultivos, a partir de biopsias, sembrados en agar sangre a 37°C y bajo condiciones microaerófilas (5% O₂, 10% CO₂), las colonias de *H. pylori* tardan en aparecer entre 3 y 5 días. Tiene un crecimiento óptimo a pH cercano a 7.0, las colonias son circulares pequeñas, con una apariencia convexa y translúcida, y con un diámetro de 1-2 mm. En la mayoría de los casos las colonias están rodeadas por una zona ligera de hemólisis.

3.2.2 Genoma y plásmidos.

El tamaño promedio del genoma de *H. pylori* es relativamente pequeño, de 1.6 Mb, y la composición promedio de G + C es de 39% (24). Aproximadamente el 40% de los aislamientos de *H. pylori* tienen plásmidos de diferentes tamaños que varían de 1.5 a 23.3 kb, en los cuales no se han identificado factores de virulencia (144,183).

H. pylori es el primer microorganismo al que se le ha determinado la secuencia nucleotídica del genoma de dos cepas, por dos grupos de investigación independientes. En 1997 se reportó la secuencia completa del genoma de la cepa de *H. pylori* 26695 aislada de un paciente inglés con gastritis (Fig. 2) completada por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) en Rockville, Maryland (244) y dos años después la cepa J99 aislada de un paciente estadounidense con úlcera duodenal (11), fue secuenciada por la compañía Genome Therapeutic Corp., en Cambridge, Massachusetts, con licencia de Astra Research Center Boston (ARCB).

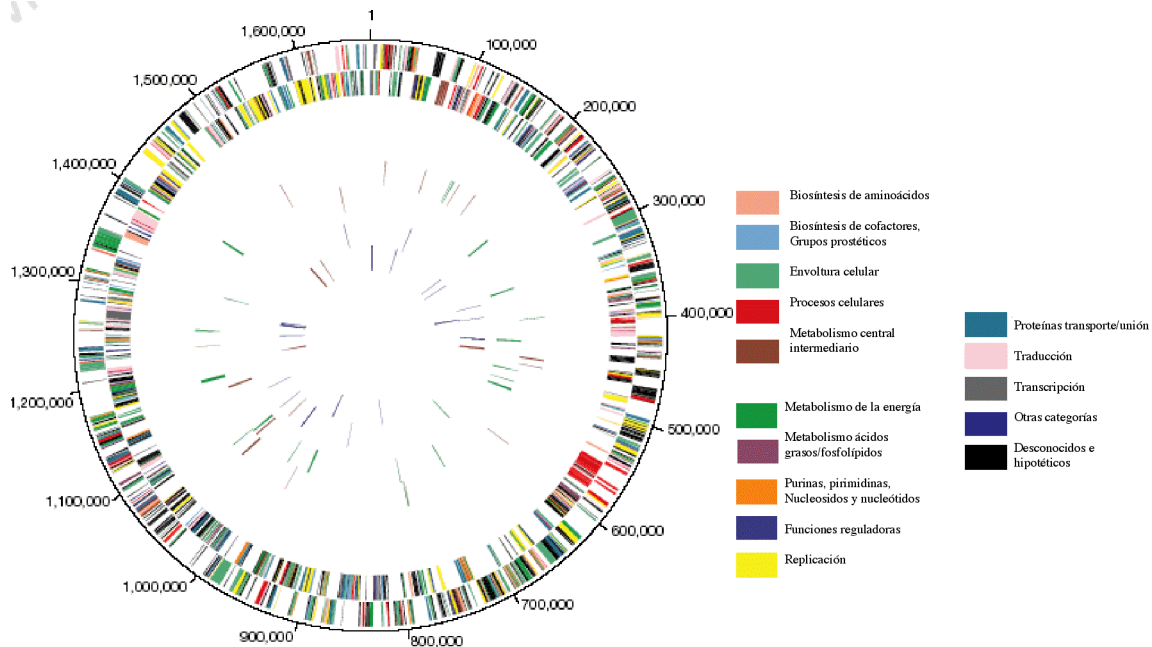


Figura 2. Representación circular del cromosoma de *H. pylori* 26695. Circulo concéntrico externo: regiones codificantes predichas en la hebra (+) clasificados por su función de acuerdo al código de color, excepto los desconocidos o hipotéticos que están en negro. El segundo círculo concéntrico: regiones codificantes en la hebra (-). El tercer y cuarto círculos concéntricos: elementos IS (rojo) y otras repeticiones (verde) en las hebras + y -, respectivamente. Quinto y sexto círculos concéntricos: tRNA (azul), rRNA (rojo) y sRNA (verde) en las hebras + y -, respectivamente (244).

El motivo por el cual se determinó la secuencia del genoma de dos cepas diferentes fue comprobar la hipótesis de que el contenido genómico de las cepas de *H. pylori* variaba enormemente (11,244). El cromosoma de la cepa J99 es 24,036 pares de bases más pequeño que el cromosoma de la cepa 26695. Diversas características como la ausencia de un origen de replicación identificable, la longitud promedio de las secuencias codificadoras y la frecuencia relativa de diferentes codones de inicio de la traducción, son similares en las dos cepas (Tabla 1).

Existen 1,495 marcos de lectura abiertos (ORF) en la cepa J99, que representa el 91% de su genoma. Ambos genomas tienen dos copias del gen RNAr 16S (11,244). Las dos cepas tienen la isla de patogenicidad *cagPAI* completa, flanqueada por los mismos genes cromosomales (11,244), pero el gen de la citotoxina VacA presenta diferentes alelos (132). Las dos cepas presentan diferencias considerables en la secuencia del DNA en la tercera posición del codón (132), esto es consistente con la extensa variación nucleotídica observada con los métodos de tipificación (8,134).

Tabla 1. Características comparativas de los genomas de *H. pylori*.

Características del genoma	<i>Helicobacter pylori</i>	
	26695	J99
Tamaño (pares de bases)	1,667,867	1,643,831
Contenido G + C (%)	39	39
genotipo <i>vacA</i>	s1a/m1	s1b/m1
Marcos de lectura abiertos (ORF)		
Porcentaje de genoma (codificado)	91	90.8
Genes predichos	1,590	1,495
Genes especie específicos	110	52
Clasificados funcionales	895	874
Conservados sin función	290	275
<i>H. pylori</i> específicos	367	346
Con secuencia señal	517	502
Tamaño promedio (pares de bases)	954	998
Codón de inicio AUG (%)	81.8	82.7
Codón de inicio GUG (%)	9.7	6.7
Codón de inicio UUG (%)	8.1	10.4
Otros codones de inicio (%)	0.4	0.2
Elementos de inserción		
Copias completas IS605	5	0
Copias parciales IS605	8	5
Copias completas IS606	2	1
Copias parciales IS606	2	2(4**)
Elementos del RNA		
RNA estable (%) genoma	0.75	0.75
RNAr 23S-5S	2(3)	2
RNAr 16S	2	2
tRNA	36	36

** Dos copias son más pequeñas que las otras dos y están dentro de la repetición de 31 pb en el extremo de *cagPAI* (11,132).

Se encontró que la mayoría de los genes especie específicos de *H. pylori* (108 de 110 de la cepa 26695 y 49 de 52 genes especie específicos de J99) no presentan homología con *Campylobacter jejuni* (132). Janssen y cols. mostraron que las diferencias en cuanto a la distribución de los genes especie específicos en las dos cepas, se debe a un extenso rearrreglo del genoma. La mitad de estos genes especie específicos no tienen homólogos en la base de datos de proteínas (132).

3.3 Taxonomía.

El análisis de secuencia del RNAr 16S demostró que la distancia entre *Campylobacter pylori* y las otras especies de *Campylobacter* era suficiente para excluirlo del género y lo renombraron *Helicobacter pylori* (98). Este grupo de bacterias tienen características en común: morfología curva, crecen en medio rico en condiciones

microaerófilas, no fermentan glucosa, el contenido de G + C es de 39%. Existen dieciocho especies de *Helicobacter* y se dividen de acuerdo a si colonizan el estómago, el intestino y el hígado de humanos y animales (55,203). Se han denominado *Candidatus* a dos especies no cultivables, en proceso de clasificar, y otras tres que no tienen una designación oficial en la nomenclatura (203); en la Tabla 2 se muestran las especies conocidas de *Helicobacter*.

Para evitar la confusión que ha acompañado la designación formal prematura de especies, el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática, Subcomité en la Taxonomía de *Campylobacter* y bacterias relacionadas han acordado que se debe cumplir con requerimientos mínimos para la descripción de una nueva especie del género *Helicobacter* (55), tales como examinar cinco o más cepas con el análisis de características fenotípicas, una secuencia esencialmente completa del RNAr 16S (mayor de 1,450 pares de bases) y una hibridación DNA-DNA o como alternativa a esta hibridación puede hacerse un análisis numérico de perfiles de proteínas de toda la bacteria. En el caso de nuevas especies putativas de organismos no cultivables, de los cuales existen datos de secuencia del RNAr 16S, se pueden agregar con el estatus de *Candidatus* si se identifican cinco o más aislamientos y si los datos de secuencia están respaldados por hibridación *in situ*. Seguir estos requerimientos simplificará la taxonomía del género *Helicobacter*, contribuyendo con esto a nuestro entendimiento del papel de diversas especies de *Helicobacter* en la patogénesis de enfermedades gástricas y enterohepáticas en humanos y en otros animales (230).

Tabla 2. Bacterias del género *Helicobacter* y sus hospederos (29,52,84,140,156,182,203,213,226,228,229,266).

Especies	Hospedero	Patología asociada
Gástricas		
<i>H. acinonychis</i>	Cheetah	Gastritis, úlcera péptica.
<i>H. bizzozeronii</i>	Perros, gatos	No reportada.
<i>H. felis</i>	Perros, gatos	Gastritis.
<i>H. nemestrinae</i> ^a	Macacos	Gastritis.
<i>H. muridarum</i>	Ratones, ratas	Gastritis.
<i>H. salomonis</i>	Gatos	No reportada.
<i>H. mustelae</i>	Hurones	Gastritis, úlcera péptica.
<i>H. pylori</i>	Humanos, macacos	Gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico.
<i>H. suncus</i> ^b	Almizcle, musaraña	Gastritis.
<i>Candidatus H. bovis</i> ^c	Vacas	No reportada.
<i>Candidatus H. suis</i> ^c	Cerdos	Úlcera.
Entero-hepáticas		
<i>H. bilis</i>	Ratones, perros, hamster, ratas, gerbils	Inflamación del intestino, en ratones inmunosuprimidos: hepatitis, tifilitis.
<i>H. canis</i>	Perros	Hepatitis necrosante, gastroenteritis.
<i>H. cholecystus</i>	Hamster, ratones	Colangiofibrosis, pancreatitis centrilobular.
<i>H. cinaedi</i>	Humano, hamster, perros, gatos	Proctitis en homosexuales, celulitis, artritis séptica, enteritis.
<i>H. fennelliae</i>	Humano	Proctitis en homosexuales, enteritis.
<i>H. hepaticus</i>	Ratones	Hepatitis, cáncer hepático.
<i>H. muridarum</i>	Ratones, ratas	Gastritis.
<i>H. pametensis</i>	Aves	No reportada.
<i>H. pullorum</i>	Pollos	Hepatitis, modelo experimental.
<i>H. rodentium</i>	Ratas	Diarrea en animales en bioferio.
<i>H. trogontum</i>	Ratones, ratas, oveja, cerdo	No reportada
<i>H. typhlonicus</i>	Ratones	Inflamación del intestino. Experimentalmente: tiflocolitis, proctitis, tifilitis.
<i>H. westmeadii</i> ^b	Humano	Septicemia en pacientes con SIDA.

^aSinónimo de *H. pylori* (subcomité de taxonomía).

^bSin designar

^cProvisionales (en proceso de clasificar).

3.4 Enfermedades asociadas a *H. pylori*.

Helicobacter pylori está etiológicamente asociado a enfermedades gastroduodenales (Fig. 3) (131).

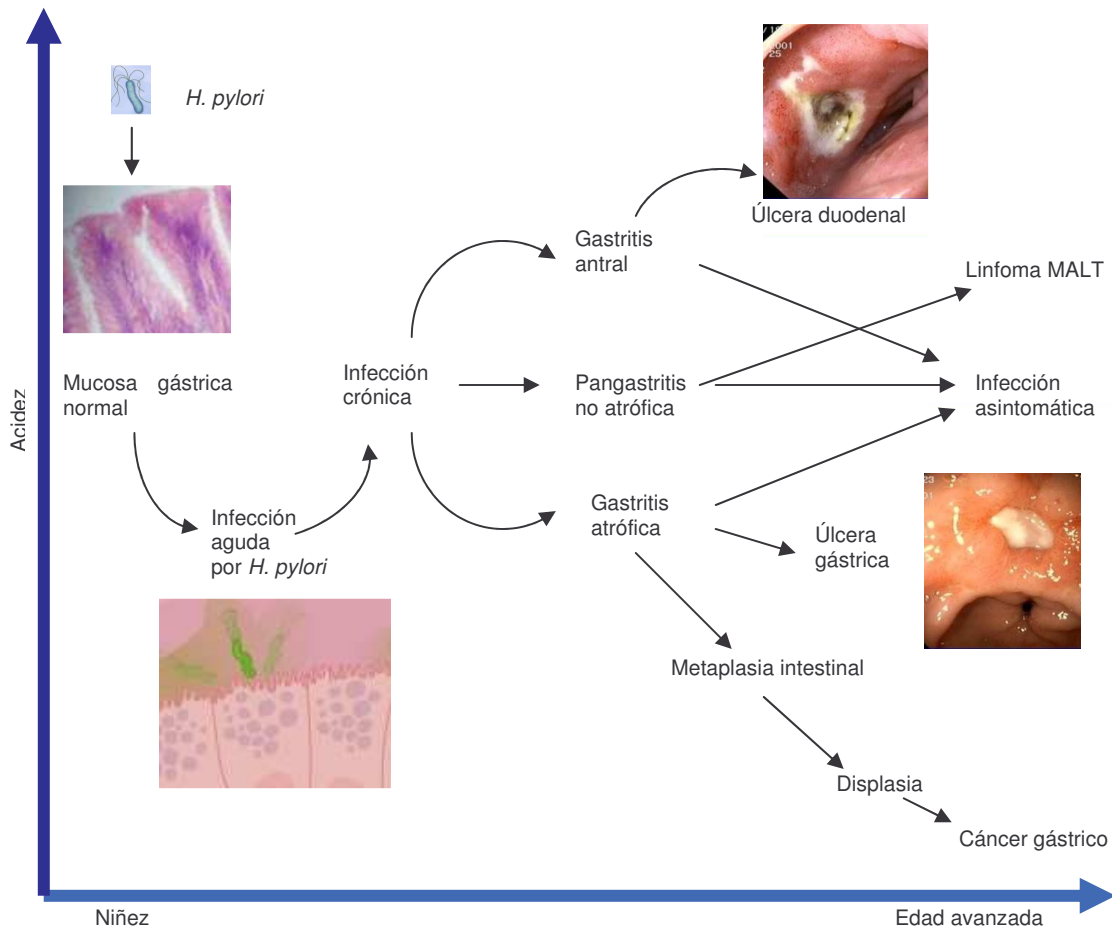


Figura 3. Enfermedades relacionadas con la infección por *H. pylori* (131).

3.4.1 Infección por *H. pylori*.

La adquisición natural de la infección por *H. pylori* comienza, la mayoría de las veces, en la niñez. Una vez que la bacteria se establece en la mucosa gástrica persiste por años. No obstante existen estudios, realizados en niños, que sugieren que en los primeros años de vida, previos al establecimiento de la infección, puede ser común una infección transitoria (184). La historia natural de la infección por *H. pylori* presenta diferentes escenarios clínicos: infección aguda, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica (úlceras pépticas), metaplasia intestinal, displasia epitelial gástrica y cáncer gástrico (Fig. 3).

3.4.1.1 Infección aguda.

En un inicio, la fase aguda de la infección es subclínica en la mayoría de las personas. Después de ser ingerido, *H. pylori* penetra a través de la capa mucosa viscosa y se multiplica en proximidad cercana a las células epiteliales superficiales (58). *H. pylori* prefiere colonizar primero el antro, debido a que no existen células parietales (las cuales se encuentran en el cuerpo del estómago) que secreten ácido (108,131,157). En esta fase inicial aguda de la infección existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica que es disparada por componentes de la membrana externa de la bacteria como los lipopolisacáridos (LPS) que inducen la producción de IL-8 y GRO α los cuales promueven el influjo continuo de neutrófilos en la mucosa gástrica infectada (131). Algunas personas presentan un período transitorio con síntomas gastrointestinales inespecíficos; durante este período se desarrolla hipoclorhidria, la cual puede durar meses (105). La respuesta inmune toma semanas en producirse y la presencia de la bacteria en las heces es máxima (2).

3.4.1.2 Gastritis crónica.

Después de un período de algunas semanas, se establece una segunda fase crónica, sin alteraciones macroscópicas características, en la que se reduce la respuesta inflamatoria a niveles bajos, pasando a un estado asintomático estable denominado gastritis superficial crónica (91), donde el huésped desarrolla una respuesta inmune que generalmente no es efectiva en la eliminación de *H. pylori*. La infección crónica afecta la liberación de gastrina y en consecuencia, la secreción de ácido clorhídrico (108). El mecanismo que conduce a una exagerada secreción de gastrina en la infección crónica por *H. pylori* no es muy claro; una posibilidad es que la generación de amonio por la ureasa de *H. pylori* crea un ambiente alcalino en la vecindad de las células G, que pueden estimular la liberación de gastrina (174). Aproximadamente el 90% de las personas con gastritis están infectadas con *H. pylori* (193).

3.4.1.3 Gastritis crónica atrófica.

Aproximadamente el 40% de las gastritis crónicas superficiales se convierten en atróficas con el paso del tiempo. Las personas infectadas que no han presentado síntomas asociados se vuelven asintomáticas y en la mayoría de los casos, la consecuencia final es una inflamación crónica asintomática que eventualmente progresa a gastritis crónica atrófica (39,40). La gastritis crónica atrófica asociada con la infección por

H. pylori comúnmente es un proceso multifocal que involucra el antro y el cuerpo gástricos (Fig. 4). La gastritis crónica atrófica es una lesión premaligna, en donde la mucosa sufre alteraciones progresivas ligadas a un estado inflamatorio crónico, hay adelgazamiento de la mucosa (39,40) y pérdida de células glandulares gástricas (39,40,58), después de la pérdida de las glándulas puede presentarse erosión o ulceración de la mucosa (58). La atrofia de la mucosa gástrica es el último paso del proceso crónico (39,40), es una lesión que se encuentra presente en el 90% de los cánceres gástricos (135). Actualmente la infección crónica por *H. pylori* es considerada como carcinógeno del grupo I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3).

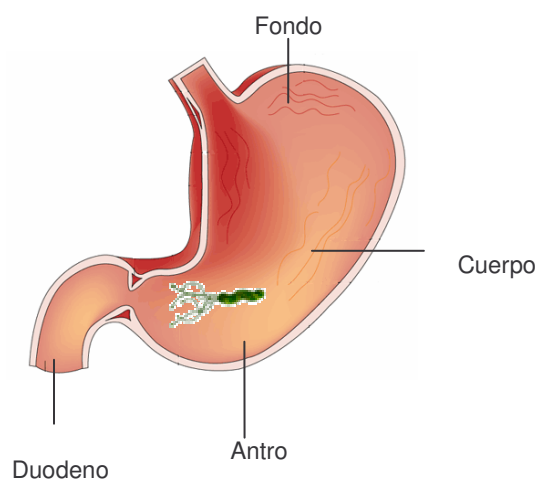


Figura 4. Estómago (208).

3.4.1.4 Úlcera péptica.

De origen multifactorial, la lesión consiste en el daño de la capa mucosa que protege al estómago de la acción del ácido y de las enzimas. La úlcera péptica se localiza principalmente en la curvatura menor del estómago y a nivel de la primera porción del duodeno, como se observa en la Figura 5a y 5b, donde se indica el porcentaje asociado a cada lugar (35,127). La infección por *H. pylori* es la causa más común de la úlcera gástrica y úlcera duodenal. El riesgo de desarrollar úlceras entre las personas infectadas con *H. pylori* es del 10-15% (158), normalmente la bacteria no coloniza el duodeno, pero en los pacientes con hiperclorhidria, el ácido llega al duodeno y las células intestinales son reemplazadas por células gástricas que permiten la colonización por *H. pylori* (46,94). Los pacientes con infección con *H. pylori* que desarrollan úlcera duodenal presentan

cambios en la función gástrica: una elevada liberación de gastrina de la mucosa antral y un incremento en la secreción de ácido estimulado por la gastrina (68). La prevalencia de la infección por *H. pylori* en pacientes con úlcera duodenal es mayor al 90% (46,94) y entre el 70-80% en la úlcera gástrica (94,262). Menos del 1% de los pacientes con úlcera duodenal llegan a desarrollar cáncer gástrico, dado que la ruta que lleva al desarrollo de dichos padecimientos son excluyentes (77,204,262) (Fig. 3).

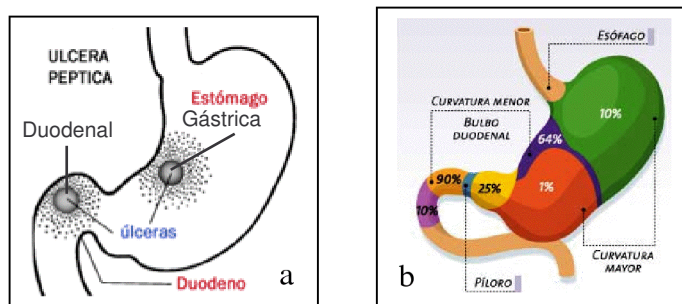


Figura 5. a) Localización de las úlceras pépticas (35), b) porcentaje de los lugares donde pueden desarrollarse las úlceras gástricas y duodenales (127).

3.4.1.5 Metaplasia intestinal.

Se ha encontrado que la infección por *H. pylori* juega un papel en el desarrollo de metaplasia intestinal (245). Comienza en la unión del cuerpo y el antro y se extiende al antro y el fondo. La metaplasia intestinal se considera como un factor de riesgo para la progresión a cáncer gástrico (58), se asocia con la gastritis crónica atrófica que precede el desarrollo de adenocarcinoma de tipo intestinal, dentro del proceso de carcinogénesis gástrica (38,41,42,262). Las glándulas gástricas son reemplazadas por epitelio de tipo intestinal diferenciado, similar al del intestino delgado normal, fácilmente reconocido por la presencia de células caliciformes (13). Se han descrito dos tipos: metaplasia intestinal completa y metaplasia intestinal incompleta, en esta última la diferenciación en epitelio intestinal no es total. Desde el punto de vista bioquímico se producen enzimas similares a las del intestino delgado como fosfatasa alcalina, disacaridasas, aminopeptidasa, etc. (218).

3.4.1.6 Displasia epitelial gástrica.

La displasia epitelial gástrica es una lesión precancerosa, generalmente ocurre en el contexto de una gastritis crónica atrófica y suele acompañarse de metaplasia intestinal. Con frecuencia se encuentran áreas de displasia alrededor de los adenocarcinomas

gástricos (220), siendo la única lesión histopatológica que se asocia específicamente con el cáncer gástrico. Los cambios displásicos se definen por la presencia de atipias celulares (modificaciones nucleares con pleomorfismo, hipercromatismo, aumento de la relación núcleo/citoplasma, pérdida de polaridad), anomalías de diferenciación (disminución parcial o total de la secreción mucosa y aumento del número de células indiferenciadas) y desorganización de la morfología de criptas y glándulas (220). Por lo general, se clasifica en ligera, moderada y severa. Mientras que en la mayoría de los casos, la displasia leve tiende a regresar o permanecer estable, tanto la displasia moderada y fundamentalmente la grave están frecuentemente asociadas con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (220). Aproximadamente en un 10% de los pacientes la displasia epitelial puede progresar a cáncer gástrico en el curso de 5 a 15 años, sin embargo, en la mayoría de los pacientes esta displasia regresa o permanece estable (219).

3.4.1.7 Cáncer gástrico.

Estudios en diferentes poblaciones y en modelos animales, muestran que *H. pylori* está asociado con el desarrollo de cáncer gástrico (16). En la historia natural de la carcinogénesis gástrica se establece la siguiente evolución: Gastritis crónica superficial => Gastritis crónica atrófica (GCA) => Metaplasia intestinal (MI) => Displasia (leve - moderada - severa) => Cáncer gástrico (CG). *H. pylori* desencadenaría una cascada de eventos que desembocan finalmente en el CG, existiendo por lo tanto mayor probabilidad de desarrollo entre más temprana sea la etapa en que se adquiere la infección.

Los pacientes infectados con *H. pylori* que llegan a desarrollar padecimientos severos, como úlcera péptica y cáncer gástrico, son el grupo ideal para la erradicación de la infección (4), sin embargo, actualmente no es posible identificar a aquellos pacientes asintomáticos infectados con *H. pylori* que tengan un alto riesgo para desarrollar dichas patologías. La prevalencia de la infección entre los pacientes con cáncer gástrico es ligeramente mayor en países en vías de desarrollo (60%) en comparación con la observada en países desarrollados que es del 53% (58). En un estudio multicéntrico en 13 países de Europa se encontró que el riesgo de desarrollar cáncer gástrico es 6 veces mayor en poblaciones infectadas con *H. pylori*, en comparación con poblaciones que no presentan la infección (1). Aproximadamente, el 1% de los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollarán cáncer gástrico (5,77,130), detectándose con mayor frecuencia en pacientes con cáncer gástrico en etapas tempranas, que en aquellos con etapas avanzadas de la enfermedad, debido posiblemente a que la bacteria no coloniza epitelios

atrofiados (124).

3.5 Epidemiología.

La infección por *H. pylori* es una de las más comunes a nivel mundial (31). Se estima que más del 50% de la población mundial se encuentra infectada con *H. pylori*. La prevalencia de *H. pylori* en países desarrollados es menor del 40%, mientras que en países en desarrollo es entre el 80-90% (209), como se observa en la Figura 6. La mayoría de las personas adquieren la infección a edades tempranas, principalmente por transmisión intra familiar (61), donde el 50% de los niños se infectan antes de la edad de 10 años (237), y persiste por décadas a menos que sea tratada; los niños pueden infectarse y eliminar la infección varias veces antes de infectarse con una cepa persistente (145). La prevalencia de la infección en hombres y mujeres es similar, incrementa con la edad y correlaciona con un estatus socioeconómico bajo (166,167). La pobreza, el hacinamiento y prácticas sanitarias inadecuadas pueden facilitar la prevalencia y la transmisión de la infección por *H. pylori*. La forma de transmisión no es clara, pero la ruta más probable es de persona a persona por las vías fecal-oral y oral-oral, con una correlación positiva de la transmisión madre a hijo (143,206). *H. pylori* se ha logrado aislar de la cavidad bucal y de las heces (21,163,243).

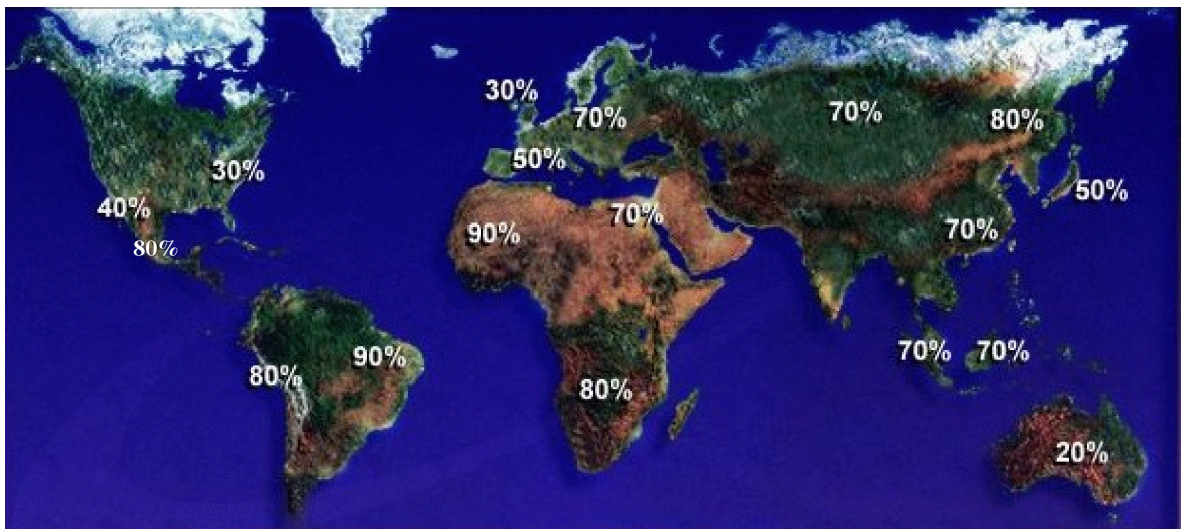


Figura 6. Porcentaje de la seroprevalencia a nivel mundial de la infección por *Helicobacter pylori* (107).

3.6 Factores de virulencia.

El hecho de que sólo una pequeña parte de las personas infectadas con *H. pylori* desarrollan síntomas clínicos y diferentes enfermedades, implica una vía multifactorial en

el desarrollo de la enfermedad. *H. pylori* tiene diversos factores que le permiten colonizar el estómago y permanecer por largos periodos de tiempo (181). La heterogeneidad genética de las cepas resulta en una variación de la composición de los factores de virulencia (75), se han identificado diversos factores que pueden contribuir a la patogenicidad de *H. pylori*. Estos factores pueden dividirse en categorías: aquellos requeridos para entrar e iniciar la colonización del hospedero; aquellos involucrados en la persistencia, evitando la respuesta inmune del hospedero y finalmente, aquellos que se utilizan para ocasionar daño en el tejido del hospedero y para la transmisión a un nuevo hospedero (76).

3.6.1 Flagelos.

Los flagelos de *H. pylori* le permiten moverse en la mucosa gástrica contrarrestando el peristaltismo, penetrando la capa de mucina (secretada por las células de la superficie de la mucosa) para alcanzar la superficie epitelial (65) y escapar del ácido que la rodea. La movilidad es importante para la persistencia de la infección.

3.6.2 Adhesinas.

La adherencia a las células epiteliales gástricas es un prerrequisito para la colonización del estómago por *H. pylori* (89), evitando la erradicación vía el intercambio de la mucosa y el peristaltismo gástrico. Se requiere el contacto íntimo con las células epiteliales para que se ejerzan los efectos patogénicos producidos por *H. pylori* en la mucosa gástrica, como son cambios morfológicos e inducción de una respuesta inflamatoria (242). Aproximadamente, el 1% de la población de *H. pylori* se adhiere a las células epiteliales, mientras que el resto de las bacterias se encuentran en la capa de moco (25). En *H. pylori* se han estudiado dos adhesinas: la adhesina A (BabA2), de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O (17,129), y la adhesina de unión al ácido siálico, SabA (129,162). BabA2 es una proteína de membrana externa que interactúa con el antígeno del grupo sanguíneo Lewis^b, en las células epiteliales, el producto del gen *babA1* es idéntico al de *babA2*, excepto por diez nucleótidos menos en su secuencia, BabA1 no puede interactuar con el antígeno Lewis^b, para colonizar el epitelio gástrico, mientras que BabA2 que es la única funcionalmente activa, está asociada con el riesgo de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico y su ausencia se relaciona con formas no complicadas de gastritis (88,212).

3.6.3 Ureasa.

Es una enzima que protege a la bacteria de los efectos del ácido gástrico, la ureasa transforma la urea que difunde del torrente circulatorio al estómago, en bicarbonato y amonio, los iones amonio aumentan el pH del ambiente local alcalinizando su entorno, la nube de amonio forma un microambiente que le permite colonizar el epitelio gástrico (Fig. 7) (64,249).

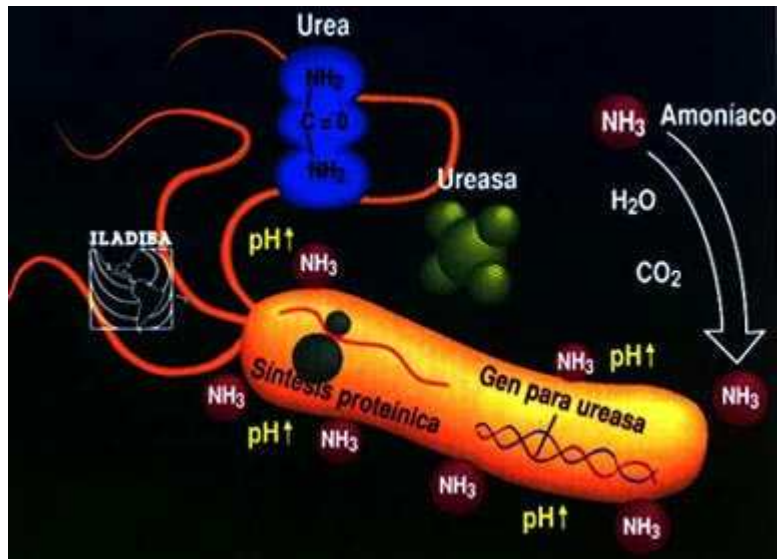


Figura 7. Producción de Ureasa (128).

Existen 7 genes dentro del operón de la ureasa *ureABIEFGH*; *ureA* y *ureB* son las subunidades estructurales de la ureasa, mientras que las proteínas codificadas por *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH* se requieren para agregar níquel como cofactor a la enzima, el cual se requiere para su actividad, como se observa en la Figura 8. Urel es una proteína integral de membrana que forma un poro urea-específico (186,221,264). El poro Urel se abre cuando el pH del medio es menor de 6.5, permitiendo que la urea entre al citoplasma, donde se encuentra la ureasa citoplásmica (265); el amonio producido es utilizado por la bacteria en la formación de proteínas y otros compuestos nitrogenados (186), así como para aumentar el pH a 6.2 del espacio periplásmico (58). La ureasa puede salir del citoplasma hacia el exterior de la célula cuando el pH externo disminuye (120,186).

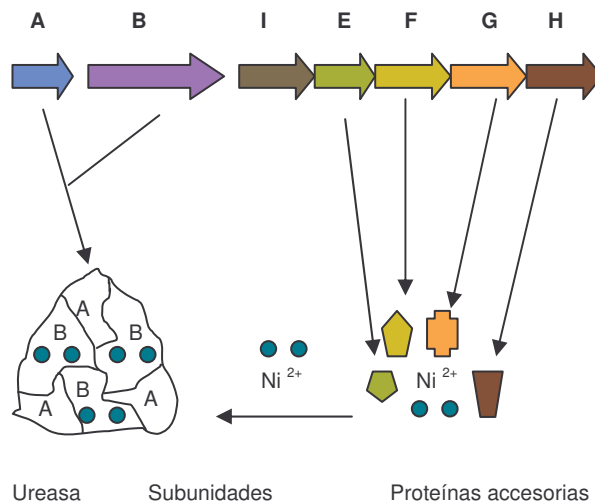


Figura 8. Modelo de la síntesis de la Ureasa (186).

3.6.4 Catalasa.

Es una enzima que se expresa abundantemente e inhibe la acción oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares presentes en la reacción inflamatoria de la mucosa gástrica y facilita la sobrevivencia de *H. pylori* en el tejido inflamado, en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno que lo transforma en agua y oxígeno (201,263). La catalasa está formada por cuatro subunidades codificadas por el gen *kataA*, formando una enzima monofuncional que carece de actividad peroxidasa, y su actividad es independiente del pH (116).

3.6.5 Lipopolisacáridos (LPS) y Antígenos Lewis.

El LPS es un componente esencial y común de la membrana externa de *H. pylori*. En la mayoría de las cepas de *H. pylori* los antígenos-O de los LPS expresan los carbohidratos de Lewis x (Le^x), Lewis y (Le^y), Lewis a (Le^a), Lewis b (Le^b), tipo H-1, antígeno-i, sialil Le^x y grupo sanguíneo A. En *H. pylori* se expresan los antígenos de Lewis en su superficie, como parte de sus polisacáridos (187,188).

Los antígenos de Lewis también se expresan en las células epiteliales. Los carbohidratos de los LPS son similares a los antígenos de los grupos sanguíneos. La cadena O-específica de los LPS se mimetiza en su estructura con los antígenos de Lewis del grupo sanguíneo humano (191). Es posible que el fenotipo del antígeno Lewis de una cepa de *H. pylori* sea igual al que se encuentra presente en las células de la mucosa gástrica del hospedero (14), lo que le permite evadir la respuesta inmune (191). Esta similitud puede llevar a una respuesta autoinmune por parte del hospedero contra sus propias células gástricas (15).

3.6.6 Proteína Activadora de Neutrófilos (NAP).

Una de las respuestas primarias a la infección por *H. pylori* es el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección. Se sabe que NAP es quimiotáctica para los neutrófilos humanos y permite la translocación de neutrófilos del torrente sanguíneo a la mucosa del estómago infectada (74). La NAP es un decámero compuesto de subunidades idénticas de 150 kDa, que se encuentra en el citosol y es liberada por autólisis (194), induce la producción de radicales de oxígeno en neutrófilos humanos a través de una cascada de activación de eventos intracelulares que pueden contribuir al daño de la mucosa del estómago (222), ocasionando la liberación de nutrientes que promueven la sobrevivencia de *H. pylori* (79). Es un importante antígeno en la respuesta inmune del hospedero a la infección por *H. pylori* y se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica (214).

3.6.7 Citotoxina vacuolizante (VacA).

La citotoxina vacuolizante se sintetiza como una protoxina de aproximadamente 140 kDa, que tiene modificaciones postraduccionales en los extremos amino y carboxilo para producir la citotoxina madura de 87 kDa (260). La toxina madura secretada puede ser degradada proteolíticamente en forma espontánea dando lugar a fragmentos de 33 y 55 kDa (designados como p33 y p55) (47,85,197,238). La citotoxina induce la formación de grandes vacuolas citoplasmáticas en células epiteliales *in vitro* y es capaz de inducir apoptosis (45,48). La unión de VacA a las células es mediada por la porción carboxilo terminal que corresponde al dominio de 55 kDa (20). Los dominios de VacA se internalizan y producen vacuolización cuando las células se incuban con una mezcla de los dominios p33 y p55, pero no cuando se incuban individualmente (247). Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA*, no obstante sólo el 60% de los aislamientos (49), producen una citotoxina activa que puede inducir vacuolización de las células en cultivo, por lo que se consideran con el fenotipo Tox⁺ (239). El gen *vacA* es polimórfico, principalmente en la región del péptido señal, donde puede tener los subtipos s1a, s1b, s1c y s2 y en la región media, los genotipos m1 o m2 (Fig. 9) (44). La actividad vacuolizante es mayor en los alelos s1m1 que en los s1m2 y no se encuentra en los genotipos s2m2 (19). Se ha encontrado que existe una asociación entre la producción de VacA y el daño en el tejido (168,238), ciertos genotipos de *vacA* como s1m1 con alta actividad vacuolizante correlacionan con padecimientos más graves en el humano (19) como úlcera péptica y cáncer gástrico (83), mientras que el genotipo s2 se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con gastritis (83,139). El gen *vacA* tiene únicamente un

alelo para la región s (s1 o s2) y otro para la región m (m1 o m2), la presencia de más de un alelo por región indica que se aisló más de una cepa.

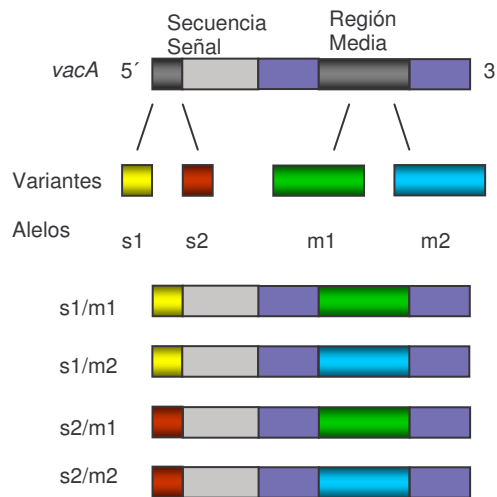


Figura 9. Diversidad de los alelos de *vacA* (44).

3.6.8 Isla de patogenicidad *cagPAI*.

La isla de patogenicidad *cagPAI* es uno de los factores de virulencia más relevante para la patogénesis de la bacteria. La isla de patogenicidad es un segmento de 40 kb, con un contenido de G+C del 35% que es menor que el 39% calculado para el genoma total de *H. pylori* (11,80,244). Lo anterior indica que la isla no se originó en *H. pylori* y que pudo adquirirse por transferencia horizontal. La isla tiene 27 marcos de lectura abiertos entre los que se encuentra *cagA* (Fig. 10) (8,32). Aún cuando los genes *vacA* y *cagA* no se encuentran juntos en el cromosoma, existe una asociación significativa entre la presencia de *cagA* y *vacA* s1 (253,254); las cepas *cagPAI* negativas rara vez expresan el genotipo *vacA* s1 (205). Las cepas de *H. pylori* se pueden dividir en dos tipos, las tipo I son *cagA*⁺/*vacA*⁺ y las tipo II son *cagA*⁻/*vacA*⁻ (273). Las cepas tipo I son más virulentas que las tipo II que no tienen la isla de patogenicidad y tienen el genotipo *vacA* s2 y no son citotóxicas (32). Las cepas tipo II, no se encuentran asociadas con patologías gástricas (273). Las cepas *cagPAI* se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica (32) y cáncer gástrico (32,160). La expresión de CagA se ha considerado como un marcador de la presencia de la isla y es una de las proteínas más inmunogénicas de *H. pylori* (205). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las cepas que tienen el gen que codifica para esta proteína se han aislado de pacientes con enfermedades gástricas graves. En forma similar varios estudios epidemiológicos han demostrado

asociación entre la seropositividad de CagA y el cáncer gástrico.

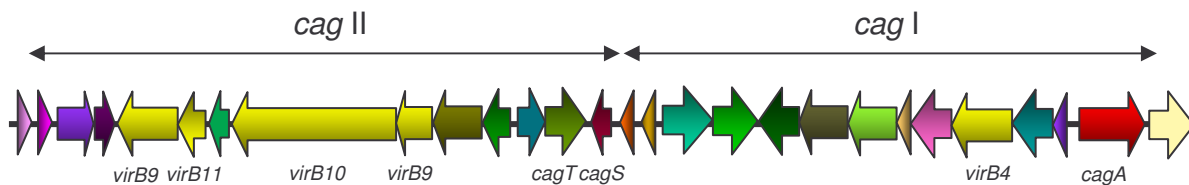


Figura 10. Representación esquemática de la isla de patogenicidad *cagPAI* de *H. pylori* 26695. Se señalan en color amarillo los genes homólogos al operón *vir* de *Agrobacterium tumefaciens* (80).

3.6.8.1 Citotoxina asociada al gen A (CagA).

Es una proteína con un peso molecular aproximado que varía de 120 a 145 kDa, conocida como citotoxina asociada al gen A (o CagA), con una región carboxilo terminal variable (32), se encuentra en aproximadamente el 60% de los aislamientos de *H. pylori* (43,250). El gen *cagA* se localiza al final de la isla de patogenicidad *cagPAI* (32) (Fig. 10). El gen *cagA* se utiliza como un marcador de la isla, con lo cual las cepas se dividen en *cagA*⁺ y *cagA*⁻. Las cepas *cagA*⁺ son más virulentas que las *cagA*⁻ (149) y juegan un papel importante en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (26,205). La unión de *H. pylori cagA*⁺ en células epiteliales humanas en cultivo induce su dispersión y alargamiento y un rearrreglo del citoesqueleto (224). Se ha propuesto que la translocación de *cagA* en las células depende de los genes de virulencia del sistema de secreción tipo IV que se encuentran en la isla de patogenicidad *cagPAI* (80).

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

El diagnóstico de la infección puede realizarse por varios métodos (Tabla 3). Las técnicas invasivas son cuando se detecta la bacteria en muestras obtenidas por endoscopia (cultivo bacteriológico, tinciones histológicas, técnicas moleculares) (34) y las no invasivas, son cuando se estudia alguna propiedad de la bacteria (prueba del aliento con urea-¹³C o urea-¹⁴C, prueba de la ureasa), respuesta inmune específica del hospedero (serología); (18) presencia de antígenos (saliva o heces) No es recomendable realizar las pruebas de detección en pacientes asintomáticos. Inicialmente, en pacientes menores de 50 años con enfermedades dispépticas no complicadas, deben realizarse pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero o sangre total. En caso de que los resultados de IgG resultaran negativos y persista la sintomatología, se recomienda realizar la prueba del aliento o la prueba del antígeno fecal

(258). También debe considerarse el uso de pruebas en suero de IgA (106), si existen señales de alarma como sangrado gastrointestinal o pérdida de peso, es recomendable realizar una endoscopia, obteniendo una biopsia de la mucosa gástrica (258).

Tabla 3. Métodos de detección de *Helicobacter pylori*.

TÉCNICAS INVASIVAS	TÉCNICAS NO INVASIVAS
Cultivo	Serología
Pruebas Bioquímicas	Prueba del Aliento
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Detección de Antígenos en Heces
Prueba Rápida de la Urea	
Pruebas Histológicas	

3.7.1 Cultivo.

La detección de *H. pylori* mediante el cultivo permite confirmar la infección. Debido a la dificultad de aislar y crecer la bacteria, el uso del cultivo como método de diagnóstico de la infección se encuentra limitado a estudios de investigación y la práctica médica privada. El cultivo puede realizarse a partir de biopsias obtenidas mediante endoscopías, de heces (243) y jugo gástrico. Laboratorios muy experimentados alcanzan un promedio de aislamiento de la bacteria del 75% al 90% (137). El aislamiento de la bacteria permite realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, así como su caracterización bioquímica y molecular.

3.7.2 Pruebas bioquímicas.

Los procedimientos de tinción proveen de información con respecto a la morfología de la bacteria y muy poca con respecto al género o especie de una bacteria. Para identificar a una bacteria es necesario realizar pruebas bioquímicas, ya que las diferentes especies de bacterias realizarán una serie de reacciones bioquímicas diferentes y únicas (23). Las pruebas bioquímicas identifican los compuestos químicos biológicos importantes específicos de cada bacteria, proporcionando una especie de “huella” metabólica de cada organismo. Para realizar estos ensayos es necesario conocer algunas de estas características de las bacterias como las reacciones bioquímicas celulares (enzimáticas) y

los substratos que utilizan (210).

3.7.2.1 Oxidasa.

La citocromo oxidasa también conocida como oxidasa, es una enzima que se encuentra presente en algunas bacterias que transfieren electrones al oxígeno, el aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones, por lo que no se encuentra presente en anaerobios estrictos. La enzima citocromo oxidasa oxida el citocromo c para hacer esta transferencia de energía (Fig. 11). La presencia de esta enzima puede detectarse con el uso de discos comerciales para la prueba de oxidasa que actúan como donadores de electrones para la citocromo oxidasa. Existen discos comerciales que contienen una amina aromática como el N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamino dihidrocloruro la cual actúa como donador de electrones, y cuando la bacteria oxida el citocromo c, éste a su vez oxida dicho reactivo y remueve los electrones, lo que genera que el disco se coloree púrpura, indicando una prueba positiva (231).

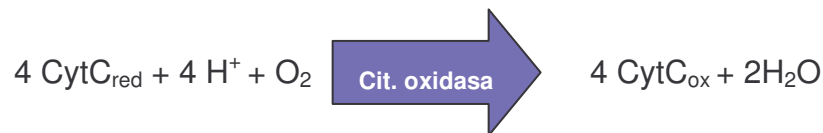


Figura 11. Actividad de la Citocromo Oxidasa.

3.7.2.2 Catalasa.

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, pero no se encuentra presente en los anaerobios. La catalasa cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Fig. 12). Es importante no contaminar la colonia de la bacteria a probar con agar sangre, ya que los glóbulos rojos tienen catalasa, lo que puede dar resultados falsos positivos. El ensayo no debe realizarse en cultivos viejos ya que pueden haber perdido su actividad de catalasa, dando falsos negativos. La prueba consiste en colocar unas cuantas bacterias en un portaobjetos, agregarle una gota de H₂O₂ al 3% y se observa la liberación de burbujas de oxígeno (259).



Figura 12. Actividad de la Catalasa.

3.7.2.3 Ureasa.

La ureasa es una enzima que hidroliza a la urea transformándola en amonio y bicarbonato (Fig. 13). La presencia de la ureasa puede detectarse colocando la bacteria en una solución de rojo fenol con urea, se libera amonio y cambia el pH del medio, haciéndose más básico y el color de la solución cambia de amarillo a rojo (22).



Figura 13. Actividad de la Ureasa.

3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La detección de *H. pylori* en las biopsias gástricas mediante la PCR proporciona resultados en corto tiempo. Se han desarrollado muchos protocolos para diferentes genes utilizando desoxiligonucleótidos específicos para *H. pylori* (33,92,202). Al realizar la amplificación del gen *ureA*, tanto en biopsias como en jugo gástrico, se puede detectar la presencia de *H. pylori*, así como la amplificación del gen *ureB* en biopsias embebidas en parafina. Los ensayos de PCR en tiempo real desarrollados últimamente permiten la detección y cuantificación simultánea, así como la determinación de la susceptibilidad a antibióticos y la genotipificación (33,92,202).

3.7.4 Prueba rápida de la urea.

La actividad de la ureasa de *H. pylori* se utiliza como prueba diagnóstica realizando el ensayo con la biopsia de la mucosa gástrica (115,173). La muestra de la biopsia obtenida en el momento de la endoscopia se coloca en una base de agar con urea con un colorante sensible al pH. La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bicarbonato, elevando el pH del medio, lo que ocasiona un cambio de color de amarillo a rosa; la sensibilidad de la prueba depende de la cantidad de microorganismos. Esta técnica generalmente tiene una sensibilidad mayor al 90%. Se pueden tener falsos negativos si el paciente está tomando inhibidores de la bomba de protones (62,137).

3.7.5 Pruebas histológicas.

Se obtienen biopsias de la mucosa gástrica mediante endoscopia con la finalidad de obtener información relacionada con la infección por *H. pylori* y los cambios morfológicos en la mucosa gástrica; esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad

mayor al 90%. Se recomienda que se tomen por lo menos dos biopsias del antro y dos del cuerpo del estómago (62,137). *H. pylori* se localiza en la capa de moco adherida a la superficie del epitelio y con frecuencia se encuentra en la profundidad de las criptas. La identificación histológica de la bacteria, depende del histopatólogo. Existen factores que pueden influenciar en la identificación como la densidad bacteriana, el tipo de tinción utilizado y la experiencia del laboratorio (62). Se pueden obtener falsos negativos cuando los pacientes están tomando inhibidores de la bomba de protones.

3.7.6 Serología.

En respuesta a la infección por *H. pylori*, el sistema inmune desarrolla una respuesta produciendo inmunoglobulinas para los antígenos específicos de la bacteria. Estos anticuerpos se pueden detectar en el suero o la sangre total del paciente debido a que los niveles de anticuerpos en sangre permanecen por largos períodos de tiempo. Existen buenos argumentos para considerar que las cepas asiáticas son diferentes, dos estudios realizados en Japón y Vietnam confirmaron que el uso de antígenos de cepas locales dan mejores resultados de especificidad de las pruebas serológicas que el uso de antígenos de cepas occidentales (119,199) de lo cual se puede concluir que la elección del antígeno es crítica. La prueba de ELISA para anticuerpos IgG contra *H. pylori* es la que se utiliza más comúnmente (179), después de la erradicación de la infección el nivel de IgG desciende a la mitad de los valores iniciales en 6 meses aproximadamente (147). Se utilizan diferentes marcadores para detectar la presencia de anticuerpos, principalmente contra cepas patógenas, entre los cuales el más común es CagA (113), así como una combinación de antígenos con un peso molecular que oscila entre 116 kDa y 26.5 kDa (150). Estas técnicas indican una exposición a la infección por *H. pylori*, pero no discriminan entre la infección activa o exposición previa en personas sanas.

3.7.7 Prueba del aliento de la urea.

Es una prueba sensible que puede usarse para determinar la presencia de *H. pylori* (infección activa) antes de iniciar un tratamiento y en el seguimiento después de la terapia con antibióticos (7), para confirmar la erradicación. La actividad de la ureasa en el estómago se considera un marcador de la infección activa por *H. pylori* (18). La prueba debe realizarse después de 4 semanas de haber concluido el tratamiento con antibióticos, inhibidores de la bomba de protones y bismuto (234). Al paciente se le administra por vía oral una pequeña dosis de urea marcada con un isótopo ^{13}C (no radioactivo) o ^{14}C

(radioactivo). Si existe infección por *H. pylori*, la ureasa bacteriana hidroliza la urea para producir CO_2 y amonio (Fig. 13). El CO_2 lleva el ^{13}C o ^{14}C , los cuales difunden al torrente circulatorio y es excretado por los pulmones (Fig. 14). El ^{13}C es detectado por espectrómetro de masas y el ^{14}C por contador de centelleo, 30 a 60 minutos después de tomar la solución. La sensibilidad y especificidad de la prueba son mayores al 90%, pero se pueden obtener falsos negativos cuando los pacientes están tomando inhibidores de la bomba de protones (137).

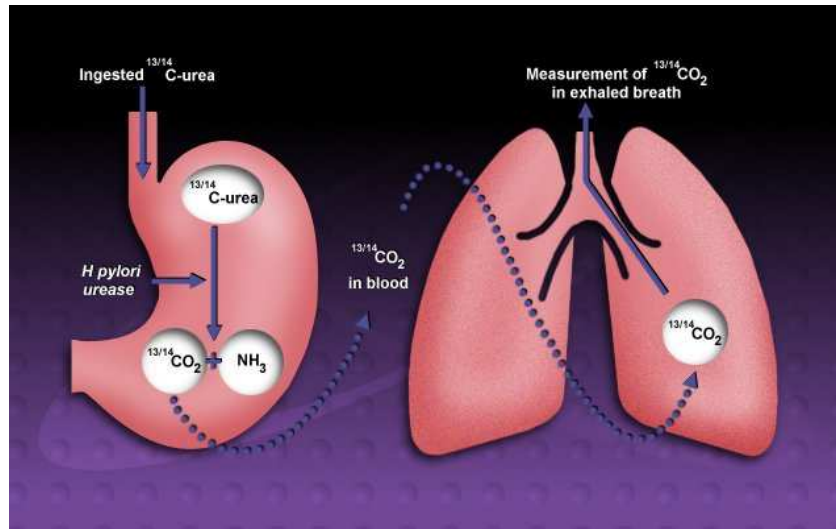


Figura 14. Prueba del aliento de la urea (107).

3.7.8 Detección de antígenos en heces.

Se ha utilizado en el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* y en la confirmación de la erradicación después del tratamiento. La prueba es un inmunoensayo enzimático con anticuerpos policlonales, aunque se encuentra en estudio un anticuerpo monoclonal (164). La sensibilidad y especificidad de la prueba varía de un 84 a un 95% (137,165). Se pueden obtener falsos negativos cuando los pacientes están tomando inhibidores de la bomba de protones (137). Debido a que este ensayo es una prueba no invasiva, se recomienda realizarla en pacientes pediátricos (258).

3.8 Tratamiento.

En una infección crónica con *H. pylori*, la bacteria no puede ser eliminada por el sistema inmune del hospedero, por lo que, para erradicar la infección, se requiere del uso de antibióticos (118,185); desafortunadamente no existe un tratamiento ideal y la elección

del mismo debe hacerse con base en los patrones de susceptibilidad locales (51). El tratamiento para la infección por *H. pylori* debe aplicarse después del diagnóstico clínico. El éxito en la erradicación de la infección depende de varios factores, entre los más importantes se consideran: la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos utilizados y que el tratamiento se complete adecuadamente por los pacientes (104,176). Los antimicrobianos pueden actuar tópicamente contra *H. pylori* (cuando pasan a través del lumen gástrico en su paso hacia el intestino como el bismuto) o sistémicamente (cuando son transferidos al lumen gástrico por el sistema circulatorio después de la absorción intestinal como el metronidazol) (96). Se han propuesto diferentes pautas de tratamiento. En 1994 el Instituto Nacional de Salud (NIH) en los Estados Unidos de Norteamérica organizó la primera reunión de consenso sobre *H. pylori* y la úlcera péptica, donde se concluyó que los pacientes con úlcera péptica deberán curarse de la infección con una droga antisecretora combinada con antibióticos anti *H. pylori* (2). El grupo Europeo de estudio sobre *H. pylori* organizó una reunión en Maastricht con expertos microbiólogos, médicos generales y gastroenterólogos, para establecer normas en el manejo de la infección por *H. pylori*. Los lineamientos del Maastricht recomiendan la terapia de erradicación en pacientes positivos a la infección por *H. pylori* con úlcera duodenal o gástrica, linfoma asociado a la mucosa gástrica (MALT) de bajo grado, gastritis con severos cambios macro o microscópicos y después de una resección de cáncer gástrico temprano. El tratamiento para la erradicación debe tener una tasa de erradicación superior al 90%, utilizando una terapia triple con un inhibidor de la bomba de protones (IBP) claritromicina, metronidazol o tinidazol y amoxicilina durante una semana, lo que corresponde con los lineamientos establecidos (4). El reporte del consenso Maastrich 2 en el 2000, introduce el concepto “tratamiento en paquete” en el que se consideran terapias de erradicación de primera y segunda línea. La terapia de primera línea es la combinación de un IBP como omeprazol o lansoprazol o antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina como ranitidina-citrato bismuto (RBC) y claritromicina más amoxicilina o metronidazol, dos veces al día. La segunda línea de tratamiento es una terapia cuádruple con IBP o RBC dos veces al día, bismuto y tetraciclina cuatro veces al día y metronidazol tres veces al día. Ambas terapias deben seguirse por un mínimo de siete días (123). La supresión ácida por antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina o inhibidores de la bomba de protones, ayudan en el alivio de los síntomas asociados a la úlcera (dolor abdominal, náuseas, etc.), ayudan a contrarrestar la inflamación de la mucosa y pueden aumentar la eficacia de los antibióticos frente a *H. pylori* en la superficie de la mucosa gástrica (2,123). Se ha observado que la erradicación de la infección cura la úlcera y su recurrencia (117,122). Después del tratamiento se deben realizar pruebas no invasivas,

para confirmar que la infección ha sido erradicada (137). La prueba debe llevarse a cabo al menos 4 semanas después de concluir el tratamiento.

Tabla 4. Tratamientos para la erradicación de la infección por *H. pylori*.

TRATAMIENTO
1. TERAPIA CON TRES MEDICAMENTOS
Claritromicina + Amoxicilina o Metronidazol + IBP
Claritromicina o Metronidazol + Amoxicilina o Tetraciclina + IBP
Claritromicina o Metronidazol + Amoxicilina o Tetraciclina + ARH ₂
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto
2. TERAPIA CON CUATRO MEDICAMENTOS
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + IBP
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + ARH ₂
Metronidazol + Claritromicina o Amoxicilina + IBP + ARH ₂
Amoxicilina + Claritromicina + IBP + ARH ₂
3. TERAPIA CON CINCO MEDICAMENTOS
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + ARH ₂ + IBP

IBP: Inhibidor de la bomba de protones.

ARH₂: Antagonista de los receptores tipo 2 de la histamina.

3.8.1 Inhibidores de la bomba de protones (IBP).

Son benzimidazoles substituidos que tienen el mismo mecanismo de acción. En un ambiente ácido, la protonación de la piridina y los nitrógenos del benzimidazol resultan en la formación de una tetraciclina sulfenamida que es la forma activa de la droga. La sulfenamida se une a los residuos de cisteína en el sistema de la enzima H⁺K⁺ ATPasa en la superficie de las células parietales gástricas formando puentes disulfuro que inhiben la actividad de la bomba. Al bloquear la bomba inhiben el último paso de la secreción de ácido gástrico en las células parietales gástricas (123). Los IBP tienen un efecto bactericida *in vitro*, pero *in vivo* se ha demostrado que reducen la cantidad de *H. pylori* sin

erradicarlo, esto puede deberse al aumento en el pH gástrico (51).

3.8.2 Antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina (ARH₂).

Los antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina también conocidos como antagonistas H₂, son drogas que bloquean la acción de la histamina en las células parietales en el estómago, disminuyendo la producción de ácido por estas células (155); elevando el pH del contenido del estómago y reduciendo el dolor relacionado con la acidez. Los antagonistas de los receptores H₂ inhiben la producción de ácido compitiendo con la histamina en la unión a los receptores H₂ de las células parietales (121,274). Recientemente se ha introducido el uso de ranitidina-citrato bismuto, que es una sal del antagonista del receptor H₂. Comparten una homología estructural con la histamina (268).

3.8.3 Macrólidos.

La claritromicina es un antibiótico semisintético. La claritromicina penetra la membrana externa y pared celular de los microorganismos susceptibles y se une en forma reversible a la subunidad 50S del ribosoma 70S, inhibiendo la translocación del aminoacil tRNA y la síntesis de proteínas (27). Hansen y cols. demostraron que los macrólidos interactúan con el RNAr 23S conectándose con la horquilla 35 en el dominio II del RNAr y con la horquilla de la peptidiltransferasa en el dominio V (Fig. 15) (111).

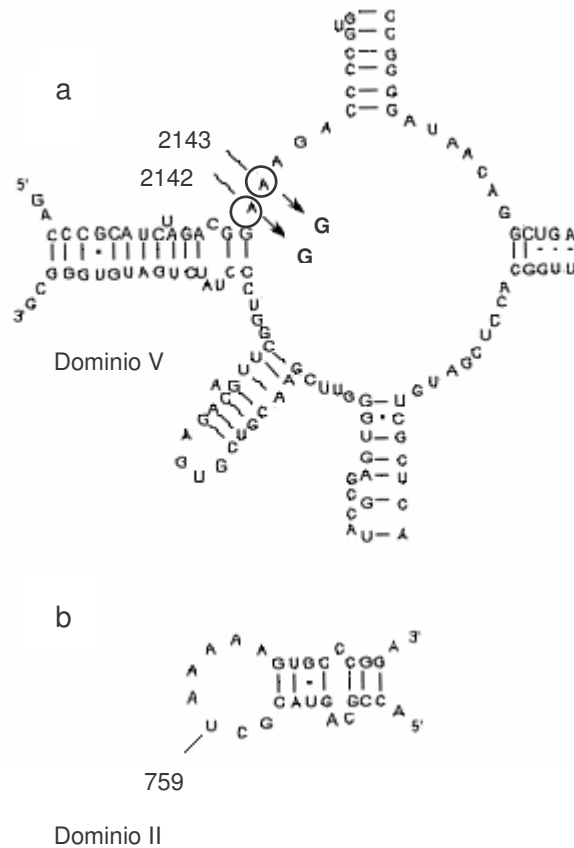


Figura 15. Estructura secundaria del centro de la peptidil transferasa en el Dominio V del RNAr 23S (a) y la horquilla 35 del dominio II (b). Modificación de los números en el dominio V de acuerdo a *H. pylori* (67).

El tunel de salida de la proteína naciente tiene un sitio de alta afinidad para los antibióticos como los macrólidos. Este sitio se localiza en la parte superior del tunel, debajo del centro de la peptidil transferasa (CPT) (Fig. 16) (275). Los macrólidos se unen a este sitio con gran afinidad en ribosomas vacíos o en vías de traducción con un péptido naciente corto (12,37,235,241), bloqueando la progresión de la proteína naciente a través del tunel de salida, lo que ocasiona el paro de la elongación (87,275). Este paro lleva a la disociación de pequeños peptidil-tRNA del ribosoma (240).

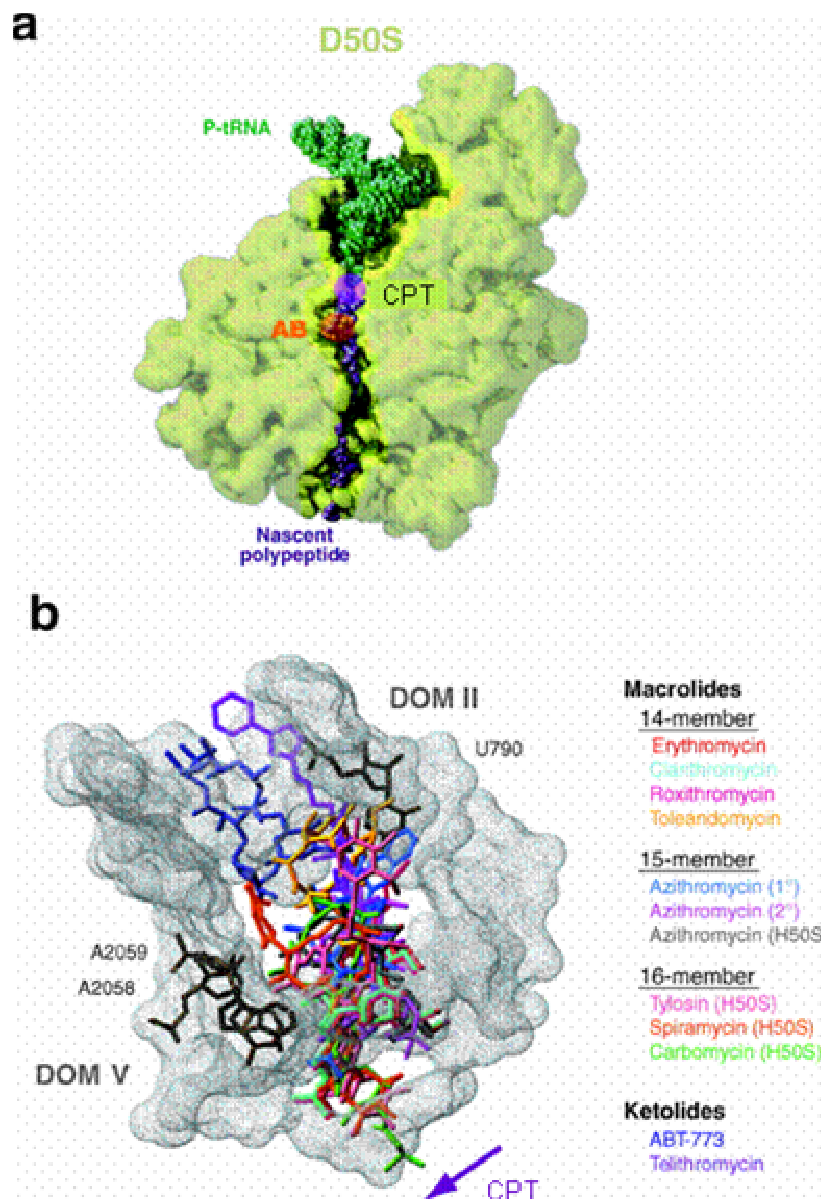


Figura 16. *Deinococcus radiodurans* a) Sección de la subunidad 50S del ribosoma, donde se observa un tunel y se muestra la localización del CPT y de los macrólidos. b) Las formas de unión de diferentes antibióticos en el tunel del ribosoma en el sitio de unión de macrólidos. La posición de los nucleótidos de unión a macrólidos en los dominios V y II se encuentran marcados (275).

La claritromicina tiene actividad bacteriostática, pero puede ser bactericida en algunos microorganismos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* (78). La claritromicina es el único macrólido aprobado por la FDA (Agencia Federal de Drogas) para usarse en el tratamiento contra la infección por *H. pylori* (27). El gen del RNAr 23S está presente en dos copias en el genoma de *H. pylori* (236,244). En *H. pylori* se han encontrado diferentes mutaciones puntuales (A2115G, G2141A, A2142G, A2142C, A2142T, A2143G, A2143C, A2143T y T2717C) en la horquilla del dominio V del RNAr 23S asociadas con la resistencia a claritromicina

(82,126,200,233,236,252,256). Debido a que la resistencia a macrólidos está codificada en el cromosoma y se transfiere en forma vertical a su descendencia, su dispersión se encuentra relativamente limitada (175). La prevalencia de la resistencia a claritromicina varía de acuerdo con la localización geográfica (10,53), en algunos países la resistencia a claritromicina varía de 1 al 10% (10,175), en nuestro país se ha reportado que la resistencia a claritromicina incrementó de 1995 a 1997 alcanzando valores del 24% (246). La claritromicina no es estable a pH ácido, por lo que se administra junto con antisecretorios como los IBP y los antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina (70,72).

3.8.4 Nitroimidazoles.

Son pro-drogas que necesitan ser activadas intracelularmente para ser efectivas, son muy estables a pH bajo (262). Después de entrar en las células por difusión pasiva, los nitroimidazoles son metabolizados por un paso de reducción en el que la droga es el aceptor de electrones (66). Para esta reducción *H. pylori* posee diversas nitrorreductasas, (116,125), sugiriéndose que una nitrorreductasa NADPH insensible al oxígeno codificada por el gen *rdxA* es la más importante (99). Esta enzima reduce el metronidazol a metabolitos activos (hidroxilamina) mutagénicos que son tóxicos para la bacteria; estos nitrosoderivados tóxicos no pueden ser reoxidados por el oxígeno molecular, producen daño en el DNA y ocasionan la muerte de la bacteria (99). El uso de nitroimidazoles resulta en un incremento en la frecuencia de mutaciones de todos los genes, incluyendo *rdxA*, lo que ocasiona una inducción rápida de mutantes resistentes a nitroimidazoles (133). Además de *RdxA*, la proteína parecida a ferredoxina (*fdxB*) y la flavin oxidorreductasa NAD(P)H (*frxA*), pueden contribuir a la activación del metronidazol en *H. pylori*, mutaciones en estos genes están asociadas con el fenotipo de resistencia (152,153). El crecimiento de cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol en presencia de este antibiótico lleva a la disminución de las actividades de diversas enzimas del ciclo de Krebs (Fig. 17) (119).

vías de desarrollo se aproxima al 90% y en países de Europa occidental varía del 10 al 44% (10,63,161,269), mientras que en Japón la prevalencia es mayor en Kioto 23.8% que en Sapporo 8.1% (136). En México se ha reportado que la resistencia a metronidazol alcanzó valores del 80% en 1997 (246). Por lo que es importante tomar medidas para controlar el uso de los nitroimidazoles en el tratamiento contra *H. pylori*

3.8.5 Beta lactámicos.

La amoxicilina es un derivado semisintético de la penicilina, es el único antibiótico beta lactámico empleado para tratar la infección por *H. pylori* (175), que se incluye en los esquemas de tratamiento. Inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) localizadas en la pared celular, interfiriendo con la síntesis del peptidoglicano. Esta inhibición resulta en un debilitamiento de la pared celular bacteriana y finalmente en la lisis y muerte celular (58,271). Alteraciones en las PBP pueden conferir resistencia a los antibióticos beta lactámicos afectando la unión de los mismos a las PBP (110,272). En *H. pylori* se han detectado ocho PBP con pesos moleculares que van de 28 a 72 kDa (112). En un ensayo se encontró que la amoxicilina se une exclusivamente a la PBP de 72 kDa (PBP1A) con mayor afinidad que la ampicilina-digoxigenina, sugiriendo que esta PBP puede estar involucrada en la resistencia a amoxicilina (112). Grupos de investigación como el de Harris y Gerrits y cols. (90,112) mostraron que mutaciones puntuales en el gen de la PBP1A, estaban asociadas con la resistencia estable a amoxicilina en cepas clínicas aisladas de un paciente y que esta resistencia puede transferirse a una cepa susceptible por transformación genética. En general la prevalencia de la resistencia a amoxicilina permanece baja en la mayoría de los países, no obstante se han encontrado altas tasas de resistencia en estudios realizados en Sardinia, Italia 26% (215); 29% en Brasil (180) y 41% en China (272). Aunque la amoxicilina es estable a pH ácido, la disminución de la acidez gástrica aumenta su actividad (72).

3.8.6 Factores de virulencia asociados a la resistencia antimicrobiana.

En aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos beta lactámicos de amplio espectro, se ha detectado la expresión de factores de adherencia como KPF-29 (56) y la fimbria KPF-28 presentes en plásmidos que codifican beta lactamasas de amplio espectro como CAZ-1/TEM-5 y CAZ-5/SHV-4 respectivamente (57). Mientras que en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* susceptibles a estos antibióticos, no se ha detectado la presencia de estos factores de adherencia. La relación

entre los antibióticos y los genes de los factores de colonización pueden contribuir a la emergencia y persistencia de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae in vivo* en el intestino humano, aún en ausencia de la presión de selección de la antibioterapia.

Algo similar puede estar ocurriendo con las cepas de *H. pylori* resistentes a los antimicrobianos antes mencionados. Sería muy interesante estudiar si existe una relación entre los factores de virulencia y la resistencia, ya que se ha sugerido que el ambiente fisiológico promovido por las cepas *cagA*⁻ reduce la exposición de la bacteria al antibiótico, haciendo que sea más difícil erradicarla (28,256). En el caso de claritromicina se sugiere que las cepas *cagA*⁺ son más susceptibles a este antibiótico ya que crecen más rápido que las cepas *cagA*⁻ (28).

3.9 Marcadores genéticos.

Los marcadores genéticos son variaciones en el genoma que pueden usarse para entender eventos genéticos. Para que un marcador sea útil, la variación genética debe ser polimórfica, deben existir dos o más variaciones comunes en la población bajo estudio. Un marcador genético puede ser un gen funcional, donde la función no es la importante, sino las variaciones en la estructura del DNA que se reflejan en diferencias funcionales entre los alelos. Estos marcadores genéticos nos proporcionan información útil para estudios epidemiológicos y para conocer la estructura genética de las poblaciones. Las técnicas más comúnmente utilizadas para estudiar los marcadores genéticos son: Electroforesis por campos pulsados (PFGE), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Polimorfismo de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR), Ribotipificación y Amplificación azarosa de DNA polimórfico (RAPD).

3.9.1 Electroforesis por campos pulsados (PFGE).

La electroforesis por campos pulsados es una técnica que permite la comparación de largos fragmentos de DNA genómico después de la digestión con una enzima de restricción. Difiere de la electroforesis convencional en agarosa en que la orientación del campo eléctrico a lo largo del gel cambia periódicamente en comparación con la electroforesis estándar, que es unidireccional y constante, permitiendo que los fragmentos de DNA de alto peso molecular se realineen en la nueva dirección del campo eléctrico. La variabilidad en el campo eléctrico permite a la PFGE separar fragmentos muy largos (>600 kb) (248).

3.9.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Es una técnica en la que el DNA se corta en fragmentos, utilizando enzimas de restricción que reconocen una secuencia genética (en ocasiones flanquean la región polimórfica) que ocurre repetidamente, de tal forma que los organismos pueden ser diferenciados por el análisis en los patrones derivados de la digestión enzimática de su DNA (196). Si dos microorganismos difieren en la distancia entre los sitios de restricción de una enzima en particular en su genoma, debido a una mutación que generó o eliminó un sitio de restricción enzimática, la longitud de los fragmentos producidos será diferente, lo que representa el polimorfismo (196,227). Los fragmentos de DNA se separan de acuerdo con su tamaño por medio de electroforesis en geles de agarosa. La similitud de los patrones generados puede usarse para diferenciar una especie de otra y aún entre cepas (196).

3.9.2.1 RFLP-Southern blot.

Una vez que se han determinado los patrones de migración, los fragmentos se transfieren mediante transferencia por capilaridad (Southern blot) a una membrana de Nylon. Se utiliza una sonda que es capaz de reconocer específicamente el polimorfismo en estudio, para visualizar las secuencias complementarias a los fragmentos de DNA (196).

3.9.2.2 RFLP-PCR.

Es una técnica que detecta polimorfismos en el DNA en un locus particular. Después de amplificar el locus de interés mediante PCR, los fragmentos generados se cortan con enzimas de restricción, los polimorfismos se detectan por diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción, los que se separan mediante electroforesis en geles de agarosa (54).

3.9.3 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR).

Esta técnica permite la identificación mediante la amplificación por PCR de los polimorfismos de los fragmentos genómicos cortados con enzimas de restricción (192,261). Se ha utilizado para mapeo genético de plantas y animales, diagnóstico médico, estudios filogenéticos y tipificación microbiana (223). Para el análisis del AFLP (Fig. 18a)

se requieren pequeñas cantidades de DNA genómico purificado, el cual es digerido con dos enzimas de restricción, una con una frecuencia regular de corte (como *EcoRI*) y una segunda con una frecuencia alta de corte (como *MseI* o *TaqI*). Se diseñan desoxioligonucleótidos adaptadores complementarios, de tal manera que el sitio de restricción inicial no se restablezca después de la ligación (Fig. 18b) (192,223). Dependiendo del tamaño del genoma, la restricción-ligación genera miles de fragmentos adaptados. Las secuencias del extremo de cada fragmento adaptado constan de una secuencia adaptador (en rojo) y la parte restante de la secuencia de restricción (en azul y verde). Para obtener la amplificación selectiva de este subconjunto de fragmentos, estas secuencias finales sirven como moldes para el diseño de los desoxioligonucleótidos específicos para los adaptadores, los cuales en el extremo 3' (nucleótidos subrayados) tienen de uno a tres nucleótidos arbitrarios después del sitio de restricción (Fig. 18c, en negro). Dicha extensión de uno, dos o tres nucleótidos arbitrarios reduce el número de fragmentos amplificados por un factor de 4, 16 y 64 respectivamente (192). Se observan de 40 a 200 bandas al analizarse en electroforesis en geles de poliacrilamida.

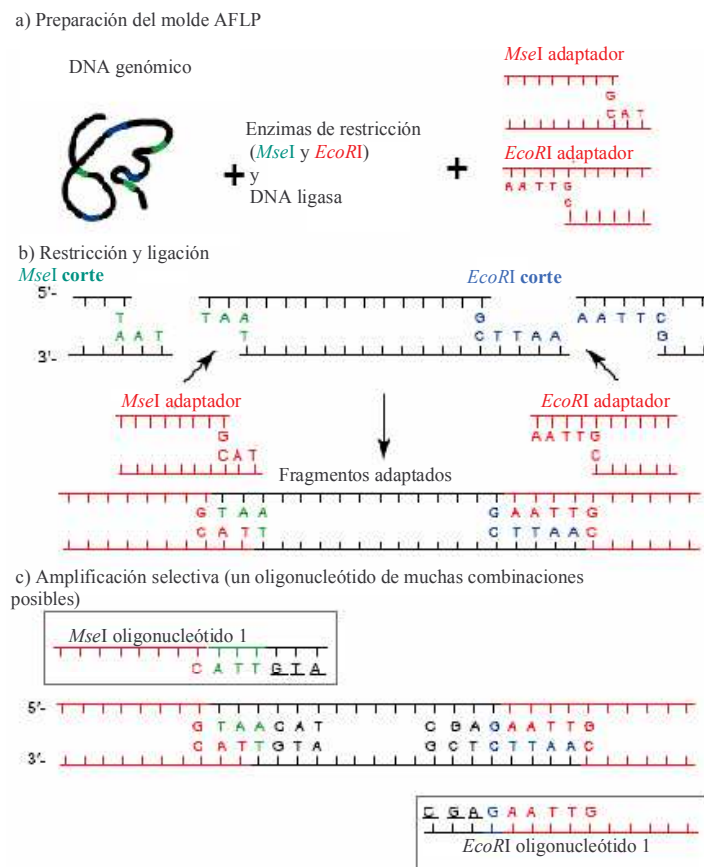


Figura 18. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP-PCR) (192).

3.9.4 Ribotipificación.

Permite diferenciar las bacterias detectando cambios en los sitios de restricción enzimática en el genoma bacteriano, puede utilizarse una o más enzimas de restricción. Los fragmentos restringidos se separan por tamaño en geles de agarosa, las bandas se transfieren a una membrana y se hibridan con una sonda de RNAr marcada. La sonda que se utiliza puede construirse en base al RNAr 16S o 23S o ambos, o en algún fragmento conservado de algunos de los genes del RNAr. Los patrones de los fragmentos de diferentes tamaños son comparados entre los aislamientos y éstos a su vez con el mismo patrón (257).

3.9.5 Amplificación azarosa de DNA polimórfico (RAPD).

Son fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando desoxioligonucleótidos cortos, generalmente de 10 pb y diseñados con secuencias azarosas. Estos desoxioligonucleótidos sirven como iniciadores sentido y antisentido (Fig. 19) que pueden amplificar fragmentos en 3 a 10 sitios genómicos simultáneamente. Se utilizan bajas concentraciones de DNA molde (5-50 ng por reacción) y para el diseño de los desoxioligonucleótidos no se requiere conocer la secuencia del DNA. Los fragmentos amplificados (0.5-5 kb) son separados por electroforesis en geles de agarosa y los polimorfismos son detectados como la presencia o ausencia de bandas de determinado tamaño (109,227,267). Estos polimorfismos se deben a la variación en los sitios de alineamiento de los desoxioligonucleótidos (227). Los RAPD se han utilizados con diversos propósitos, desde estudios a nivel individual (ej. identidad genética) a estudios en los que se involucran especies cercanamente relacionadas. Debido a su abundancia genómica muy alta, los RAPD se han aplicado en estudios de mapeo genético (109,267).

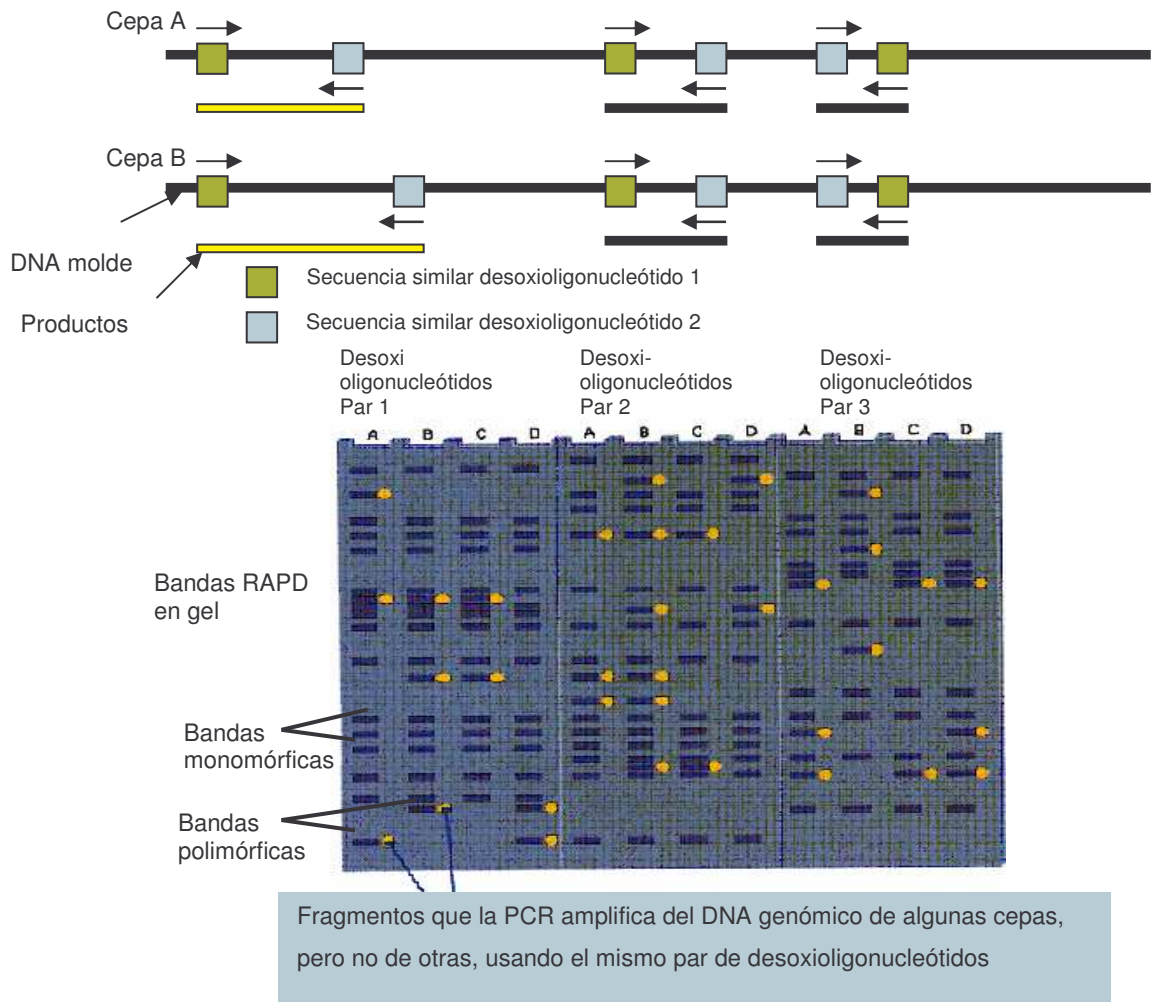


Figura 19. RAPD (Amplificación azarosa de DNA Polimórfico).

4 Justificación.

En países en desarrollo, como México, las enfermedades gástricas como la gastritis, la úlcera péptica y el cáncer gástrico constituyen un problema de salud pública. Los conocimientos recientes indican que la gran mayoría de estas afecciones son causadas por la infección por *H. pylori*. En estudios realizados en diversas instituciones de salud (del sistema de seguridad social y públicas) en nuestro país, se ha estimado que la prevalencia de la infección por *H. pylori* no es muy diferente entre personas con padecimientos gástricos sintomáticos, en pacientes con gastritis crónica atrófica y aquellos que presentan algún tipo de neoplasia gástrica. Estos resultados sugieren diferentes características de las cepas circulantes en México, con distintos grados de patogenicidad, por lo que sería muy útil contar con la genotipificación de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes infectados que han desarrollado diferentes patologías

gástricas. Entre los factores de virulencia asociados a las enfermedades gástricas se encuentran las citotoxinas VacA y CagA, así como otras proteínas que son importantes para la colonización y persistencia de la bacteria. La caracterización de los factores de virulencia que pueden contribuir a la progresión de las enfermedades gastroduodenales es de gran importancia. Por otro lado, no es posible adjudicar el espectro de enfermedades generadas por *H. pylori* únicamente a los factores de virulencia de *H. pylori*. Es obvio señalar que en una enfermedad infecciosa, uno de los puntos clave para determinar la recuperación de la misma es la sensibilidad o resistencia del microorganismo a los agentes antimicrobianos utilizados, amén de otros caracteres de la propia bacteria (tropismo, factores de colonización y virulencia, etc.). El tratamiento ideal no se ha encontrado aún y en la elección de los antibióticos utilizados para la terapia se debe considerar los patrones de susceptibilidad locales de aislamientos clínicos. En nuestro país se han realizado una serie de estudios sobre los genotipos de *vacA* y la presencia de *cagA* de cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes con padecimientos gástricos (189), así como sobre la susceptibilidad a los antimicrobianos amoxicilina, claritromicina y metronidazol (86,246). No obstante no se han realizado estudios sobre la caracterización molecular de la resistencia a claritromicina, amoxicilina o metronidazol, ensayos de citotoxicidad y su relación con la resistencia a los antibióticos.

Por lo tanto, fue nuestro interés caracterizar las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferentes patologías gástricas, determinando la presencia de los genes *vacA* y *cagA*, la citotoxicidad de las cepas, así como los patrones de susceptibilidad a los principales antibióticos empleados en el tratamiento de la infección en nuestro país e identificar el mecanismo molecular de la resistencia a claritromicina y amoxicilina, ya que en el caso de la resistencia a metronidazol son diferentes genes los involucrados en la resistencia.

Este estudio contribuirá a determinar si los factores de virulencia VacA y CagA de las cepas mexicanas pueden usarse como marcadores genéticos de *H. pylori* relacionados con la resistencia a antibióticos.

Además este será un estudio piloto que permitirá determinar la factibilidad de realizar un estudio epidemiológico incluyendo un mayor número de pacientes provenientes de diferentes hospitales del sector salud.

5 Objetivo general.

Conocer la variabilidad estructural de los genes *vacA* y *cagA* y la frecuencia de la

resistencia a claritromicina, metronidazol y amoxicilina de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes adultos con diferentes padecimientos gástricos durante 1997, 2000 y 2001.

5.1 Objetivos particulares.

1. Analizar e identificar la diversidad genómica de los aislamientos clínicos.
2. Estandarizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos utilizando la cepa de colección ATCC 43504 de *H. pylori*.
3. Determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos metronidazol, claritromicina y amoxicilina en aislamientos clínicos de *H. pylori*, provenientes de pacientes con enfermedades gástricas.
4. Identificar el mecanismo molecular de la resistencia a claritromicina y amoxicilina de los aislamientos clínicos de *H. pylori*.
5. Determinar la variabilidad y expresión del gen *vacA* y la presencia del gen *cagA*.

6 Hipótesis.

El desarrollo de enfermedades gástricas graves como gastritis crónica activa, gastritis crónica activa folicular, metaplasia intestinal y cáncer gástrico, es una consecuencia de la infección crónica por cepas de *H. pylori* cuya patogenicidad se puede relacionar entre otros factores a las características genéticas de las cepas y la resistencia a los antibióticos.

7 Materiales y métodos.

7.1 Pacientes.

Se reclutaron 180 pacientes adultos en los años 1997, 2000 y 2001, en el servicio de endoscopía del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Se tomaron biopsias del antro gástrico de cada paciente por personal especializado, bajo la supervisión del médico responsable de la Unidad de endoscopía. El proyecto fue aprobado por los comités de ética y bioseguridad del INCAN. Los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado aceptando participar en este estudio. El diagnóstico del padecimiento lo realizó el Dr. Roberto Herrera-Goepfert, patólogo del mismo Instituto.

7.2 Cepas bacterianas.

Se utilizaron 49 cepas aisladas de las biopsias de los pacientes, las cuales se encontraban conservadas en glicerol al 10% en el ultracongelador a -70°C.

La cepa de colección ATCC 43504 de *H. pylori* se utilizó como control de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

7.3 Recuperación de las cepas.

Las cepas almacenadas se mantuvieron en glicerol a -70°C, se sembraron en placas de medio agar soya tripticaseína (DIFCO) suplementado con 5% de sangre de borrego, con vancomicina 0.1%

(Ely Lilly), se incubaron a 37°C en condiciones microaerófilicas (5% O₂, 10% CO₂), por 3 a 5 días se realizaron pases en placas del mismo medio. Los cultivos se identificaron mediante las pruebas de ureasa, catalasa y oxidasa y tinción de Gram, utilizándose sólo aquellas en forma de bacilo. Para corroborar la identificación de las cepas se realizó la amplificación del gen del RNAr 16S como se indica en el punto 7.8.1.

7.4 Extracción de DNA genómico.

Las bacterias reactivadas se crecieron en 100 ml de medio Brucella (DIFCO) con ciclodextrina al 0.2% (SIGMA), suero fetal bovino al 10% (GIBCO), se incubaron con agitación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 10%, durante 72 hr. El DNA genómico se extrajo de los aislamientos clínicos utilizando el estuche comercial de aislamiento de DNA de células y tejidos (Catalogo 27-5237-01 Amersham Pharmacia). El DNA obtenido se cuantificó y se evaluó su pureza por espectrofotometría, las absorbancias se leyeron a 260 nm, 280 nm y 320 nm (fondo), para calcular la concentración de DNA la lectura de fondo 320 nm se restó de la lectura a 260 nm y el resultado se multiplicó por el coeficiente de extinción del DNA 50 µg/ml y el factor de dilución. Se analizó la integridad del DNA corriendo 100 ng del DNA extraído en geles de agarosa al 1%, TAE 1X (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA), teñidos previamente con bromuro de etidio (0.5µg/ml concentración final), a 90 V. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, para confirmar la integridad del DNA, una vez confirmado esto, el DNA se guardó a -20°C hasta el momento de utilizarlo.

7.5 Cuentas viables.

Para realizar los ensayos de susceptibilidad se estandarizó la técnica para obtener cuentas viables de *H. pylori* (utilizando la cepa de colección ATCC 43504). Se realizaron pruebas de viabilidad utilizando el medio líquido Muller Hinton (DIFCO) como diluyente de la bacteria, la dilución se ajustó a una turbidez de McFarland 3.0 y se sembró en cajas con agar Muller-Hinton (DIFCO) a una dilución de 10^{-6} . Las cajas se incubaron a 37°C en condiciones microaerólicas por 3 a 5 días. Los cultivos se identificaron cómo se indica en el punto 7.3. Estas pruebas se realizaron para cada uno de los inóculos, simultáneamente se realizó la prueba de susceptibilidad de las mismas.

7.6 Estandarización pruebas de susceptibilidad.

Se cultivó la cepa de colección ATCC 43504 de *H. pylori* en cajas con agar soya tripticaseína-sangre con vancomicina. Una vez recuperada, se utilizó para estandarizar la prueba de susceptibilidad utilizando las tiras de E test (AB Biodisk). Se prepararon cajas con agar Mueller-Hinton con sangre de borrego al 10%, suero fetal bovino al 10% (GIBCO BRL/Invitrogen), se colocaron 25 ml de este medio por caja petri estéril de 90 mm. Previamente se incubaron a 37°C las cajas con agar Mueller-Hinton en la estufa con CO₂ al 10% durante 24 horas antes de usarlas para los ensayos de susceptibilidad.

La biomasa bacteriana se resuspendió en medio líquido de Mueller-Hinton hasta una turbidez correspondiente a 3 en la escala de McFarland ($\geq 10^8$ UFC/ml), inmediatamente se sembraron con hisopo estéril en tres direcciones sobre las cajas y se dejaron secar.

Posteriormente se colocó una tira de E-test con el antibiótico a ensayar (142). Una vez que se obtuvieron los valores de susceptibilidad establecidos para la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 amoxicilina (0,015-0,12 µg/ml), claritromicina (0,015-0,12 µg/ml) y metronidazol (64-256 µg/ml) (195), se procedió a realizar los ensayos de susceptibilidad.

7.7 Pruebas de susceptibilidad.

Las cajas con medio se prepararon de la misma forma que en el punto 7.6. Para realizar los ensayos de susceptibilidad de cada una de las cepas, se sembró una caja por cada uno de los antibióticos, además se utilizó una caja como control positivo sin antibióticos y una caja para cuentas viables a una dilución 10^{-6} para facilitar su conteo. Después de la incubación de 72 horas a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 10%, se

observaron las placas y se valoró la zona de inhibición, de forma elíptica, alrededor de cada tira. La CMI (concentración mínima inhibitoria) se leyó directamente, observando en la tira graduada de E-test el punto más bajo de la elipse que presentó crecimiento. Las cepas se consideraron resistentes cuando la CMI para metronidazol fue ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, para claritromicina ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ y para amoxicilina ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (93,101,178,246).

7.8 Detección de mutaciones del gen del RNAr 23S.

Para detectar mutaciones en la secuencia del gen del RNAr 23S (gene ID 898882, 2975 pb) asociadas con la resistencia a claritromicina, se amplificó por PCR un fragmento de la región de la actividad peptidil-transferasa, en el dominio V del gen del RNAr 23S de 1.142 kb (que corresponde al 38% del gen), a las cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina junto con la cepa de colección ATCC 43504 de *H. pylori* que se incluyó como control por ser susceptible a claritromicina. Se usaron los oligonucleótidos Hp5 (81) (81) y Hp2 (82) descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Desoxi-oligonucleótidos para la amplificación de RNAr 16S, *cagA*, alelos s y m de *vacA* y RNAr 23S.

Desoxi-oligonucleótido (orientación) ^a	Gen	Posición en el gen	Secuencia (5' - 3')	Referencia
Hp16(F)	RNAr 16S	219-240	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC	(71)
HpRFG(R)	RNAr 16S	719-740	CAATCAGCGTCAGTAATGTTC	(71)
HpcagF(F)	<i>cagA</i>	1651-1677	GCTAAGCATGCTAATCTCGCTATCAC	(19)
HpcagR(R)	<i>cagA</i>	2376-2403	GCCTGATTGAGTCGACCAACTTTATCCG	(19)
VA1F ^b (F)	<i>vacA</i> (s1)	797-817	ATGGAAATACAACAAACACAC	(19)
VA1R ^b (R)	<i>vacA</i> (s1)	1037-1055	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	(19)
SS2F ^b (F)	<i>vacA</i> (s2)	371-391	ATGGAAATACAACAAACACAC	(19)
VA1R ^a (R)	<i>vacA</i> (s2)	551-569	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	(19)
VA3F(F)	<i>vacA</i> (m1)	2741-2759	GGTCAAATGCGGTCATGG	(19)
VA3R(R)	<i>vacA</i> (m1)	3011-3030	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	(19)
VA4F(F)	<i>vacA</i> (m2)	876-994	GGAGCCCCAGGAAACATTG	(19)
VA4R(R)	<i>vacA</i> (m2)	1309-1327	CATAACTAGCGCCTTGAC	(19)
Hp5(F)	RNAr 23S	1672-1693	GTCGTGCCAAGAAAAGCGTCT	(81)
Hp2(R)	RNAr 23S	2811-2790	TGTGTGCTACCCAGCGATGCTC	(82)

^aLa orientación de cada desoxi-oligonucleótido es: F, sentido; R, antisentido.

^bLos productos amplificados se diferenciaron por el peso molecular.

Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR para la amplificación: 1 ciclo de: desnaturalización a 94°C, 2 min; 30 ciclos de: desnaturalización 94°C, 45 seg, alineamiento 58°C, 30 seg y extensión 72°C, 1 min; 1 ciclo de: extensión final a 72°C, 7 min (81). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl con: buffer XL 1X, 1.0 mM de Mg(OAc)₂, 200 µM de mezcla de dNTP, 50 µM de cada desoxioligonucleótido, 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Branchburg, NJ), DNA 50 ng, agua miliQ estéril para completar el volumen de 50 µl. Se utilizó como control negativo una reacción sin DNA. La amplificación se llevó a cabo en un equipo Gen Amp 2400 PCR system Perkin Elmer. Antes de la detección de las mutaciones los productos de PCR se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE1X, teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se purificaron utilizando una columna QIAQuick (Qiagen Inc.), se cuantificaron y se evaluó su pureza por espectrofotometría (Absorbancia 260/280/320 nm). Posteriormente se realizó la secuencia de los productos de PCR en ambas direcciones utilizando los desoxioligonucleótidos Hp5 y Hp2 empleando un estuche comercial basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). El análisis de la secuencia se realizó con un analizador genético ABI377, usando el software de colección de datos 377-18 (Applied Biosystems). Se analizó la presencia de mutaciones mediante el alineamiento de la secuencia del gen del RNAr 23S de las cepas de colección ATCC 43504 y la 26695 de *H. pylori* utilizando el programa de análisis de secuencias Clustal W 1.83 (European Bioinformatics Institute) (6). Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias de las cepas resistentes a claritromicina y la cepa de colección ATCC 43504 empleando el mismo programa.

7.9 Caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*.

Se llevo a cabo la caracterización de los genes RNAr 16S, *vacA* y *cagA* por PCR, así como la genotipificación se realizó mediante la técnica de RAPD.

7.9.1 Gen del RNAr 16S.

En todos los asilamientos se realizó la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la porción inicial del gen del RNAr 16S (especie específico, gene ID 899682), utilizando los desoxioligonucleótidos Hp 16 y HpRFG (71) descritos en la Tabla 5,

el tamaño del fragmento amplificado fue de 518 pb, que corresponde al 34.5% de la secuencia del gen. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR para la amplificación: 1 ciclo de: desnaturalización a 94 °C, 5 min; 30 ciclos de: desnaturalización 94 °C, 30 seg, alineamiento 55 °C, 30 seg y extensión 72, °C 30 seg; 1 ciclo de: extensión final a 72 °C, 7 min. La reacción se hizo en un volumen final de 50 µl con: buffer para PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cada oligo, DNA 100 ng, 5 unidades de enzima Taq DNA polimerasa recombinante (GIBCO), agua miliQ estéril para completar el volumen de 50 µl. Se utilizó como control negativo una reacción sin DNA. La amplificación se realizó en un equipo Gen Amp 2400 PCR System Perkin Elmer y las muestras se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio.

7.9.2 Caracterización de los alelos s/m del gen *vacA*.

Del gen *vacA* se amplificaron por PCR: el alelo: s1 desoxioligonucleótidos VA1F y VA1R y el s2 con los desoxioligonucleótidos SS2F y VA1R el tamaño de los fragmentos amplificados fue de 259 pb y 199 pb respectivamente; con los desoxioligonucleótidos VA3F y VA3R el alelo m1 el tamaño del fragmento amplificado fue de 290 pb, con los desoxioligonucleótidos VA4F y VA4R se amplificó el alelo m2 con 352 pb (19) los desoxioligonucleótidos se describen en la Tabla 5. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR para la amplificación: 1 ciclo de: desnaturalización a 94 °C, 2 min; 35 ciclos de: desnaturalización 94 °C, 1 min, alineamiento 52 °C, 1 min y extensión 72 °C, 1 min; 1 ciclo de: extensión final a 72 °C, 10 min (19). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl con buffer para PCR 1X, 1.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 mM de cada desoxioligonucleótido, DNA 100 ng, 2.5 unidades de enzima Taq DNA polimerasa recombinante (GIBCO), agua miliQ estéril para completar el volumen de 50 µl. Se utilizó como control negativo una reacción con agua sin DNA y se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio.

7.9.3 Detección de *cagA*.

Para detectar la presencia del gen *cagA* se utilizaron los desoxioligonucleótidos HpcagF y HpcagR descritos en la Tabla 5. El tamaño del fragmento amplificado fue de 753 pb que corresponde al 21% del gen (19). Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR para la amplificación: 1 ciclo de: desnaturalización a 94 °C, 5 min; 39 ciclos de:

desnaturalización 94°C, 30 seg, alineamiento 55°C, 30 seg y extensión 72°C, 30 seg; 1 ciclo de: extensión final a 72°C, 7 min. La reacción se hizo en un volumen final de 50 µl con buffer para PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cada desoxiligonucleótido, DNA 100 ng, 5 unidades de enzima Taq DNA polimerasa recombinante (GIBCO), agua miliQ estéril para completar el volumen de 50 µl. Se utilizó como control negativo una reacción con agua sin DNA. Las muestras se observaron en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, utilizando buffer TAE 1X.

7.9.4 Cultivo de células HeLa.

Las células HeLa se mantuvieron en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 200 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml estreptomycin, en botellas para cultivo, se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Los cultivos se hicieron en frascos de 25 cm² y cuando las células formaron monocapas a confluencia fueron lavadas con PBS 1X y EDTA 0.033%, enseguida se despegaron de la botella utilizando una solución de tripsina.

7.9.5 Ensayos de citotoxicidad.

Se colocaron 150 µl de las células HeLa mantenidas en cultivo, en un tubo eppendorf estéril, se agregaron 150 µl de azul de tripano y se mezclaron. Se tomaron 10 µl de esta mezcla y se colocaron en la cámara de Neubauer, para contar el número de células para el ensayo.

Para realizar los ensayos de citotoxicidad de *H. pylori*, se crecieron las células HeLa (7×10^3 células/pozo) a confluencia en placas de 96 pozos con medio DMEM suplementado, se dejaron incubando a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, 95% de aire, durante 24 horas.

Se colocaron 100 µl de medio DMEM suplementado y NH₄Cl 0.01M en cada uno de los 96 pozos de una placa estéril, posteriormente en la hilera B de los pozos 2 al 11, se añadieron 140 µl de la misma solución.

Los sobrenadantes de las bacterias se concentraron 12 veces y se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad. En la hilera B de los pozos 2 al 11 se agregaron 10 µl de los sobrenadantes, se mezcló bien con cuidado de no formar burbujas. Con la micropipeta multicanal se tomaron 125 µl de la hilera B de los carriles 2 al 11 y se fueron diluyendo pasando 125 µl cada vez a las siguientes hileras de la C a la H, hasta obtener una dilución

1:640.

A las células HeLa de las placas de 96 pozos, se les tiro el medio de cultivo. Después se tomaron con la micropipeta multicanal 100 μ l de la mezcla de la placa anterior y se pasaron suavemente sobre las paredes a los pozos de la caja con células HeLa, teniendo cuidado de pasarlas en el mismo orden que estaban en la caja anterior.

Las células HeLa con el medio DMEM suplementado más NH_4Cl sirvieron como control negativo. Después de incubación por 24 horas, se observaron las células, en microscopio invertido (Zeiss Axiovert 25). Los pozos donde se observó la vacuolización de las células se registraron como que presentaban un efecto citotóxico.

7.9.6 RAPD.

Se utilizó la técnica de RAPD para tipificar los aislamientos clínicos de *H. pylori*. La amplificación por PCR azarosa se realizó en reacciones separadas para los siguientes desoxioligonucleótidos arbitrarios 1247 (5'- AGAGCCCGT- 3'), 1281 (5'-AACGCGCAAC- 3') y 1254 (5'- CCGCAGCCAA- 3') (9,30). Las condiciones de amplificación fueron: 2 ciclos de: desnaturalización a 94°C, 5 min; amplificación a 36°C, 5 min y extensión a 72°C, 5 min; 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C, 1 min, amplificación a 36°C, durante 1 min, extensión a 72°C, 2 min; 1 ciclo final de: extensión a 72°C, 10 min. Se utilizaron buffer 1X, 2 mM de MgCl_2 , 0.1 mM de cada dNTP, 0.1 mM del desoxioligonucleótido 1247, 0.1 mM del desoxioligonucleótido 1281, 0.1 mM del desoxioligonucleótido 1254, DNA 20 ng, 1.5 unidades de enzima Taq DNA polimerasa recombinante (GIBCO), agua miliQ estéril para completar el volumen de 50 μ l. Se utilizó como control negativo una reacción sin DNA. La amplificación se realizó en un equipo Gen Amp 2400 PCR system Perkin Elmer. Las muestras se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, utilizando buffer TAE 1X para la corrida.

7.9.6.1 Método UPGMA.

Los fenotipos de los RAPD se definieron como 1 presencia y 0 ausencia de bandas de DNA homólogas y se utilizaron para el análisis de grupos. La matriz de similitud se construyó basándose en el coeficiente Dice utilizando el paquete de software para PC NTSYS versión 2.02j (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System). Sobre la matriz obtenida se aplicó un análisis de agrupamiento o análisis de cluster utilizando el método de agrupamiento UPGMA cuya finalidad es sintetizar la información

de todas las muestras; mediante la opción SAHN CLUSTERING del paquete NTSYSpc, con la opción TREE DISPLAY fueron generándose los dendogramas.

7.10 Análisis Estadístico.

Para realizar comparaciones, los pacientes se subagruparon de la siguiente manera: pacientes con gastritis crónica activa con o sin folículos linfoides, pacientes con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata 7.0 para windows. Las prevalencias del gen *cagA*, los alelos de *vacA* y la resistencia a metronidazol, entre los grupos con diagnósticos específicos, se compararon con la prueba de distribución de χ^2 . La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$.

8 Resultados.

8.1 Características de los pacientes.

El estudio inició con 180 pacientes que asistieron a los servicios de gastroenterología del Instituto Nacional de Cancerología en la ciudad de México durante 1997, 2000 y 2001 (Fig. 20). De estos, sólo el 65.5% de los pacientes (118/180) fueron positivos a la infección con *H. pylori* por histología y únicamente en el 41.5% (49/118) se pudo aislar la bacteria. De los 49 pacientes, 17 se colectaron en 1997, 14 en 2000 y 18 en 2001. Los pacientes (17 hombres y 32 mujeres) con edades que fluctuaron entre los 26 y 87 años, tuvieron un promedio de edad de 52.6 ± 15.9 años.

Los diagnósticos histopatológicos de estos pacientes fueron: siete con cáncer gástrico (CG), uno de estos con linfoma gástrico primario, cinco con adenocarcinoma tipo difuso y otro con adenocarcinoma tipo intestinal; siete con metaplasia intestinal (MI); 23 pacientes tuvieron gastritis crónica activa folicular (GCAF) de éstos nueve pacientes tuvieron además MI; siete con gastritis crónica activa (GCA); tres de los pacientes no pudieron agruparse debido a que en un paciente no se obtuvo suficiente muestra para poder hacer el diagnóstico, otro paciente desarrollo cáncer de mama y el último no tenía registro. Se estudiaron las 49 cepas obtenidas de los pacientes, sin embargo, para el análisis se eliminaron las 3 provenientes de los pacientes que no pudieron agruparse. La distribución por género mostró que el 67.4% de los pacientes fueron mujeres y el 32.6% hombres. La mayoría de los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico fueron mujeres (6/7).

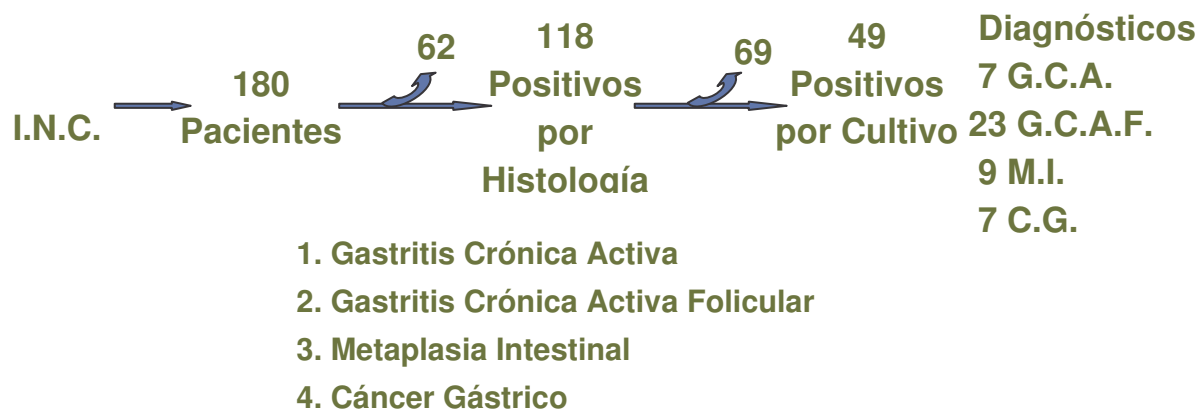


Figura 20. Población en estudio.

Las características de los 46 pacientes se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Características de los pacientes clasificados de acuerdo al padecimiento

		GCA	GCAF	MI	CG
		n=7	n=23	n=9	n=7
Edad (años)	\bar{X}	50.7	50	52.4	60.5
	Min-max	27-74	27-78	26-76	37-87
Género	Hombre	1	7	3	1
	Mujer	6	16	6	6

GCA= Gastritis Crónica Activa
 GCAF= Gastritis Crónica Activa Folicular
 MI= Metaplasia Intestinal
 CG= Cáncer Gástrico

8.2 Estandarización pruebas de susceptibilidad.

En todos los ensayos se utilizó la cepa de colección ATCC 43504 de *H. pylori*. Bajo las condiciones estandarizadas en este estudio, los ensayos de viabilidad produjeron $\geq 10^8$ UFC/ml de células viables a la densidad de McFarland No. 3. Se realizaron las pruebas de susceptibilidad, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante mediante el método de difusión con tiras de E-test a los antibióticos metronidazol, claritromicina y amoxicilina. Los valores de los CMI fueron: amoxicilina 0.015 $\mu\text{g/ml}$, claritromicina 0.015 $\mu\text{g/ml}$ y metronidazol 64 $\mu\text{g/ml}$ los cuáles se encuentran dentro del rango establecido por la

8.3 Pruebas de susceptibilidad.

Una vez que se estandarizaron las pruebas de susceptibilidad, se procedió a realizar los ensayos de susceptibilidad con las cepas. La Tabla 7 muestra el rango de las CMI obtenidas, así como los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ y el porcentaje de cepas resistentes encontradas en los 49 aislamientos. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ se definen como la concentración de antibiótico a la cual el 50% y el 90% respectivamente, de los aislamientos son inhibidos.

Tabla 7. Susceptibilidad antimicrobiana de los 49 aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Antibiótico	CMI μ g/mL			% Resistencia
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango (μ g/mL)	
Metronidazol	>256	>256	<0.015 - >256	57
Claritromicina	<0.015	0.06	<0.015 - >256	4
Amoxicilina	<0.015	0.015	<0.015 - >256	0

El 100% de las cepas fue sensible a amoxicilina siendo el antibiótico más activo con un 63% de cepas con CMI menor de 0.015 μ g/ml. El 57% (28/49) de las cepas de *H. pylori* fueron resistentes a metronidazol, de estas cepas el 92.8% (26/28) tuvieron CMI >256 μ g/ml. La resistencia a metronidazol fue mayor en las mujeres 61% (19/31) que en los hombres 53% (8/15). La resistencia a metronidazol por año fluctuó del 35% en 1997, 54% en 2000 a 74% en 2001, como se muestra en la Figura 21. La claritromicina fue muy activa 57% de las cepas presentaron CMI menor de 0.015 μ g/ml. Sólo el 4% de las 49 cepas fueron resistentes a claritromicina (CMI >256 μ g/ml) y a metronidazol (CMI >256 μ g/ml).

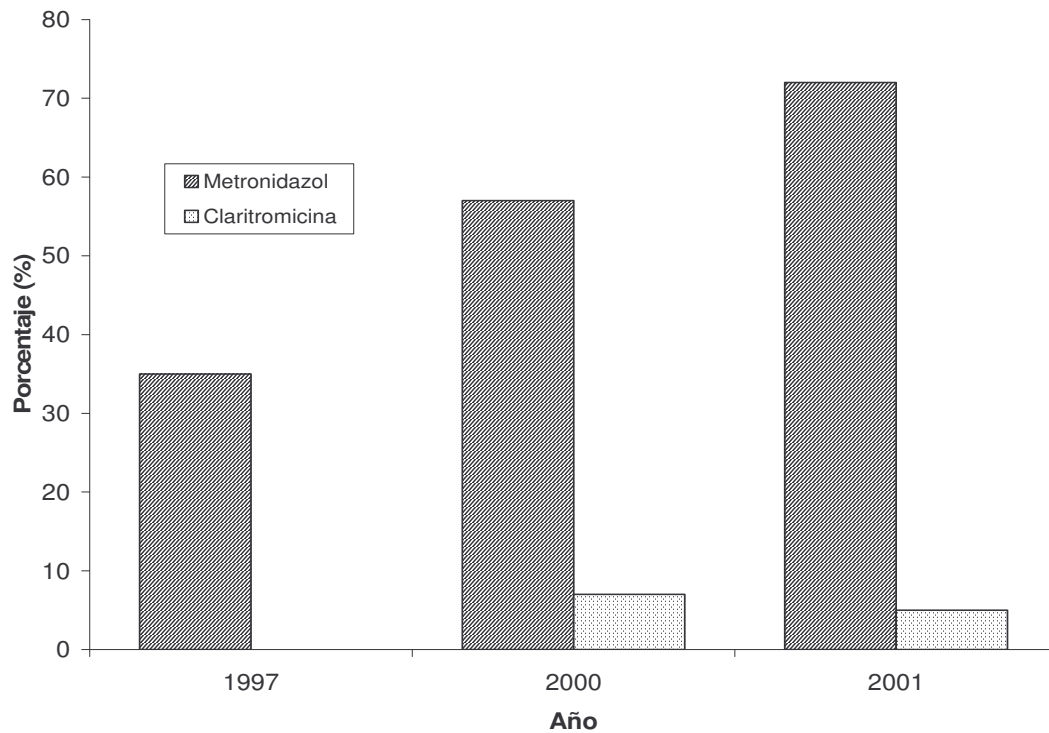


Figura 21. Incremento en la prevalencia de la resistencia a metronidazol y claritromicina de *H. pylori* en el hospital de Cancerología de Mexico por año. Datos presentados como porcentaje de cepas que fueron resistentes. 1997, n= 17 cepas, 2000 n= 14 cepas, 2001 n= 18 cepas. La resistencia a amoxicilina fue del 0% en todas las cepas durante cada año del estudio.

8.3.1 Detección de mutaciones en el gen RNAr 23S.

Se comparó la secuencia nucleotídica de la región de la actividad peptidil-transferasa, en el dominio V del gen del RNAr 23S, obtenida de la cepa control de colección ATCC de *H. pylori* 43504 empleada en las pruebas de susceptibilidad que es sensible a claritromicina, con la secuencia reportada de la cepa 26695 (gene ID 898882) de la cual se tiene secuenciado su genoma y no se identificaron mutaciones en esa región del gen RNAr 23S (datos no mostrados). Posteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia del gen 23S RNAr de la cepa control ATCC 43504 con el de las cepas resistentes a claritromicina (Fig. 22). Identificamos que la cepa 2144 presentó una mutación puntual de A2142G y la cepa 2026 dos mutaciones puntuales A2143G y T2182C.

Oligonucleótido HP5

43504	GTCGTGCCAAGAAAAGTC	TCTAAGCATATCCATAGTCGTC	CGTACCGCAAACCGACACAGGTAGATGAGATGAGTAT	77				
2026	GTCGTGCCAAGAAAAGTC	TCTAAGCATATCCATAGTCGTC	CGTACCGCAAACCGACACAGGTAGATGAGATGAGTAT	77				
2144	GTCGTGCCAAGAAAAGTC	TCTAAGCATATCCATAGTCGTC	CGTACCGCAAACCGACACAGGTAGATGAGATGAGTAT	77				

43504	TCTAAGGCGCGT	GAAAGA	ACTCTGGTTAAGGA	ACTCTGCAA	ACTAGCACCGTAAGTT	CGCGATAAAGGTGTGCCACAG	154	
2026	TCTAAGGCGCGT	GAAAGA	ACTCTGGTTAAGGA	ACTCTGCAA	ACTAGCACCGTAAGTT	CGCGATAAAGGTGTGCCACAG	154	
2144	TCTAAGGCGCGT	GAAAGA	ACTCTGGTTAAGGA	ACTCTGCAA	ACTAGCACCGTAAGTT	CGCGATAAAGGTGTGCCACAG	154	

43504	CGATGTGGTCT	CAGCAA	AGAGTCCCTCCCG	ACTGTTTACCA	AAAAACACAGCACTTTG	CCA	ACTCGTAAGAGGAAGTA	231
2026	CGATGTGGTCT	CAGCAA	AGAGTCCCTCCCG	ACTGTTTACCA	AAAAACACAGCACTTTG	CCA	ACTCGTAAGAGGAAGTA	231
2144	CGATGTGGTCT	CAGCAA	AGAGTCCCTCCCG	ACTGTTTACCA	AAAAACACAGCACTTTG	CCA	ACTCGTAAGAGGAAGTA	231

43504	TAAGGTGTGACGCCT	GCCCGGTGCTCGA	AGGTTAAGAGGATGCGT	CAGTCGCAAGATGAAGCGTTGAATTGAAGGCC	308			
2026	TAAGGTGTGACGCCT	GCCCGGTGCTCGA	AGGTTAAGAGGATGCGT	CAGTCGCAAGATGAAGCGTTGAATTGAAGGCC	308			
2144	TAAGGTGTGACGCCT	GCCCGGTGCTCGA	AGGTTAAGAGGATGCGT	CAGTCGCAAGATGAAGCGTTGAATTGAAGGCC	308			

43504	GAGTAAACGGCGG	CCGTA	ACTATAACCGT	CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGT	CGGTTAAATACCGACCTGCATGAAT	385		
2026	GAGTAAACGGCGG	CCGTA	ACTATAACCGT	CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGT	CGGTTAAATACCGACCTGCATGAAT	385		
2144	GAGTAAACGGCGG	CCGTA	ACTATAACCGT	CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGT	CGGTTAAATACCGACCTGCATGAAT	385		

43504	GGCGTAACGAGAT	GGGAGCTGTCTCA	ACCAGAGATTCAGT	GAAATTTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCG	462			
2026	GGCGTAACGAGAT	GGGAGCTGTCTCA	ACCAGAGATTCAGT	GAAATTTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCG	462			
2144	GGCGTAACGAGAT	GGGAGCTGTCTCA	ACCAGAGATTCAGT	GAAATTTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCG	462			

43504	GCAAGACGGAA	AGACCCCGTGGAC	CTTTACTACA	ACTTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGG	539			
2026	GCAAGACGGAA	AGACCCCGTGGAC	CTTTACTACA	ACTTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGG	539			
2144	GCAAGACGGAA	AGACCCCGTGGAC	CTTTACTACA	ACTTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGG	539			

43504	AGGCTTTGAAGTA	AAGGGCTTTGGCT	CCTTATGGAGCCATCCTTGAGATA	ACCACCCTTGCATGTTTCTGTTAGCTAACT	616			
2026	AGGCTTTGAAGTA	AAGGGCTTTGGCT	CCTTATGGAGCCATCCTTGAGATA	ACCACCCTTGCATGTTTCTGTTAGCTAACT	616			
2144	AGGCTTTGAAGTA	AAGGGCTTTGGCT	CCTTATGGAGCCATCCTTGAGATA	ACCACCCTTGCATGTTTCTGTTAGCTAACT	616			

43504	GGCCTGTGTTAT	TCCACAGGCAGGACA	ATGCTTGGTGGGTAGTTT	GACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGA	693			
2026	GGCCTGTGTTAT	TCCACAGGCAGGACA	ATGCTTGGTGGGTAGTTT	GACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGA	693			
2144	GGCCTGTGTTAT	TCCACAGGCAGGACA	ATGCTTGGTGGGTAGTTT	GACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAAAGTAACGGA	693			

43504	GGCTTGCAAAGGT	TGGCTCATTGCGGT	TGGAATCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACA	AGCCAGCCTGACTGTAAGAC	770			
2026	GGCTTGCAAAGGT	TGGCTCATTGCGGT	TGGAATCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACA	AGCCAGCCTGACTGTAAGAC	770			
2144	GGCTTGCAAAGGT	TGGCTCATTGCGGT	TGGAATCGCAAGTTGAGTGTAATGGCACA	AGCCAGCCTGACTGTAAGAC	770			

43504	ATACAAGTCAAGC	AGAGACGAAAGTCGGT	CATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA	AGGGCCATCGCTCAAAGGATA	847			
2026	ATACAAGTCAAGC	AGAGACGAAAGTCGGT	CATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA	AGGGCCATCGCTCAAAGGATA	847			
2144	ATACAAGTCAAGC	AGAGACGAAAGTCGGT	CATAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGA	AGGGCCATCGCTCAAAGGATA	847			

43504	AAAGGTACCCCGGGG	AACAGGCTGATCTCCCCA	AGAGCTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCG	924				
2026	AAAGGTACCCCGGGG	AACAGGCTGATCTCCCCA	AGAGCTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCG	924				
2144	AAAGGTACCCCGGGG	AACAGGCTGATCTCCCCA	AGAGCTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCG	924				

43504	CTCATCGCATCCT	TGGGCTGGAGCAGGT	CCCAAGGGTATGGCTGTTCCGCA	TTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTT	1001			
2026	CTCATCGCATCCT	TGGGCTGGAGCAGGT	CCCAAGGGTATGGCTGTTCCGCA	TTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTT	1001			
2144	CTCATCGCATCCT	TGGGCTGGAGCAGGT	CCCAAGGGTATGGCTGTTCCGCA	TTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTT	1001			

43504	AGAACGTCGTGAGAC	AGTTCCGTC	CCTATCTGCCGTGGGCGTAGGAAAGTTGAGGAGAGCTGTC	CCCTAGTACGAGAG	1078			
2026	AGAACGTCGTGAGAC	AGTTCCGTC	CCTATCTGCCGTGGGCGTAGGAAAGTTGAGGAGAGCTGTC	CCCTAGTACGAGAG	1078			
2144	AGAACGTCGTGAGAC	AGTTCCGTC	CCTATCTGCCGTGGGCGTAGGAAAGTTGAGGAGAGCTGTC	CCCTAGTACGAGAG	1078			

Oligonucleótido HP1								
43504	GACCGGGATGGACGTG	CTACTGGTGCACCAGTTGTTCTG	CCAAGAGCATCGCTGGGTAGCTACACA	1144				
2026	GACCGGGATGGACGTG	CTACTGGTGCACCAGTTGTTCTG	CCAAGAGCATCGCTGGGTAGCTACACA	1144				
2144	GACCGGGATGGACGTG	CTACTGGTGCACCAGTTGTTCTG	CCAAGAGCATCGCTGGGTAGCTACACA	1144				

Figura 22. Alineamiento por Clustal W de un fragmento de la secuencia de la región de la actividad peptidil-transferasa, en el dominio V del gen rRNA 23S de la cepa de colección ATCC 43504 y de las cepas 2026 y 2144 aisladas de los pacientes. Las mutaciones aparecen con negrilla con fondo azul y con fondo morado los desoxiligonucleótidos empleados.

8.4 Caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Se realizó la caracterización molecular de las 49 cepas de *H. pylori*, sin embargo para el análisis únicamente se consideraron las 46 cepas provenientes de los pacientes con diagnóstico clínico.

8.4.1 Detección de *H. pylori* por amplificación por PCR del gen RNAr 16S.

Para corroborar la identidad de los aislamientos de *Helicobacter pylori* se realizó el ensayo de amplificación por PCR de un fragmento del gen del RNAr 16S, utilizando un par de desoxioligonucleótidos especie específicos, identificándose un fragmento de 522 pares de bases que correspondió con el tamaño esperado.

8.4.2 Identificación de los alelos de *vacA*.

El gen *vacA* se detectó en todos los aislamientos de *H. pylori*. El genotipo más frecuente fue el s1/m1 con un 69.53% (32/46), seguido del s2/m2 con un 15.2% (7/46) y el s1/m2 con un 15.2% (7/46). No se demostró efecto citotóxico en las cepas s2/m2, mientras que el 96.8% (31/32) de las cepas s1/m1 fueron citotóxicas.

8.4.3 Detección del gen *cagA*.

El 76% de las cepas resultaron con genotipo *cagA*⁺ (35/46), de estas el 82.8% (29/35) fueron citotóxicas. De las 11 cepas *cagA*⁻ analizadas 6 (54.5%) no presentaron el fenotipo de citotoxicidad.

8.4.4 Correlación entre *cagA* y *vacA* y la citotoxicidad.

La presencia del gen *cagA* correlacionó con la presencia del gen *vacA* ($p = 0.004$) (Tabla 8). El gen *cagA* se detectó en 28 de 32 (87.5%) cepas de *H. pylori* que presentaron el genotipo *vacA* s1m1, en 5 de 7 (71.4%) cepas con el genotipo s1m2 y en 2 de 7 (28.5%) cepas con el genotipo s2m2. De las 46 cepas de *H. pylori* analizadas, los sobrenadantes de 34 (74%) indujeron vacuolización en células HeLa. El 45.5% (5/11) de

las cepas que fueron negativas al gen *cagA*, presentaron el genotipo *vacA* s2m2 y no tuvieron actividad vacuolizante.

El 97% (31/32) de las cepas con el genotipo s1m1 y el 43% (3/7) con el genotipo s1m2 fueron Tox⁺. En contraste, ninguna de las 7 cepas con el genotipo s2m2 indujeron vacuolización en células HeLa.

Tabla 8. Relación entre los alelos del gen *vacA*, el gen *cagA* y la citotoxicidad en las 46 cepas de *H. pylori*.

Genotipo <i>vacA</i> n=46	<i>cagA</i>		Cito- toxicidad n=34
	<i>cagA</i> ⁺ n=35	<i>cagA</i> ⁻ n=11	
s1m1	28	4	31
s1m2	5	2	3
s2m2	2	5	0

De las 46 cepas, 29 (63%) que presentaron el fenotipo Tox⁺ resultaron con el genotipo *cagA*⁺, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la citotoxicidad y la presencia del gen *cagA* ($p = 0.014$).

8.4.4.1 Análisis de los genes *cagA*, *vacA* y su correlación con el padecimiento.

La presencia de los genes *cagA* ($p = 0.003$) y *vacA* ($p < 0.001$), correlacionaron con la severidad del padecimiento, ya que las 11 cepas *cagA*⁻ se encontraron presentes únicamente en los pacientes con gastritis crónica activa y gastritis crónica activa folicular; y el genotipo *vacA* s2m2 no se encontró en los pacientes con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. La infección con cepas tipo s1 se encontró en el 96% (22/23) de los pacientes con gastritis crónica activa folicular, en el 100% con cáncer gástrico y metaplasia intestinal, en comparación con el 14% (1/7) con gastritis crónica activa. Se observó una alta correlación entre el genotipo s1/m1 y el cáncer gástrico, y entre metaplasia intestinal y gastritis crónica activa folicular ($p < 0.001$). En pacientes con cáncer gástrico la prevalencia del genotipo s1/m1 fue del 100% (7/7), en metaplasia intestinal del 77% (7/9) y en gastritis crónica activa folicular del 78% (18/23). El genotipo s2/m2 presentó una prevalencia del 85.7% (6/7) en pacientes con gastritis crónica activa y del 4.3% (1/23) con gastritis crónica activa folicular (Tabla 9). La prevalencia del gen *cagA* en

los pacientes con cáncer gástrico y metaplasia intestinal fue del 100%. En los pacientes con gastritis crónica activa folicular la prevalencia fue del 73.9% (17/23) y en los pacientes con gastritis crónica activa de 28.5% (2/7) (Tabla 9). El genotipo combinado *vacA* s1m1 *cagA*⁺ se encontró predominantemente en los pacientes con cáncer gástrico (100%) en comparación con los pacientes con metaplasia intestinal (77.7%) y los pacientes con gastritis crónica activa folicular (60.8%) y no se presentó en ninguno de los pacientes con gastritis crónica activa. La prevalencia de las cepas *cagA*⁻ con el genotipo *vacA* s2m2 fue 71.4% (5/7) en pacientes con gastritis crónica activa y con el genotipo s1m2 fue 4.3% (1/23) con gastritis crónica activa folicular.

Tabla 9. Genotipos *vacA/cagA*, citotoxicidad, resistencia a metronidazol y enfermedades gástricas.

Enfermedades	<i>vacA</i>			Cito- toxicidad n=34	<i>cagA</i> ⁺ n=35	Resistente Metronidazol n=27
	s2/m2 n=7	s1/m2 n=7	s1/m1 n=32			
Gástricas n=46 ^a						
Cáncer						
Gástrico n=7	0	0	7	6	7	2
Metaplasia						
Intestinal n= 9	0	2	7	8	9	6
Gastritis						
Crónica Activa						
Folicular n=23	1	4	18	20	17	14
Gastritis						
Crónica Activa n=7	6	1	0	0	2	5

^aTres pacientes sin clasificar no se incluyeron.

8.4.4.2 *cagA* y *vacA* y su correlación con la susceptibilidad.

Considerando que el metronidazol fue el único antibiótico que mostró elevados valores de resistencia entre las cepas estudiadas, se investigó la potencial asociación

entre los alelos de *vacA*, *cagA* y la resistencia a metronidazol. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre los alelos de *vacA* s/m y la resistencia a este antibiótico, el 81% (22/27) de las cepas resistentes a metronidazol presentaron el alelo *vacA* s1. La distribución de la resistencia a metronidazol de las cepas estudiadas, para el alelo de la región media fue la misma para el alelo m1, mientras que la proporción del alelo m2 fue del 21% de susceptibles versus 79% de resistentes. La asociación entre *cagA* y la resistencia a metronidazol estuvo en el límite de significancia ($p=0.074$).

Se encontró una prevalencia del 82% (9/11) de cepas resistentes a metronidazol entre las cepas *cagA*⁻ (Tabla 10). Mientras que en las cepas *cagA*⁺, la frecuencia de susceptibles y resistentes fue esencialmente la misma, 17 y 18 respectivamente (Tabla 10). De las 5 cepas *cagA*⁻/*vacA* s2m2 provenientes de pacientes con gastritis crónica activa, 3 fueron resistentes a metronidazol y 2 susceptibles.

Tabla 10. Distribución de *H. pylori* por genotipo y patrón de susceptibilidad a metronidazol

Genotipo	MtzS n=19	MtzR n=27
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1m1	16	12
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1m2	1	4
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s2m2	0	2
<i>cagA</i> ⁻ / <i>vacA</i> s1m1	0	4
<i>cagA</i> ⁻ / <i>vacA</i> s1m2	0	2
<i>cagA</i> ⁻ / <i>vacA</i> s2m2	2	3

MtzS= Susceptible a Metronidazol.

MtzR= Resistente a Metronidazol.

8.4.5 Actividad citotóxica en células HeLa.

El efecto citotóxico observado en las monocapas de las células HeLa fue la vacuolización intracelular. De las 46 cepas de *H. pylori* analizadas, 34 cepas (74%) produjeron una citotoxina vacuolizante (Tox⁺). La mayor parte de la vacuolización se detectó de 6 a 24 h después de agregar el sobrenadante de las bacterias. El porcentaje más alto de cepas citotóxicas se encontró en los pacientes con GCAF (87%). En seis de siete pacientes (86%) con CG se encontraron cepas citotóxicas. Las diferencias entre la

producción de citotoxina y el padecimiento no fueron estadísticamente significativas.

El 97% (31/32) de las cepas con el genotipo *vacA* s1m1 y el 43% (3/7) con el genotipo s1/m2 indujeron vacuolización en células HeLa, mientras que las cepas s2m2 no. El 87% (34/39) de las cepas con el genotipo *vacA* s1 se encontraron más frecuentemente asociadas con vacuolización, que aquellas con el genotipo s2 (0/7).

El 83% (29/35) de las cepas *cagA*⁺ y el 45% de (5/11) cepas *cagA*⁻, produjeron vacuolización en células HeLa ($p=0.01$).

8.4.6 RAPD.

La técnica de RAPD-PCR nos proporciona perfiles cepa-específicos con base en la presencia de secuencias específicas que varían dentro del genoma bacteriano. Se examinaron las 49 cepas de *H. pylori* utilizando tres desoxioligonucleótidos, dos de estos (1254 y 1281) generaron patrones de los 49 aislamientos no relacionados. El desoxioligonucleótido 1247 generó patrones únicamente en el 81% (40 de 49) de los aislamientos. Se obtuvieron diferentes patrones de RAPD con los tres desoxioligonucleótidos utilizados, mostrando que cada cepa tiene un patrón único, con una gran heterogeneidad entre las cepas aisladas de los pacientes (Fig. 22 a).

8.4.6.1 Método UPGMA.

La relación genética entre las cepas se examinó por análisis de grupos UPGMA, como se muestra en la Figura 22b.

El coeficiente de correlación cofenética fue de 0.66, mostrando una baja correlación entre las cepas estudiadas después de realizar 1000 permutaciones al azar con el procedimiento Mxcomp del programa NTSYSpc.

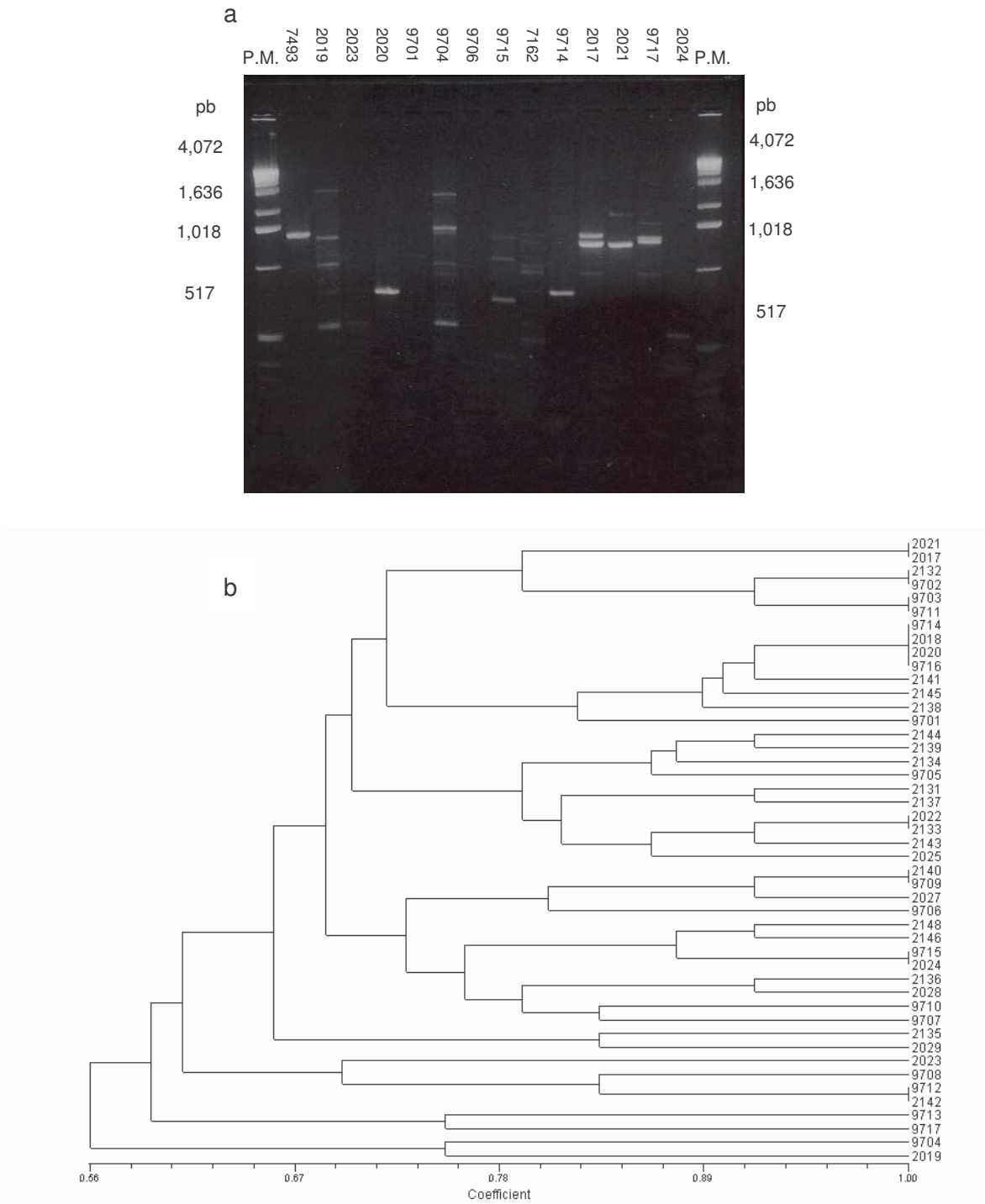


Fig. 22 a) Perfiles de RAPD obtenidos en la amplificación de las cepas analizadas utilizando el desoxioligonucleótido 1281. El número de las cepas aparece en la parte superior del gel. Marcador de peso molecular P.M. 1kb DNA Ladder (GIBCO, BRL). b) Dendrograma de los RAPD (desoxioligonucleótido 1281) de las cepas estudiadas basándose en el método de agrupamiento UPGMA en base al coeficiente de similitud Dice. El número de las cepas aparece adyacente al dendrograma.

9 Discusión.

La erradicación de *H. pylori* es el mejor tratamiento inicial de varias enfermedades gástricas graves. Sin embargo, la resistencia de *H. pylori* a los principales antibióticos utilizados en nuestro país es una preocupación de particular importancia debido a que esto puede ocasionar la falla en la erradicación de la infección. El análisis de la resistencia de *H. pylori* a los tres principales antimicrobianos más utilizados en nuestro país (metronidazol, claritromicina y amoxicilina) mostró que la resistencia a metronidazol incrementó de 35% en 1997 a 74% en 2001, mientras que la resistencia a claritromicina incrementó ligeramente en el mismo período, la resistencia a amoxicilina fue nula. Similar a lo reportado en otros países con características similares al nuestro. Llama la atención, que la prevalencia de la resistencia a metronidazol que nosotros encontramos en las cepas provenientes de pacientes del Hospital de Cancerología en la ciudad de México en 1997 (35%) fue inferior a la reportada por Torres y colaboradores (80%) para ese mismo año (246). Por el contrario, Garza-Gonzalez y colaboradores reportan en 2002 una prevalencia de 37.1%, la cual es menor a la prevalencia que identificamos en el 2001 (86).

La diferencia en los porcentajes de resistencia a metronidazol con respecto a otros estudios pudo deberse a diferentes causas, ya que en el estudio de Torres y colaboradores reclutaron 195 pacientes del Centro Médico Nacional del IMSS en la ciudad de México, el 68% con diagnóstico de dispepsia no ulcerosa y el 32% restante con úlcera péptica, de los cuales el 35% eran niños y el 65% adultos (246); el grupo de Garza-González reclutó 62 adultos del Hospital de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, de la población de estudio el 87% no presentaron úlcera y el 13% con úlcera péptica (86). Identificamos que los diagnósticos de los pacientes no son los mismos, no todos son adultos, proceden de diferentes hospitales, corresponden a distintos niveles socioeconómicos y provienen de diferentes regiones geográficas del país, lo que pudiera explicar las diferencias encontradas. Además ellos no incluyeron la cepa de *H. pylori* de referencia ATCC 43504, ni las pruebas de cuentas viables, cuando realizaron los ensayos de susceptibilidad, como control de calidad de los mismos, ya que los estándares de turbidez de McFarland no son lo suficientemente específicos y un estándar de McFarland no. 3 puede tener una variación de 5×10^6 UFC/ml a 1×10^9 UFC/ml que puede explicarse por diferencias en la proporción de bacterias viables en una suspensión y en el medio y técnicas de cultivo utilizadas (114). La resistencia a metronidazol varía mucho a nivel mundial. En países europeos los porcentajes son de aproximadamente el 30%, en África del 80% y en países sudamericanos oscilan del 30 al 80% (10). Mostrando que en los

países en vías de desarrollo la resistencia a metronidazol es muy alta. Esto probablemente se deba a que en estos últimos países, al igual que en el nuestro, los antibióticos se venden sin prescripción médica y, por lo tanto, no se hace un uso adecuado de los mismos, especialmente del metronidazol, que sigue siendo la principal opción en el tratamiento de las parasitosis por *Entamoeba* en México (36,73). En este estudio la resistencia a metronidazol fue mayor en las mujeres que en los hombres. No se conocen aún, las causas que originan la diferencia en la resistencia a metronidazol por género, se sugiere que puede deberse por su uso en el tratamiento de enfermedades ginecológicas (177,251). Esto puede explicar los elevados niveles de resistencia a metronidazol obtenidos en las cepas de *H. pylori* en nuestro país. Nuestro análisis indicó que la resistencia a metronidazol y claritromicina pudo surgir independientemente, ya que sólo el 4% de los aislamientos fueron resistentes a claritromicina. Aún cuando la prevalencia de la resistencia a claritromicina no fue muy alta, es importante considerar que existen reportes de un aumento en la resistencia a claritromicina en otros países además de la combinación de la resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos clínicos de *H. pylori* (211). En este estudio al igual que el de Garza-González y col. (86) no se identificaron cepas resistentes a amoxicilina. Torres y col. (246) encontraron que el 18% de las cepas analizadas eran resistentes a amoxicilina, no obstante fue inestable en todos los casos. Existen diferentes posibles causas por las cuales en nuestro estudio no encontramos cepas resistentes a amoxicilina una de ellas puede ser que la resistencia a amoxicilina es difícil de mantener en subcultivos y tiende a desaparecer después del almacenamiento de las cepas a bajas temperaturas (59,60), además de que al parecer es necesaria una disminución en la permeabilidad de la membrana y alteraciones en la PBP para que las bacterias sean resistentes a este antibiótico (151) y otra posible explicación es que la amoxicilina se administra en el Hospital de Cancerología de la ciudad de México, a partir del año 2000.

Sin embargo, es necesario considerar algunos aspectos técnicos al momento de realizar las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. La suspensión de la bacteria que se utilizará para realizar la prueba de E-test debe corresponder a 3 en la escala de turbidez de McFarland ($\geq 10^8$ UFC/ml), debiéndose realizar ensayos de cuentas viables en cada determinación, para asegurar así el crecimiento y la correcta determinación. Además es importante considerar el realizar los ensayos de susceptibilidad a partir del primo aislamiento.

En este estudio únicamente encontramos dos cepas resistentes a claritromicina con las mutaciones A2142G y A2143G/T2182C, nuestros resultados son similares a los

reportados en Bangladesh, Korea y Brasil (138,141,216).

Actualmente en el Hospital de Cancerología de la secretaría de salud y en el Instituto Mexicano del Seguro Social en Cuernavaca, el tratamiento para erradicar la infección por *H. pylori* que se les administra a los pacientes es claritromicina, amoxicilina y omeprazol durante dos semanas. Mientras que en el Centro Médico Naval el tratamiento consiste en metronidazol, claritromicina, amoxicilina y lanzoprazol durante una semana (Pylopac). El incremento en la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos destaca la importancia de continuar la búsqueda de nuevas medidas terapéuticas que aseguren un mejor cumplimiento del paciente con los tratamientos actuales.

Además de la susceptibilidad antimicrobiana, los factores de virulencia pueden afectar la erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica. El análisis de la prevalencia de los genotipos de *vacA* y *cagA* en las cepas mostró, al igual que en resultados previos de otros investigadores (262), que existe una fuerte asociación entre el genotipo *cagA*⁺/s1m1 y el cáncer gástrico, metaplasia intestinal y gastritis crónica activa folicular, pero muy baja con gastritis crónica activa. Esta última esta relacionada con el genotipo s2m2 y con la ausencia de *cagA*.

Nuestros resultados mostraron una asociación entre las cepas *cagA*⁻ y la resistencia a metronidazol (Tabla 9). Una vez que una cepa que posee la isla de patogenicidad *cagPAI* entra en contacto directo con las células epiteliales ocurren una serie de eventos (225), como son la producción y secreción de interleucina-8 (IL-8) (198), para lo cual se requiere que se expresen al menos 14 de los 27 genes presentes en la isla (198). Se ha sugerido que las cepas *cagPAI cagA*⁺ promueven un ambiente fisiológico con la secreción de IL- 8 y la inflamación de la mucosa gástrica, lo que permite un incremento en el flujo sanguíneo favoreciendo el aumento en la difusión del antibiótico (28,256), logrando alcanzar una concentración suficiente para eliminar la bacteria. En tanto que las cepas *cagA*⁻, que inducen menos inflamación, son expuestas a concentraciones subóptimas de metronidazol lo que favorece la selección de cepas resistentes (256), lo que coincide con los datos que nosotros obtuvimos donde el 82% de las cepas *cagA*⁻ fueron resistentes, mientras que la resistencia a metronidazol entre las cepas *cagA*⁺ fue del 51% (Tabla 10). Se requieren realizar estudios con un tamaño de muestra mayor para poder determinar si el genotipo *cagA* puede ser utilizado como un marcador de la resistencia a metronidazol, ya que el valor de la asociación estuvo en el límite de la significancia ($p = 0.074$). Contrario a lo observado con los resultados del metronidazol, las cepas *cagA*⁺ son más susceptibles a claritromicina, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Para este antibiótico se ha sugerido que las cepas *cagA*⁺ son más susceptibles porque la claritromicina es más efectiva para eliminar bacterias que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (28), como sería el caso de las cepas *cagA*⁺ que crecen más rápido que las cepas *cagA*⁻ (28,32,255). También se observó que las cepas de *H. pylori* *cagA*⁺ y *cagA*⁻ tienen *in vitro* susceptibilidades similares ya que la CMI con la que se inhibe el crecimiento del 90% de las cepas fue >256 µg/ml para los dos tipos de cepas.

Al igual que en otros estudios, no identificamos una correlación estadísticamente significativa entre los subtipos de *vacA* y la resistencia a metronidazol y/o claritromicina (50,97,159), posiblemente por el tamaño de muestra, únicamente encontramos que las cepas resistentes presentaron una alta proporción del alelo *vacA* m2. Se cree que estos aislamientos producen menos inflamación en la mucosa del epitelio gástrico, lo cual puede contribuir a una disminución en el acceso del antibiótico evitando la erradicación de *H. pylori* (69).

La presencia de *cagA* se asoció con la citotoxicidad en células HeLa, ya que el 83% de las cepas fueron *cagA*⁺ Tox⁺.

A nivel molecular no existen bases que establezcan una asociación entre la resistencia y la presencia del genotipo *cagA/vacA* ya que estos genes no se encuentran físicamente o funcionalmente unidos en la organización del genoma (69).

La presencia de *cagA* se encontró asociada con el genotipo *vacA* s1, los resultados concuerdan con reportes previos (254). Nuestro estudio muestra que el 63% (29/46) de las cepas de *H. pylori* fueron positivas a la vacuolización y *cagA*⁺, por lo que pueden considerarse como cepas tipo I *cagA*⁺/*vacA*⁺. La prevalencia de la infección con cepas tipo I en pacientes con gastritis crónica activa folicular fue del 65.2% (15/23), mientras que en pacientes con metaplasia intestinal el 88.8% (8/9) y en aquellos con cáncer gástrico fue muy similar con un 85.7% (6/7). Las cepas tipo II (*cagA*⁻, *vacA*⁻) se encontraron en el 57% (4/7) de los pacientes con gastritis crónica activa.

La prevalencia de *cagA*⁺ fue similar en los pacientes con metaplasia intestinal (100%), cáncer gástrico (100%) y gastritis crónica activa folicular (74%), siendo menor en los pacientes con gastritis crónica activa (28.5%), lo que concuerda con los resultados de estudios previos que demostraron que las cepas de *H. pylori* *cagA*⁺ estaban asociadas con altos grados de inflamación gástrica (149) y con el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (26,205).

Las cepas de *H. pylori* con el genotipo *vacA* s1 están asociadas con un aumento en el riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico, lo que concuerda con nuestros

resultados, donde el genotipo prevalente fue el *vacA* s1m1 encontrándose en el 100% de los pacientes con cáncer gástrico, en el 78% de los pacientes con metaplasia intestinal y en el 78% de los pacientes con gastritis crónica activa folicular; Koheler y cols. encontraron datos similares en Alemania (146), en comparación con las cepas *vacA* s2 que se encontraron en el 86% (6/7) de los pacientes con gastritis crónica activa y únicamente en el 4% (1/23) con gastritis crónica activa folicular.

En el presente estudio, las cepas de *H. pylori* que presentaron el genotipo *vacA* s1m1 presentaron una alta actividad citotóxica, mientras que las cepas *vacA* s1m2 tuvieron una producción moderada y las cepas *vacA* s2m2 no mostraron actividad citotóxica, resultados similares fueron reportados por el grupo de Atherton y cols. (19).

Utilizamos el método de RAPD debido a que se requiere menor cantidad de DNA por ensayo (20 ng), lo que facilita su realización, además que se economiza en medios y reactivos ya que *H. pylori* es una bacteria considerada como fastidiosa de lento crecimiento. Existen otros procedimientos para genotipificación como el RFLP-PCR del gen *ureC* (*glmM*) que se pudieron haber realizado, y que fueron las limitantes en nuestro caso, entre otras las condiciones económicas. Los análisis de RAPD demostraron un alto nivel de diversidad genética entre las cepas, no fue posible visualizar grupos definidos en el dendograma, lo que concuerda con el valor de correlación cofenética de 0.63. En estudios previos utilizando esta técnica han encontrado que *H. pylori* es genéticamente heterogéneo, con variación entre paciente y paciente (9).

Helicobacter pylori tiene una gran diversidad genómica (95) la que puede reflejar un proceso de acumulación persistente de mutaciones en cepas individuales como resultado de mutaciones espontáneas o transferencia horizontal e incorporación de DNA homólogo (*H. pylori*) o heterólogo. La acumulación persistente de mutaciones, principalmente en los genes de los factores de virulencia provee de un conjunto de variantes de *H. pylori* que pueden seleccionarse para una óptima colonización de nichos gástricos particulares (148). Además, se puede decir que no encontramos una selección clonal, ya que los pacientes que estudiamos se infectaron en lugares y tiempos no definidos y la persistencia de la infección en el paciente es de muchos años, por lo que no es raro que sean clones tan diferentes.

10 Conclusiones.

En este trabajo se logró la identificación de las cepas por métodos bioquímicos y moleculares. Se estandarizó la técnica de susceptibilidad a los antimicrobianos utilizando la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504, así como el ensayo de cuentas viables, esto permitió validar nuestros resultados. En nuestro estudio encontramos que la resistencia a metronidazol es una característica de las cepas de *H. pylori* en las tres cuartas partes de los pacientes con gastritis crónica activa y metaplasia intestinal. Los niveles de resistencia a metronidazol en las cepas de *H. pylori* fueron $>256 \mu\text{g/ml}$. El análisis de la susceptibilidad a metronidazol y claritromicina nos mostró que nuestros datos no coinciden con los obtenidos en los estudios de Torres y Garza-González. Mutaciones puntuales en el gen del RNAr 23S principalmente en las posiciones 2142 y 2143 con transiciones de $A \rightarrow G$ y 2182 de $T \rightarrow C$, son las responsables de la resistencia a claritromicina. El presente estudio provee evidencia de una baja prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a claritromicina y amoxicilina en la muestra analizada. En consecuencia, sugerimos el uso de claritromicina más amoxicilina en combinación con un inhibidor de la bomba de protones, para la erradicación de la infección. No se encontró relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de la resistencia a metronidazol y el género de los pacientes o la edad. Se observó un incremento en la resistencia a metronidazol en los años del estudio, lo que reduce la eficacia de la mayoría de los tratamientos que contienen metronidazol. Por lo tanto, en un futuro cercano antimicrobianos alternativos como la furazolidona y tetraciclina, deberían considerarse para la erradicación de la infección por *H. pylori* en nuestra comunidad. Aparentemente, la resistencia a metronidazol no depende del nivel de daño en el tejido, ni de la presencia o ausencia del gen *cagA* (Tabla 9).

Todos los aislamientos de *H. pylori* estudiados presentan el gen *vacA* y el 76% presentan el gen *cagA*. Los genotipos del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori* en este estudio son idénticos a los reportados previamente. La mayoría de los pacientes se encontraron infectados con las cepas de *H. pylori* con el genotipo *vacA* s1m1. Se encontraron todas las combinaciones posibles de los alelos del gen *vacA*, con excepción del s2m1. La presencia del gen *cagA* se asoció en forma significativa con el genotipo *vacA* s1/m1 y la gastritis crónica activa folicular, metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Por lo tanto, la alta prevalencia de la resistencia a metronidazol entre las cepas con el genotipo *cagA*⁺/*vacA* s1/m1, puede ser una de las razones de la alta prevalencia de enfermedades gastroduodenales severas como la gastritis crónica activa folicular y el

cáncer gástrico en México.

Creemos que es importante informar a los médicos en nuestro país acerca de los pacientes que tienen cepas *cagA*⁺/resistentes a metronidazol, particularmente aquellas que sufren gastritis crónica activa folicular (Tabla 9), ya que esta enfermedad puede progresar en formas más severas como el linfoma.

El análisis de los genes de virulencia reveló una asociación específica de las cepas de *H. pylori* y el padecimiento.

No encontramos una correlación significativa entre la patogenicidad y la susceptibilidad o resistencia a los antibióticos.

Se detectó vacuolización en el 74% de las cepas de *H. pylori* examinadas en este estudio utilizando monocapas de células HeLa.

Cada una de las cepas pudieron distinguirse entre si por la tipificación RAPD, lo que confirma el polimorfismo de *H. pylori*.

Aún cuando el número de pacientes incluidos en el estudio es pequeño, es el primer reporte en México que incluye la frecuencia de la resistencia antimicrobiana, el mecanismo molecular de la resistencia a claritromicina, patrón de RAPD y asociación entre la enfermedad y la citotoxicidad, los genotipos *vacA* y *cagA* de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes adultos con síntomas gastrointestinales.

Sugerimos que deben realizarse pruebas de susceptibilidad antimicrobiana antes de escoger la primer terapia de erradicación en pacientes infectados y que metronidazol no debe emplearse para tratar casos de pacientes infectados por *H. pylori* en nuestro país.

Es un trabajo que permite concluir que aún faltan muchos estudios sobre las características de *H. pylori*, el hospedero y ambiente. Ya que estudios enfocados sólo a la bacteria no permiten identificar el factor o factores involucrados en el desarrollo de un cuadro clínico.

11 Perspectivas.

En nuestro país se requiere llevar a cabo más estudios sobre los diversos tratamientos empleados para la erradicación de la infección por *H. pylori*, antes de proponer un tratamiento que sea efectivo. Realizar investigaciones de tipo básica-epidemiológica con un tamaño de muestra mayor en donde se incluyan pacientes infectados con *H. pylori*, con úlcera péptica, gastritis crónica activa, gastritis crónica activa folicular, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico en etapas tempranas para administrarles tratamientos que permitirán erradicar la infección, así como la exploración

de los procesos involucrados con la infección con *H. pylori*.

Desarrollar un método confiable de detección oportuna de anticuerpos séricos basado en la técnica de inmunoblot para detectar a las personas que han tenido contacto con esta bacteria, e identificar a las personas infectadas con cepas toxigénicas y que presentan infección activa.

Estudiar la distribución y la frecuencia de los polimorfismos de algunos genes HLA-DQ, como: DQB1*050101, DQB*0604 y DQA*040101, DQA*0601; los cuales están relacionados con la susceptibilidad a desarrollar metaplasia intestinal y cáncer gástrico asociados a la infección por *Helicobacter pylori*. En pacientes mexicanos con padecimientos gástricos.

12 Bibliografía.

1. 1993. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. Lancet 341:1359-1362.
2. 1994. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. JAMA 272:65-69.
3. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61:1-241.
4. 1997. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter pylori* Study Group. Gut 41:8-13.
5. 2004. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection--bacterium and host relationship. Srp Arh Celok Lek 132:340-344.
6. Clustal W. 10 marzo 2005. European Bioinformatics Institute . 2005. Ref Type: Internet Communication.
7. Abrams, D. N., I. Koslowsky, and G. Matte. 2000. Pharmaceutical interference with the [14C] carbon urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori* infection. J Pharm Pharm Sci 3:228-233.
8. Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg. 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 28:37-53.
9. Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, S. Kresovich, and D. E. Berg. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res 20:5137-5142.
10. Alarcon, T., D. Domingo, and M. Lopez-Brea. 1999. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 12:19-26.
11. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 397:176-180.
12. Andersson, S. and C. G. Kurland. 1987. Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin. Biochimie 69:901-904.
13. Antonioli, D. A. 1990. Gastric carcinoma and its precursors., p. 144. In H. Goldman, H. D. Appelman, N. Kaufman, and . (eds.), Gastrointestinal Pathology. United States and Canadian Academy of Pathology.

14. Appelmelk, B. J., M. C. Martino, E. Veenhof, M. A. Monteiro, J. J. Maaskant, R. Negrini, F. Lindh, M. Perry, G. Del Giudice, and C. M. Vandenbroucke-Grauls. 2000. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 68:5928-5932.
15. Appelmelk, B. J., R. Simoons-Smit, I. Negrini, A. P. Moran, G. O. Aspinall, J. G. Forte, T. De Vries, H. Quan, T. Verboom, J. J. Maaskant, P. Ghiara, E. J. Kuipers, E. Bloemena, T. M. Tadema, R. R. Townsend, K. Tyagarajan, Jr. J. M. Crothers, M. A. Monteiro, A. Savio, and J. De Graaff. 1999. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 64:2031-2040.
16. Asaka, M., H. Takeda, T. Sugiyama, and M. Kato. 1997. What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer? *Gastroenterology* 113:S56-S60.
17. Aspholm-Hurtig, M., G. Dailide, M. Lahmann, A. Kalia, D. Ilver, N. Roche, S. Vikstrom, R. Sjostrom, S. Linden, A. Backstrom, C. Lundberg, A. Arnqvist, J. Mahdavi, U. J. Nilsson, B. Velapatino, R. H. Gilman, M. Gerhard, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, T. Nakazawa, J. G. Fox, P. Correa, M. G. Dominguez-Bello, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, S. Normark, I. Carlstedt, S. Oscarson, S. Teneberg, D. E. Berg, and T. Boren. 2004. Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. *Science* 305:519-522.
18. Atherton, J. C. 1997. Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1:11-20.
19. Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270:17771-17777.
20. Atherton, J. C., T. L. Cover, E. Papini, and J. L. Telford. 2001. Vacuolating cytotoxin, p. 97-110. *In* H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM press, Washington, DC.
21. Axon, A. T. 1995. Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment Pharmacol Ther* 9:585-588.
22. Bannerman, T. L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other Catalase-Positive Cocci that grow aerobically, p. 384-404. *In* P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., and Tenover F.C. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. Barer, M. R. 2000. Bacterial growth and physiology, p. 36-44. *In* D. Greenwood, R. C. B. Slack, and J. F. Peutherer (eds.), *Medical Microbiology. A guide to microbial infections: Pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Churchill Livingstone.
24. Beji, A., F. Mégraud, P. Vincent, F. Gavini, D. Izard, and H. Leclerc. 1988. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 139:527-534.
25. Blaser, M. J. and D. Kirschner. 1999. Dynamics of *Helicobacter pylori* colonization in relation to the host response. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8359-8364.

26. Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55:2111-2115.
27. Blondeau, J. M., E. DeCarolis, K. L. Metzler, and G. T. Hansen. 2002. The macrolides. *Expert Opin Investig Drugs* 11:189-215.
28. Broutet, N., A. Marais, H. Lamouliatte, A. de Mascarel, R. Samoyeau, R. Salamon, and F. Megraud. 2001. *cagA* Status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 39:1319-1322.
29. Burman, W. J., D. L. Cohn, R. R. Reves, and M. L. Wilson. 1995. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 20:564-570.
30. Burucoa, C., V. Lhomme, and J. L. Fauchere. 1999. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 37:4071-4080.
31. Cave, D. R. 1997. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 113:S9-14.
32. Censini, S., Ch. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14648-14653.
33. Chisholm, S. A., R. J. Owen, E. L. Teare, and S. Saverymuttu. 2001. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J Clin Microbiol* 39:1217-1220.
34. Cohen, H. and L. Laine. 1997. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1:3-9.
35. Con tu Salud.com. Úlcera Péptica. 20 de agosto 2005. 4-1-2005. Ref Type: Internet Communication.
36. Conde-Bonfil, M. C. and C. Mora-Zerpa. 1992. *Entamoeba histolytica*: a standing threat. *Salud Publica Mex* 34:335-341.
37. Contreras, A. and D. Vazquez. 1977. Cooperative and antagonistic interactions of peptidyl-tRNA and antibiotics with bacterial ribosomes. *Eur J Biochem* 74:539-547.
38. Correa, P. 1982. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer* 50:2554-2565.
39. Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52:6735-6740.
40. Correa, P. and V. W. Chen. 1994. Gastric cancer. *Cancer Surv* 19-20:55-76.

41. Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, D. Zavala, E. Fontham, G. Zarama, S. Tannenbaum, T. Collazos, and B. Ruiz. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 50:4737-4740.
42. Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, D. Zavala, E. Fontham, G. Zarama, S. Tannenbaum, T. Collazos, and B. Ruiz. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 50:4731-4736.
43. Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, D. Burroni, A. Massone, E. Papini, and R. Rappuoli. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5791-5795.
44. Cover, T. L. and S. R. Blanke. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3:320-332.
45. Cover, T. L. and M. J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267:10570-10575.
46. Cover, T. L. and M. J. Blaser. 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 41:85-117.
47. Cover, T. L., P. I. Hanson, and J. E. Heuser. 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 138:759-769.
48. Cover, T. L., Krishna U.S., Israel D.A., and R. M. Peek, Jr. 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63:951-957.
49. Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269:10566-10573.
50. Damaso, D., T. Alarcon, N. Prieto, and M. Lopez-Brea. 1999. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Rev Esp Quimioter* 12:340-345.
51. de Boer, W. A. and G. N. Tytgat. 2000. Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 320:31-34.
52. De Groote, D., L. J. van Doorn, R. Ducatelle, A. Verschuuren, F. Haesebrouck, W. G. Quint, K. Jalava, and P. Vandamme. 1999. 'Candidatus *Helicobacter suis*', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1769-1777.
53. Debets-Ossenkopp, Y. J., A. J. Herscheid, R. G. Pot, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, and C. M. Vandenbroucke-Grauls. 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 43:511-515.
54. Deng, G. R. 1988. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting

point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 16:6231.

55. Dewhirst, F. E., J. G. Fox, and S. L. W. On. 2000. Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:2231-2237.

56. Di Martino, P., Y. Bertin, J. P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* 63:4336-4344.

57. Di Martino, P., V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 1996. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* 64:2266-2273.

58. Dixon, M. 2001. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration., p. 459-469. *In* H.L.T.Mobley, G.L.Mendz, and S.L.Hazell (eds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM press., Washington, DC.

59. Dore, M. P., D. Y. Graham, S. M. Shah, A. R. Sepulveda, and . 1999. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 4:154-161.

60. Dore, M. P., M. S. Osato, G. Realdi, I. Mura, D. Y. Graham, and A. R. Sepulveda. 1999. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 43:47-54.

61. Drumm B, G. I. Perez-Perez , M. J. Blaser, and P. M. Sherman. 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 322:359-363.

62. Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10:720-741.

63. Dupas, J. L. 2003. First line therapy for *Helicobacter pylori* eradication in France. *Gastroenterol Clin Biol* 27:467-472.

64. Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59:2470-2475.

65. Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and C. Josenhans. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 64:2445-2448.

66. Edwards, D. I. 1993. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 31:9-20.

67. Egebjerg, J., N. Larsen, and R. A. Garret. 1990. Structural map of 23S rRNA, p. 168-179. *In* W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schleissinger, and J. R. e. Warner (eds.), *The ribosome: structure, function and evolution*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

68. El Omar, E. M., I. D. Penman, J. E. Ardill, R. S. Chittajallu, C. Howie, and K. E.

McColl. 1995. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109:681-691.

69. Elviss, N. C., R. J. Owen, J. Xerry, A. M. Walker, and K. Davies. 2004. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother* 54:435-440.

70. Endo, H., H. Yoshida, N. Ohmi, and S. Higuchi. 2001. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of [¹⁴C]amoxicillin into rat gastric tissue. *J Antimicrob Chemother* 47:405-410.

71. Engstrand, L., A. M. Nguyen, D. Y. Graham, and F. A. El Zaatari. 1992. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. *J Clin Microbiol* 30:2295-2301.

72. Erah, P. O., A. F. Goddard, D. A. Barrett, P. N. Shaw, and R. C. Spiller. 1997. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother* 39:5-12.

73. Escandon, R. C., N. T. Garcia Manzo, d. I. P. Escobedo, J. M. Hernandez Ramos, A. J. Olvera, and S. J. Cabral. 1996. Amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: a present-day public health problem. *Rev Gastroenterol Mex* 61:378-386.

74. Evans, D. J. Jr., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, and P. R. Kvietyts. 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 63:2213-2220.

75. Falk, P. 1996. *Helicobacter pylori* - can the mechanisms of pathogenesis guide us towards novel strategies for treatment and prevention? *J Intern Med* 240:319-332.

76. Falkow, S. 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *J Clin Invest* 100:239-243.

77. Farthing, M. J. 1998. *Helicobacter pylori* infection: an overview. *Br Med Bull* 54:1-6.

78. Fernandes, P. B. and D. J. Hardy. 1988. Comparative in vitro potencies of nine new macrolides. *Drugs Exp Clin Res* 14:445-451.

79. Fiocca, R., O. Luinetti, L. Villani, A. M. Chiaravalli, C. Capella, and E. Solcia. 1994. Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 205:11-21.

80. Fischer, W., J. Püls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42:1337-1348.

81. Fontana, C., M. Favaro, S. Minelli, A. A. Criscuolo, A. Pietroiusti, A. Galante, and C. Favalli. 2002. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3765-3769.

82. Fontana, C., M. Favaro, A. Pietroiusti, E. S. Pistoia, A. Galante, and C. Favalli. 2003. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 41:3636-3640.
83. Forsyth, M. H., J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1998. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 66:3088-3094.
84. Fox, J. G. and Lee A. 1997. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab Anim* 47:222-255.
85. Garner, J. A. and T. L. Cover. 1996. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* 64:4197-4203.
86. Garza-Gonzalez, E., G. I. Perez-Perez, O. Alanis-Aguilar, R. Tijerina-Menchaca, H. J. Maldonado-Garza, and F. J. Bosques-Padilla. 2002. Antibiotic susceptibility patterns of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern Mexico. *J Chemother* 14:342-345.
87. Garza-Ramos, G., L. Xiong, P. Zhong, and A. Mankin. 2001. Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. *J Bacteriol* 183:6898-6907.
88. Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehle, M. Classen, and C. Prinz. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12778-12783.
89. Gerhard, M., R. Rad, C. Prinz, and M. Naumann. 2002. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 7:17-23.
90. Gerrits, M. M., D. Schuijffel, A. A. van Zwet, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters. 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2229-2233.
91. Gilger, M. A. 2000. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. *Curr Pharm Des* 6:1531-1536.
92. Glocker, E. and M. Kist. 2004. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 42:2241-2246.
93. Glupczynski, Y., M. Labbe, W. Hansen, F. Crokaert, and E. Yourassowsky. 1991. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 29:2072-2075.
94. Go, M. F. 1997. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* 113:S15-S20.
95. Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, and J. M. Musser. 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 178:3934-3938.
96. Goddard, A. F. 1998. Getting to the route of *Helicobacter pylori* treatment. *J*

97. Godoy, A. P., M. L. Ribeiro, Y. H. Benvengo, L. Vitiello, M. C. Miranda, S. Mendonca, and J. Pedrazzoli, Jr. 2003. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol 3:20.

98. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins L, Sly L, McConnel W, and Harper WS. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 4:397-405.

99. Goodwin, A., D. Kersulyte, G. Sisson, S. J. Veldhuyzen van Zanten, D. E. Berg, and P. S. Hoffman. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol Microbiol 28:383-393.

100. Goodwin, C. S., McCulloch RK, Armstrong JA, and Wee SH. 1985. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. J Med Microbiol 19:257-267.

101. Goodwin, C. S., B. J. Marshall, E. D. Blincow, D. H. Wilson, S. Blackbourn, and M. Philipps. 1988. Prevention of nitroimidazole resistance in *Campylobacter pylori* by coadministration of colloidal bismuth subcitrate: clinical and *in vitro* studies. J Clin Pathol 41:207-210.

102. Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon, and G. Kasper. 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. J Clin Microbiol 27:938-943.

103. Goodwin, C. and Armstrong JA. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur J Clin Microbiol 9:1-13.

104. Graham, D. Y., G. M. Lew, H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., P. D. Klein, L. C. Alpert, and R. M. Genta. 1992. Factors influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy. Gastroenterology 102:493-496.

105. Graham, D. Y., A. R. Opekun, M. S. Osato, H. M. El Zimaity, C. K. Lee, Y. Yamaoka, W. A. Qureshi, M. Cadoz, and T. P. Monath. 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. Gut 53:1235-1243.

106. Graham, D. Y. and L. Rabeneck. 1996. Patients, payers, and paradigm shifts: what to do about *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterol 91:188-190.

107. Griffin on the gut. *Helicobacter pylori*- discovery to genome. 2 de septiembre 2005. 2005. Ref Type: Internet Communication.

108. Gur, G., S. Boyacioglu, C. Gul, M. Turan, M. Gursoy, C. Baysal, and N. Ozdemir. 1999. Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 14:2688-2691.

109. Hadrys, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol Ecol 1:55-63.

110. Hakenbeck, R. 1995. Target-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* 50:1121-1127.
111. Hansen, L. H., P. Mauvais, and S. Douthwaite. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* 31:623-631.
112. Harris, A. G., S. L. Hazell, and A. G. Netting. 2000. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 45:591-598.
113. Harris, P. R., A. Godoy, S. Arenillas, F. Riera, D. Garcia, H. Einisman, A. Pena, A. Rollan, I. Duarte, E. Guiraldes, and G. Perez-Perez. 2003. CagA antibodies as a marker of virulence in Chilean patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37:596-602.
114. Hartzen, S. H., L. P. Andersen, A. Bremmelgaard, H. Colding, M. Arpi, J. Kristiansen, T. Justesen, F. Espersen, N. Frimodt-Moller, and O. Bonnevie. 1997. Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2634-2639.
115. Hazell, S. L., T. J. Borody, A. Gal, and A. Lee. 1987. *Campylobacter pyloridis* gastritis I: Detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. *Am J Gastroenterol* 82:292-296.
116. Hazell, S. L. and G. L. Mendz. 1997. How *Helicobacter pylori* works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2:1-12.
117. Hentschel, E., G. Brandstatter, B. Dragosics, A. M. Hirschl, H. Nemecek, K. Schutze, M. Taufer, and H. Wurzer. 1993. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 328:308-312.
118. Hildebrand, P., P. Bardhan, L. Rossi, S. Parvin, A. Rahman, M. S. Arefin, M. Hasan, M. M. Ahmad, K. Glatz-Krieger, L. Terracciano, P. Bauerfeind, C. Beglinger, N. Gyr, and A. K. Khan. 2001. Recrudescence and reinfection with *Helicobacter pylori* after eradication therapy in Bangladeshi adults. *Gastroenterology* 121:792-798.
119. Hoffman, P. S., A. Goodwin, J. Johnsen, K. Magee, and S. J. Veldhuyzen van Zanten. 1996. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J Bacteriol* 178:4822-4829.
120. Hong, W., K. Sano, S. Morimatsu, D. R. Scott, D. L. Weeks, G. Sachs, T. Goto, S. Mohan, F. Harada, N. Nakajima, and T. Nakano. 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 52:211-216.
121. Hoogerwerf, W. A. and P. J. Pasricha. 2001. Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease, p. 1005-1020. *In* J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. e. Gilman (eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill.
122. Hopkins, R. J., L. S. Girardi, and E. A. Turney. 1996. Relationship between

Helicobacter pylori eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. *Gastroenterology* 110:1244-1252.

123. Horn, J. 2000. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin Ther* 22:266-280.

124. Huang, J.-Q., S. Sridhar, Y. Chen, and R. H. Hunt. 1998. Meta-analysis of the Relationship Between *Helicobacter pylori* Seropositivity and Gastric Cancer. *Gastroenterology* 114:1169-1179.

125. Hughes, N. J., C. L. Clayton, P. A. Chalk, and D. J. Kelly. 1998. *Helicobacter pylori* *porCDAB* and *oorDABC* genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 180:1119-1128.

126. Hulten, K., A. Gibreel, O. Skold, and L. Engstrand. 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2550-2553.

127. Icarito. Úlceras. 20 de agosto 2005. 2005. Ref Type: Internet Communication.

128. ILADIBA.com. *Helicobacter pylori*, enfermedad ulcerosa y cáncer gástrico. 15 de agosto de 2005. 10-1-1995. Ref Type: Internet Communication.

129. Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ögren, I. M. Frick, D. Kerslyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Borén. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated hysto-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279:373-377.

130. Imrie, C., M. Rowland, B. Bourke, and B. Drumm. 2001. Is *Helicobacter pylori* infection in childhood a risk factor for gastric cancer? *Pediatrics* 107:373-380.

131. Innocenti, M., A. M. Svennerholm, and M. Quiding-Jarbrink. 2001. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infect Immun* 69:3800-3808.

132. Janssen, P. J., B. Auidt, and Ch. A. Ouzounis. 2001. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: distribution, function and dynamics. *Nucleic Acids Res* 29:4395-4404.

133. Jenks, P. J., R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1999. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 43:753-758.

134. Kansau, I., J. Raymond, E. Bingen, P. Courcoux, N. Kalach, M. Bergeret, N. Braimi, C. Dupont, and A. Labigne. 1996. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with RAPD technique. *Res Microbiol* 147:661-669.

135. Kato, I., S. Tominaga, Y. Ito, S. Kobayashi, Y. Yoshii, A. Matsuura, A. Kameya, and T. Kano. 1992. Atrophic gastritis and stomach cancer risk: cross-sectional analyses. *Jpn J Cancer Res* 83:1041-1046.

136. Kato, M., Y. Yamaoka, J. J. Kim, R. Reddy, M. Asaka, K. Kashima, F. A. El Zaatari, D. Y. Graham, and D. H. Kwon. 2000. Regional Differences in Metronidazole Resistance

and Increasing Clarithromycin Resistance among *Helicobacter pylori* Isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2214-2216.

137. Kearney, D. J. 2003. *Helicobacter pylori* Infection. Current Treatment Options in Infectious Diseases 5:197-206.

138. Khan, R., S. Nahar, J. Sultana, M. M. Ahmad, and M. Rahman. 2004. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3567-3569.

139. Kidd, M., A. J. Lastovica, J. C. Atherton, and J. A. Louw. 2001. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 49:11-17.

140. Kiehlbauch, J. A., R. V. Tauxe, C. N. Baker, and I. K. Wachsmuth. 1994. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 121:90-93.

141. Kim, K. S., J. O. Kang, C. S. Eun, D. S. Han, and T. Y. Choi. 2002. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 17:599-603.

142. King, A. 2001. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1:77-80.

143. Kivi, M., Y. Tindberg, M. Sorberg, T. H. Casswall, R. Befrits, P. M. Hellstrom, C. Bengtsson, L. Engstrand, and M. Granstrom. 2003. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* 41:5604-5608.

144. Kleanthous, H., C. L. Clayton, and C. S. Tabaqchali. 1991. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 5:2377-2389.

145. Klein, P. D., R. H. Gilman, R. Leon-Barua, F. Diaz, E. O. Smith, and D. Y. Graham. 1994. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol* 89:2196-2200.

146. Koheler, C. I., M. B. Mues, H. P. Dienes, J. Kriegsmann, P. Schirmacher, and M. Odenthal. 2003. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 56:36-42.

147. Kosunen, T. U., K. Seppala, S. Sarna, and P. Sipponen. 1992. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339:893-895.

148. Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, E. A. van Der, R. W. Der Hulst, H. P. Wirth, J. Hook-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 181:273-282.

149. Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser. 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst*

87:1777-1780.

150. Kuo, C. H., D. C. Wu, C. Y. Lu, Y. C. Su, F. J. Yu, Y. C. Lee, I. C. Wu, S. R. Lin, C. S. Liu, C. M. Jan, and W. M. Wang. 2003. Low molecular weight protein of *Helicobacter pylori* and its relation to gastroduodenal diseases. *Hepatogastroenterology* 50:897-901.

151. Kwon, D. H., M. P. Dore, J. J. Kim, M. Kato, M. Lee, J. Y. Wu, and D. Y. Graham. 2003. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2169-2178.

152. Kwon, D. H., F. A. El Zaatari, M. Kato, M. S. Osato, R. Reddy, Y. Yamaoka, and D. Y. Graham. 2000. Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2133-2142.

153. Kwon, D. H., M. Kato, F. A. El Zaatari, M. S. Osato, and D. Y. Graham. 2000. Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol Lett* 188:197-202.

154. Lambert, J. R., S. K. Lin, and J. Aranda-Michel. 1995. *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 208:33-46.

155. Lamers, C. B. 1996. The changing role of H2-receptor antagonists in acid-related diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8 Suppl 1:S3-S7.

156. Lasry, S., J. Simon, A. Marais, J. Pouchot, P. Vinceneux, and Y. Boussougant. 2000. *Helicobacter cinaedi* septic arthritis and bacteremia in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 31:201-202.

157. Lee, A., M. F. Dixon, S. J. Danon, E. Kuipers, F. Megraud, H. Larsson, and B. Mellgard. 1995. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7:461-465.

158. Logan, R. P. H. and M. M. Walker. 2001. ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 323:920-922.

159. Loivukene, K., H. Kolk, H. I. Maarsoos, P. Kasenomm, M. Ustav, and M. Mikelsaar. 2000. Metronidazole and clarithromycin susceptibility and the subtypes of *vacA* of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia. *Scand J Infect Dis* 32:59-62.

160. Maeda, S., H. Yoshida, T. Ikenoue, K. Ogura, N. Kato, Y. Shiratori, and M. Omata. 1999. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 44:336-341.

161. Maggi-Solca, N., C. Valsangiacomo, and J. C. Piffaretti. 2000. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistant strains in the southern part of Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 6:38-40.

162. Mahdavi, J., B. Sondén, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Årmströng, T. Larson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, Wadström T., D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, and A. Arnqvist. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic

inflammation. *Science* 297:573-578.

163. Majmudar, P., S. M. Shah, K. R. Dhunjibhoy, and H. G. Desai. 1990. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol* 9:271-272.

164. Makristathis, A., W. Barousch, E. Pasching, C. Binder, C. Kuderna, P. Apfalter, M. L. Rotter, and A. M. Hirschl. 2000. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *J Clin Microbiol* 38:3710-3714.

165. Makristathis, A., E. Pasching, K. Schutze, M. Wimmer, M. L. Rotter, and A. M. Hirschl. 1998. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 36:2772-2774.

166. Malaty, H. M., Evans DG, Evans DJ Jr, and D. Y. Graham. 1992. *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* 103:813-816.

167. Malaty, H. M. and D. Y. Graham. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35:742-745.

168. Marchetti, M., B. Aricó, D. Burrioni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara. 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267:1655-1658.

169. Marshall, B. J., Armstrong JA, McGeachie DB, and, and Glancy RJ. 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aus* 436-439.

170. Marshall, B. J. and Goodwin CS. 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* 37:68.

171. Marshall, B. J., H. Royce, D. L. Annear, Goodwin CS, J. W. Pearman, and J. R. Warren. 1984. Original isolaton of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Biomed Letts* 25:83-88.

172. Marshall, B. J. and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.

173. Marshall, B. J., J. R. Warren, G. J. Francis, S. R. Langton, C. S. Goodwin, and E. D. Blincow. 1987. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 82:200-210.

174. McColl KE. 1992. *Helicobacter pylori* colonization and alterations in gastric physiology., p. 198-208. In B. Rathbone, ., and R. V. Heatley (eds.), *Helicobacter pylori* and Gastrointestinal Disease. Blackwell Scientific, Oxford.

175. Megraud, F. 1998. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115:1278-1282.

176. Megraud, F. 1999. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics: the main limitation of current proton-pump inhibitor triple therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11 Suppl 2:S35-S37.

177. Megraud, F. 2001. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Resist.Updat.* 4:178-186.
178. Mégraud, F., N. Lehn, T. Lind, E. Bayerdorffer, C. O'morain, R. Spiller, P. Unge, S. J. Veldhuyzen van Zanten, M. Wrangstadh, and C. F. Burman. 1999. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2747-2752.
179. Meijer, B. C., J. C. Thijs, J. H. Kleibeuker, A. A. van Zwet, and R. J. Berrelkamp. 1997. Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 35:292-294.
180. Mendonca, S., C. Ecclissato, M. S. Sartori, A. P. Godoy, R. A. Guerzoni, M. Degger, and J. Pedrazzoli, Jr. 2000. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 5:79-83.
181. Michetti P., Wadström T., Kraehenbuhl J.P., Lee A., Kreiss C., and Blum A.L. 1996. Frontiers in *Helicobacter pylori* research: pathogenesis, host response, vaccine development and new therapeutic approaches. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8:717-722.
182. Mikkonen, T. P., R. I. Karenlampi, and M. L. Hanninen. 2004. Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:753-758.
183. Minnis, J. A., T. E. Taylor, J. E. Knesek, W. L. Peterson, and S. A. McIntire. 1995. Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid* 34:22-36.
184. Mitchell, H. M. 2001. Epidemiology of infection, p. 7-18. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM press, Washington, DC.
185. Mitchell, H. M., P. Hu, Y. Chi, M. H. Chen, Y. Y. Li, and S. L. Hazell. 1998. A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China). *Gastroenterology* 114:256-261.
186. Mobley, H. L. T. 2001. Urease, p. 179-192. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM press, Washington, DC.
187. Monteiro, M. A., K. H. Chan, D. A. Rasko, D. E. Taylor, P. Y. Zheng, B. J. Appelmelk, H. P. Wirth, M. Yang, M. J. Blaser, S. O. Hynes, A. P. Moran, and M. B. Perry. 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* 273:11533-11543.
188. Monteiro, M. A., P. Zheng, B. Ho, S. Yokota, K. Amano, Z. Pan, D. E. Berg, K. H. Chan, L. L. MacLean, and M. B. Perry. 2000. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology* 10:701-713.
189. Morales-Espinosa, R., G. Castillo-Rojas, G. Gonzalez-Valencia, d. L. Ponce, A. Cravioto, J. C. Atherton, and Y. Lopez-Vidal. 1999. Colonization of Mexican patients by

multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol 37:3001-3004.

190. Moran AP. 1997. *Helicobacter pylori*: introduction and historical perspective, p. 1-5. In Moran AP and O'Morain CA (ed.), Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Normed Verlag GmbH, Bad Homburg.

191. Moran, A. P. 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Aliment Pharmacol Ther 10 Suppl 1:39-50.

192. Mueller, U. G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol Evol 14:389-394.

193. Nagorni, A. 2000. *Helicobacter pylori* at the end of the second millenium. Facta Universitatis 7:15-25.

194. Namavar, F., M. Sparrius, E. C. Veerman, B. J. Appelmek, and C. M. Vandembroucke-Grauls. 1998. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. Infect Immun 66:444-447.

195. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M100-S15., Wayne, Pennsylvania.

196. Neale, D. B. and C. G. Williams. 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. Can J For Res 21:545-554.

197. Nguyen, V. Q., R. M. Caprioli, and T. L. Cover. 2001. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. Infect Immun 69:543-546.

198. Nilsson, Ch., A. Sillén, L. Eriksson, M. L. Strand, H. Enroth, F. Normark, P. Falk, and L. Engstrand. 2003. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. Infect Immun 71:6573-6581.

199. Obata, Y., S. Kikuchi, H. Miwa, K. Yagyu, Y. Lin, and A. Ogihara. 2003. Diagnostic accuracy of serological kits for *Helicobacter pylori* infection with the same assay system but different antigens in a Japanese patient population. J Med Microbiol 52:889-892.

200. Occhialini, A., M. Urdaci, F. Doucet-Populaire, C. M. Bebear, H. Lamouliatte, and F. Megraud. 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 41:2724-2728.

201. Odenbreit, S., B. Wieland, and R. Haas. 1996. Cloning and Genetic Characterization of *Helicobacter pylori* Catalase and Construction of a Catalase-Deficient Mutant Strain. J Bacteriol 178:6960-6967.

202. Oleastro, M., A. Menard, A. Santos, H. Lamouliatte, L. Monteiro, P. Barthelemy, and F. Megraud. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 41:397-402.

203. On, S. L. W. 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J Appl Microbiol* 90:S1-15S.
204. Parsonnet, J. 1998. *Helicobacter pylori*. *Infect Dis Clin North Am* 12:185-197.
205. Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelmann. 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40:297-301.
206. Parsonnet, J., H. Shmueli, and T. Haggerty. 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282:2240-2245.
207. Paster, B. J., A. Lee, J. G. Fox, F. E. Dewhirst, L. A. Tordoff, G. J. Fraser, J. L. O'Rourke, N. S. Taylor, and R. Ferrero. 1991. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41:31-38.
208. Peek, R. M. Jr. and M. J. Blaser. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2:28-37.
209. Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, and Brenner H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 9:1-6.
210. Pitt, T. L. 2000. Classification and identification of micro-organisms, p. 25-35. *In* D. Greenwood, R. C. B. Slack, and J. F. Peutherer (eds.), *Medical Microbiology. A guide to microbial infections: Pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Churchill Livingstone.
211. Prazeres, M. P., D. M. Magalhaes Queiroz, D. V. Campos Barbosa, R. G. Aguiar, M. E. Nogueira, A. Santos, P. R. Valle Correa, A. M. Camargos Rocha, T. L. Martins, d. O. C. Affonso, Q. D. M. Magalhaes, B. D. V. Campos, R. G. Aguiar, M. E. Nogueira, and A. Santos. 2002. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2021-2023.
212. Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard. 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res* 61:1903-1909.
213. Queiroz, D. M., C. Contigli, R. S. Coimbra, A. M. Nogueira, E. N. Mendes, G. A. Rocha, and S. B. Moura. 1992. Spiral bacterium associated with gastric, ileal and caecal mucosa of mice. *Lab Anim* 26:288-294.
214. Rautelin, H., B. Blomberg, H. Fredlund, G. Jarnerot, and D. Danielsson. 1993. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer. *Gut* 34:599-603.
215. Realdi, G., M. P. Dore, A. Piana, A. Atzei, M. Carta, L. Cugia, A. Manca, B. M. Are, G. Massarelli, I. Mura, A. Maida, and D. Y. Graham. 1999. Pretreatment antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection: results of three randomized controlled studies. *Helicobacter* 4:106-112.
216. Ribeiro, M. L., L. Vitiello, M. C. Miranda, Y. H. Benvengo, A. P. Godoy, S.

Mendonca, and J. Pedrazzoli, Jr. 2003. Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2:11.

217. Romaniuk, P. J., B. Zoltowska, T. J. Trust, D. J. Lane, G. J. Olsen, N. R. Pace, and D. A. Stahl. 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol* 169:2137-2141.

218. Rothery, G. A. and D. W. Day. 1985. Intestinal metaplasia in endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa. *J Clin Pathol* 38:613-621.

219. Rugge, M., F. Farinati, R. Baffa, F. Sonogo, F. Di Mario, G. Leandro, and F. Valiante. 1994. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology* 107:1288-1296.

220. Rugge, M., G. Leandro, F. Farinati, F. Di Mario, F. Sonogo, M. Cassaro, M. Guido, and V. Ninfo. 1995. Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. *Cancer* 76:376-382.

221. Sachs, G., D. L. Weeks, K. Melchers, and D. R. Scott. 2003. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 65:349-369.

222. Satin, B., G. Del Giudice, V. Della Bianca, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, and F. Rissi. 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 191:1467-1476.

223. Savelkoul, P. H., H. J. Aarts, J. de Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. L. Rademaker, L. Schouls, and J. A. Lenstra. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 37:3083-3091.

224. Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14559-14564.

225. Segal, E. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1996. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1259-1264.

226. Shomer, N. H., C. A. Dangler, M. D. Schrenzel, and J. G. Fox. 1997. *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infect Immun* 65:4858-4864.

227. Soll, D. R., S. R. Lockhart, and C. Pujol. 2003. Laboratory procedures for epidemiological analysis, p. 139-161. *In* P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., and Tenover F.C. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

228. Solnick, J. V. 2003. Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis* 36:349-354.

229. Solnick, J. V. and Schauer D.V. 2001. Emergence of Diverse *Helicobacter* Species

in the Pathogenesis of Gastric and Enterohepatic Diseases. Clin Microbiol Rev 14:59-97.

230. Solnick, J. V. and P. Vandamme. 2001. Taxonomy of the *Helicobacter* genus, p. 39-51. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM press, Washington, DC.

231. Steel, K. J. 1961. The oxidase reaction as a taxonomic tool. J Gen Microbiol 25:297-306.

232. Steer, H. W. 1975. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. J Clin Pathol 28:639-646.

233. Stone, G. G., D. Shortridge, R. K. Flamm, J. Versalovic, J. Beyer, K. Idler, L. Zulawinski, and S. K. Tanaka. 1996. Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. Helicobacter 1:227-228.

234. Suerbaum, S. and P. Michetti. 2002. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 347:1175-1186.

235. Tai, P. C., B. J. Wallace, and B. D. Davis. 1974. Selective action of erythromycin on initiating ribosomes. Biochemistry 13:4653-4659.

236. Taylor, D. E., Z. Ge, D. Purych, T. Lo, and K. Hiratsuka. 1997. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob Agents Chemother 41:2621-2628.

237. Taylor, D. N. and M. J. Blaser. 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Epidemiol Rev 13:42-59.

238. Telford J.L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Commanducci, D. Burrioni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, A. Censini, and A. Covacci. 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J Exp Med 179:1653-1658.

239. Telford, J. L., A. Covacci, and R. mucosal cells.Rappuoli. 1994. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. Trends Biotechnol 12:420-426.

240. Tenson, T. and M. Ehrenberg. 2002. Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. Cell 108:591-594.

241. Tenson, T., M. Lovmar, and M. Ehrenberg. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. J Mol Biol 330:1005-1014.

242. Testerman, T. L., D. J. McGee, and H. L. T. Mobley. 2001. Adherence and colonization, In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Press.

243. Thomas, J. E., G. R. Gibson, M. K. Darboe, A. Dale, and L. T. Weaver. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet 340:1194-1195.

244. Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D.

Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, J. C. Venter, and . 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.

245. Topal, D., V. Goral, F. Yilmaz, and I. H. Kara. 2004. The relation of *Helicobacter pylori* with intestinal metaplasia, gastric atrophy and BCL-2. *Turk J Gastroenterol* 15:149-155.

246. Torres, J., M. Camorlinga-Ponce, G. Perez-Perez, A. Madrazo-De la Garza, M. Dehesa, G. Gonzalez-Valencia, and O. Munoz. 2001. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol* 39:2677-2680.

247. Torres, V. J., S. E. Ivie, M. S. McClain, and T. L. Cover. 2005. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 280:21107-21114.

248. Townsend, K. M. and H. J. Dawkins. 1993. Field alternation gel electrophoresis--status quo. *J Chromatogr* 618:223-249.

249. Tsuda, M., M. Karita, M. G. Morshed, K. Okita, and T. Nakazawa. 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 62:3586-3589.

250. Tummuru, M. K. R., T. L. Cover, and M. J. Blaser. 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 51:1799-1809.

251. van der Wouden, E. J., A. A. van Zwet, G. D. Vosmaer, J. A. Oom, A. de Jong, and J. H. Kleibeuker. 1997. Rapid increase in the prevalence of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in the Netherlands. *Emerg. Infect Dis* 3:385-389.

252. van Doorn, L. J., Y. J. Debets-Ossenkopp, A. Marais, R. Sanna, F. Megraud, J. G. Kusters, and W. G. Quint. 1999. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1779-1782.

253. van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, M. J. Blaser, and W. G. Quint. 1999. Distinct variants of *Helicobacter pylori cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J Clin Microbiol* 37:2306-2311.

254. van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, A. Plaisier, P. M. Schneeberger, W. A. de Boer, and W. G. Quint. 1998. Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA*, *iceA* Status of *H. pylori*. *Gastroenterology* 115:58-66.

255. van Doorn, L. J., W. G. Quint, P. M. Schneeberger, G. N. Tytgat, and W. A. de Boer. 1997. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. *Lancet* 350:71-72.

256. van Doorn, L. J., P. M. Schneeberger, N. Nouhan, A. P. Plaisier, W. G. Quint, and W. A. de Boer. 2000. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the

efficacy of antibiotic treatment. Gut 46:321-326.

257. Vandamme, P. A. R. 2003. Taxonomy and classification of bacteria, p. 271-285. In P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., and Tenover F.C. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

258. Versalovic, J. 2003. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. Am J Clin Pathol 119:403-412.

259. Vincent, V., B. A. Brown-Elliott, K. C. Jr. Jost, and R. J. Jr. Wallace. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, In P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., and Tenover F.C. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

260. Vinion-Dubiel, A. D., M. S. McClain, P. Cao, R. L. Mernaugh, and T. L. Cover. 2001. Antigenic diversity among *Helicobacter pylori* vacuolating toxins. Infect Immun 69:4329-4336.

261. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, L. T. van de, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and . 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407-4414.

262. Walsh, J. H. and W. L. Peterson. 1995. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N Engl J Med 333:984-991.

263. Wang, G., R. C. Conover, S. Benoit, A. A. Olczak, J. W. Olson, M. K. Johnson, and R. J. Maier. 2004. Role of a Bacterial Organic Hydroperoxide Detoxification System in Preventing Catalase Inactivation. J Biol Chem 279:51908-51914.

264. Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs. 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science 287:482-485.

265. Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs. 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science 287:482-485.

266. Weir, S. C., C. L. Gilbert, F. M. Gordin, S. H. Fischer, and V. J. Gil! 1999. An uncommon *Helicobacter* isolate from blood: Evidence of a group of *Helicobacter* spp. Pathogenic in AIDS patients. J Clin Microbiol 37:2733-2729.

267. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18:6531-6535.

268. Williamson, R., G. A. Pipkin, and J. R. Wood. 1998. New options in *Helicobacter pylori* eradication: efficacy, resistance and synergy. Scand J Gastroenterol Suppl 225:36-40.

269. Wolle, K., A. Leodolter, P. Malfertheiner, and W. Konig. 2002. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. J Med Microbiol 51:705-709.

270. Worku, M. L., R. L. Sidebotham, M. M. Walker, T. Keshavarz, and Q. N. Karim. 1999. The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology* 145 (Pt 10):2803-2811.
271. Wright, A. J. and C. J. Wilkowske. 1983. The penicillins. *Mayo Clin Proc* 58:21-32.
272. Wu, H., X. D. Shi, H. T. Wang, and J. X. Liu. 2000. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxycillin. *J Antimicrob Chemother* 46:121-123.
273. Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63:94-98.
274. Xue, S., P. O. Katz, P. Banerjee, R. Tutuian, and D. O. Castell. 2001. Bedtime H2 blockers improve nocturnal gastric acid control in GERD patients on proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 15:1351-1356.
275. Yonath, A. 2005. Antibiotics Targeting Ribosomes: Resistance, Selectivity, Synergism, and Cellular Regulation. *Annu Rev Biochem* 74:649-679.

Antimicrobial Resistance and Characterization of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Mexican Adults with Clinical Outcome

L. CHIHU^{1,3} - G. AYALA^{1*} - A. MOHAR² - A. HERNÁNDEZ² - R. HERRERA-GOEPFERT²
G. FIERROS¹ - H. GONZÁLEZ-MÁRQUEZ⁴ - J. SILVA¹

¹ National Institute of Public Health, SSA, Cuernavaca, Morelos; ² Cancer National Institute, SSA, México City;

³ Experimental PhD Program, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City;

⁴ Health Science Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, Mexico.

Corresponding author: Dr. Guadalupe Ayala, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655 Cuernavaca, Mor. C. P. 62508 Mexico. Phone: +5277 73-29- 30-00 Ext. 2231 Fax: +5277 73-17-54-85. E-mail: gayala@correo.insp.mx

Summary

Eradication of *Helicobacter pylori* infection in Mexico is of great importance due to the elevated seroprevalence, however, there is yet very little information about antibiotic resistance rates in *H. pylori* isolates in our country. We analyzed susceptibility to three antimicrobials used in therapy of 49 *H. pylori* strains isolated from patients with active chronic gastritis, active chronic gastritis with lymphoid follicles, intestinal metaplasia and gastric cancer. All isolated strains were susceptible to amoxicillin, 28 (58%) were resistant to metronidazole and 2 (4%) were resistant to both clarithromycin and metronidazole. Sequence analysis of the 23S rRNA of the two clarithromycin-resistant strains showed the A2142G mutation in one and A2143G and T2182C mutations in the other. Metronidazole resistance was associated with *cagA* negative strains with a frequency of 82% (9/11). No significant correlation was found between *vacA* s/m alleles and metronidazole resistance.

Key words: Antimicrobial resistance, *Helicobacter pylori*, metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, gastric diseases, virulence factors.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori infection is generally acquired during childhood and persists as an asymptomatic infection for decades in most individuals. *H. pylori* is implicated in the etiology of gastric diseases ranging from gastritis to gastric cancer, and it has been classified as a group I carcinogen¹. The prevalence of *H. pylori* infection in first world countries is lower than in developing countries²⁻⁵.

In Mexico, in 1987, the prevalence for *H. pylori* seropositivity in adults over 20 years of age was 82.6%⁶; Lopez *et al*⁷ found similar results in a case control study where seropositivity was 80%. In Mexico, gastric cancer is the second leading cause of malignant tumor mortality. The annual incidence

of gastric cancer reported in 2001 by the INEGI's (mortality data base of the Ministry of Public Health), was 4.9 per 100,000 individuals. Thus, the characterization of bacterial factors that could contribute to progression of *H. pylori* associated gastric diseases in infected persons is of major concern in our country.

H. pylori infection can be cured with antibiotics, however the ideal treatment has not been found yet, and the choice of therapy should be based on local susceptibility patterns⁸. Treatment of *H. pylori* infection usually consists of a proton-pump inhibitor (PPI) in combination with two antibiotics⁹ clarithromycin and metronidazole or amoxicillin, or quadruple therapy with a proton-pump inhibitor, a bismuth compound, tetracycline and metronidazole¹⁰⁻¹³. The resistance of *H. pylori* to the actual exist-

ing antibiotics available for its treatment has been a growing problem^{9,14}. In first world countries, metronidazole resistance is found in 10 to 50% of adult patients infected with *H. pylori*^{9,15-17}, while in developing countries resistance rates can be as high as 80%^{15,18,19}, while resistance to clarithromycin ranges from 1% to 26%^{15,20-22}. In Mexico, it has been reported that resistance to clarithromycin and metronidazole increased significantly from 1995 to 1997, reaching values of 24% and 80% respectively²³. Conversely, another study has reported lower frequencies of resistance to both antibiotics²⁴. In the present study, we investigated the frequency of resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin in clinical strains of *H. pylori* isolated from Mexican patients during 1997, 2000 and 2001. We also evaluated the variability of *vacA* *s/m* alleles, and the *cagA* status of *H. pylori* to stratify virulence-associated genes between groups of patients and in order to compare the *H. pylori* genotypes to susceptibility of isolates. Molecular genotyping of *H. pylori* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) showed optimal typabilities²⁵. In order to discriminate unrelated from clustered clinical isolates, genomic typing of the strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) was performed.

MATERIALS AND METHODS

Patient population

A total of 180 non-selected patients of any age and gender attending for gastric discomfort, the Endoscopy Service at the National Cancer Institute (Instituto Nacional de Cancerología), in Mexico City, were enrolled in the study. Biopsies were obtained from each patient by specialized personnel supervised by the physician responsible for the Endoscopy Unit. Biopsies were immersed in 10% formalin and sent to the Pathology Department for routine histologic process. The study was previously approved by the Ethical and Research Committees and fully informed consent was obtained from each patient. The *H. pylori* clinical isolates used in this study were obtained in 1997, 2000 and 2001 respectively.

Histopathology

Biopsies were reviewed and classified by one pathologist (RHG). The visual analogue scale proposed by the Updated Grading System for Gastritis was applied for inflammatory conditions²⁶. The presence or absence of lymphoid follicles, as well as intestinal metaplasia, were also recorded. Primary gastric carcinoma was classified according to Lauren's criteria, as diffuse- or intestinal-type adenocarcinoma²⁷. Finally, primary gastric lymphomas were classified as proposed by the World Health Organization Classification²⁸.

Bacterial strains

Biopsies were processed immediately after collection. Each of the biopsy specimens was homogenized with a tissue grinder and then inoculated on trypticase soy agar plates (Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) supplemented with 7.5% sheep blood, 0.1% cyclodextrin and 0.1% vancomycin for 5 to 7 days at 37°C under a microaerophilic atmosphere of 10% CO₂. The strains were identified by Gram staining morphology and biochemical test (oxidase, catalase and urease positive). The isolates were stored at -70°C in 1.5 ml brain heart infusion broth (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, Md.) with 30% glycerol until use. Reference *H. pylori* strain ATCC 43504 obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) was used for quality control.

Growth conditions

Stored isolates of *H. pylori* were grown on trypticase soy agar plates (Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) supplemented with 5% sheep blood and 0.1% vancomycin for 72 h at 37°C under a microaerophilic atmosphere of 10% CO₂.

H. pylori isolates were subcultured into a 25 ml volume of Brucella Broth in a Falcon tube using selective supplement (OXOID, Basingstoke, Hampshire, UK) and 5% fetal bovine serum (GIBCO BRL, Bethesda, MD). Cultures were maintained under gentle shaking for 48 hours at 37°C in the above described CO₂-enriched atmosphere. Cultures were harvested by centrifugation for 10 minutes at 11,000 x *g* bacterial cells and supernatants were collected. Bacterial pellets were checked again for positive biochemical tests and morphology, before proceeding to DNA isolation for PCR analysis.

vacA/cagA genotyping

Genomic DNA was isolated using the GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ). PCR reactions for *cagA* or 16S rRNA genes were done with specific primers, as reported by other researchers²⁹. Classical *vacA* genotyping (*s/m* genotypes) were done with primers and PCR conditions previously proposed³⁰.

E-test

Agar plates were prepared with Müller-Hinton agar (MHA) (Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) supplemented with 10% sheep blood and 10% fetal bovine serum. Fresh *H. pylori* isolates from a 72 h subculture from a blood agar plate were diluted in sterile Müller-Hinton broth (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) and adjusted to a 3.0 McFarland standard ($\geq 10^8$ cfu/ml of viable cells). By using a sterile swab the inoculum was spread to cover the surface completely. The plates

were dried briefly before carefully adding metronidazole, clarithromycin or amoxicillin E test strips (AB Biodisk, Solna, Sweden), and handled with great care so as not to move the strip once it had contacted the surface. The plates were incubated under microaerobic conditions at 37°C for 72 h. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the concentration on the E-test strip closest to the point of intersection, where the growth of the inoculum was completely inhibited. Metronidazole resistance was defined as a MIC of 8 µg/ml; clarithromycin resistance was defined as a MIC of 2 µg/ml and amoxicillin resistance was defined as a MIC of >4 µg/ml^{23,31}.

A quality control organism (*H. pylori* ATCC 43504) was included in MIC determination. A 0.1ml aliquot of the suspension was serially diluted and streaked onto antibiotic-free plates to assess the number of CFU per milliliter.

Detection of mutations

To detect mutations of the 23S rRNA sequence associated with clarithromycin resistance, a 1.14 kb fragment of the 23S rRNA was amplified by PCR. PCR amplification conditions were performed as previously described³² with oligonucleotide primers Hp5³² and Hp2³³. PCR was done in a final volume of 50µl containing 1X Buffer XL, 1.0mM Mg(OAc)₂, 200µM deoxynucleoside triphosphate mix, 50 µM of each primer, 2U of *rTth* DNA polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ), 50 ng of DNA template. Amplification was performed in a Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT). Five microliters of the reaction products were analyzed by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel containing 1X Tris acetate running buffer. The PCR products were purified using a spin column QIAQuick PCR purification kit (Qiagen Inc. Valencia, Ca) and subjected to sequencing with the fluorescence-based *Taq* FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequence analysis was performed on an ABI 377 genetic analyzer using the data collection software 377-18 (Applied Biosystems).

RAPD-PCR

The primers used (1254, 1274 and 1281) were selected from the literature²⁵. Reaction conditions were as follows: PCR buffer 1X (GIBCO BRL, Bethesda, MD), 3 mM MgCl₂ (GIBCO BRL), each dNTPs (Perkin Elmer) 0.2 µM, 1.5 U *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL), primer 0.2 µM, and DNA 20 ng. The reaction volume was 50 µl, and the following cycle conditions were used: 2 cycles of 94°C for 5 min, 36°C for 5 min, and 72°C for 5 min; and then 30 cycles of 94°C for 1 min, 36°C for 1 min, and 72°C for 2 min; a final extension cycle at 72°C for 7 min was included. Amplifications were performed in a Perkin-Elmer GeneAmp PCR

system 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT). RAPD-PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels and ethidium bromide staining. DNA molecular weight marker 1kb DNA ladder (GIBCO BRL) was used as standard.

Statistical analysis

For comparative purposes, individuals were sub-grouped as follows: patients with active chronic gastritis, with or without lymphoid follicles; patients with intestinal metaplasia, either with active gastritis and/or lymphoid follicles, and patients with primary gastric neoplasia, according to Lauren's criteria for adenocarcinoma and lymphoma, respectively. Prevalences of *cagA* gene, *vacA* alleles and metronidazole resistance, among the specific groups of diagnosis, were compared with the χ^2 distribution test.

RESULTS

Patient characteristics

Sixty-six percent of 180 patients were positive to *H. pylori* by histology, but in 49 patients we were able to isolate the bacteria from the biopsies. Only patients *H. pylori*-positive by culture were considered in our analysis. The age of the subjects (17 male and 32 female) was between 26 and 87 years of age (mean \pm SD, 51.9 \pm 15.49). We collected 17 strains in 1997, 14 in 2000 and 18 in 2001 respectively.

Histopathologic findings

The diagnoses of 49 patients were: 7 patients with gastric cancer (GC), of these, one presented primary gastric lymphoma, one had intestinal type adenocarcinoma, and 5 diffuse type adenocarcinoma. Nine patients with chronic gastritis had intestinal metaplasia (IM). Thirty patients had active chronic gastritis; 23 of them had lymphoid follicles (ACGF) while the remaining 7 had no lymphoid follicles (ACG). Three patients could not be grouped because gastric mucosa of one patient was not adequately sampled; a female patient had metastatic breast cancer and the diagnosis of the third patient was not registered. We considered these 3 patients as unclassified (UN) because none of them could be grouped into a specific gastric disease.

Antimicrobial susceptibility

To guarantee the authenticity of isolates prior to any analyses, strains were tested for the presence of species-specific 16S rRNA gene by PCR²⁹. All strains in this study produced a 16S rRNA PCR fragment of the expected size.

The MICs of the three antibiotics tested are

shown in Figure 1. Amoxicillin was the most active of antibiotics with MICs <0.016 µg/ml for 31 strains (63% of 49 strains examined), none of the isolates were resistant to this antibiotic. The metronidazole MIC for *H. pylori* ATCC 43504 was 64 µg/ml by the E-test. Antimicrobial susceptibility testing revealed that 57.1% of strains were resistant to metronidazole, being inhibited at concentration from 12 µg/ml to >256 µg/ml (Figure 1). The prevalence of metronidazole resistance per year varied from 35% in 1997 to 54% in 2000 and 74% in 2001 (Figure 2).

Clarithromycin was also very active with MICs <0.016 µg/ml for strains (Figure 1). Only 4% were clarithromycin resistant (2 of 49 isolates; MICs, >256 µg/ml), these strains were also resistant to metronidazole.

The clarithromycin resistant *H. pylori* isolates were analyzed for the 23S ribosomal RNA gene with PCR and sequencing. One isolate had the A2142G point mutation and another had two point mutations, which were A2143G and T2182C. Sequence analysis of the control strain *H. pylori* ATCC 43504 did not reveal any mutations.

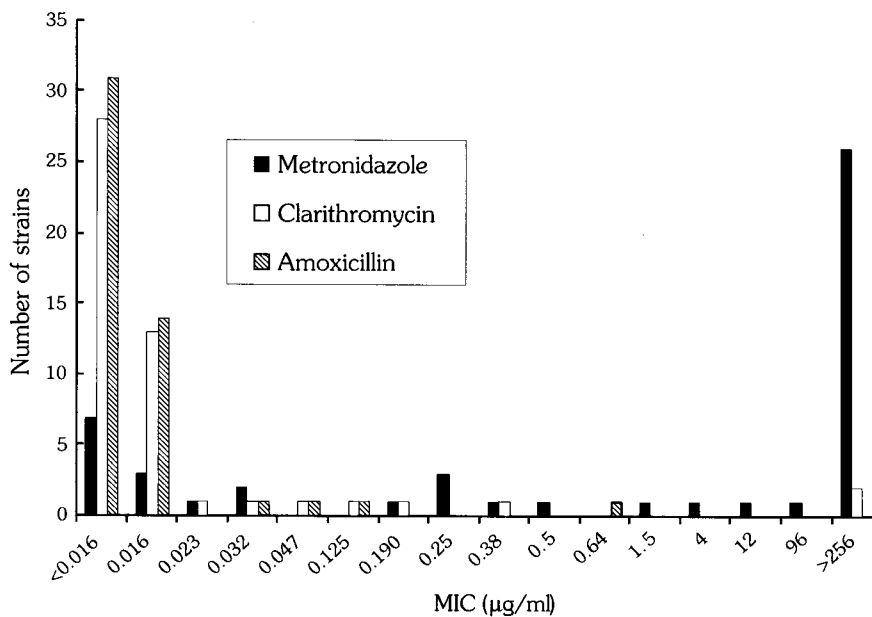


FIGURE 1 - Distribution of MIC among the tested 49 *H. pylori* isolates obtained by E-test.

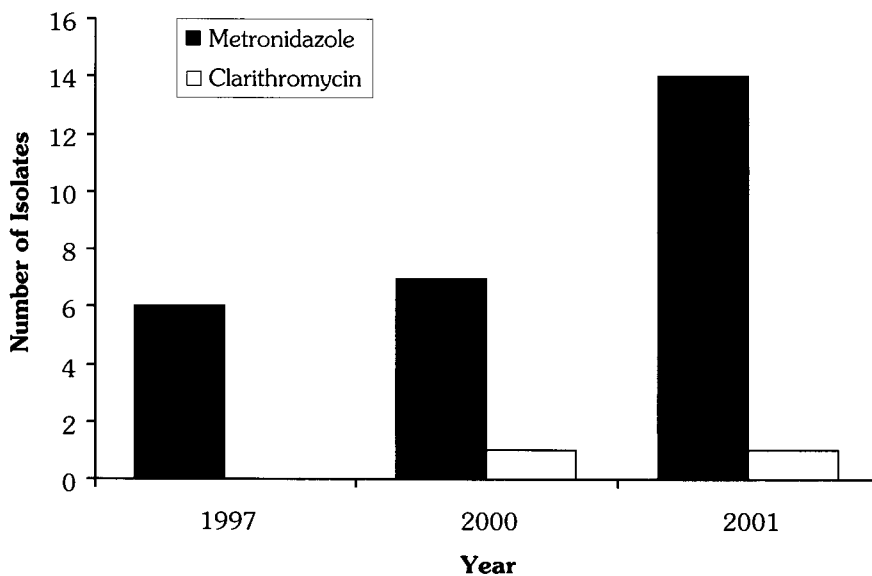


FIGURE 2 - Antimicrobial resistance distribution of *H. pylori* strains in Mexico per year. Data presented according to the number of resistant strains.

cagA/vacA genotypes and their association with clinical outcome and metronidazole resistance

A high correlation was observed between the genotype s1/m1 and gastric cancer, and between intestinal metaplasia and active chronic gastritis with lymphoid follicles ($p < 0.001$). In cancer patients the prevalence of s1/m1 *vacA* genotype was of 100% (7/7); in intestinal metaplasia cases the prevalence was of 77% (7/9), and in active chronic gastritis with lymphoid follicles a high prevalence of s1/m1 genotype was also observed 78% (18/23). The s2/m2 genotype had a prevalence of 85.7% (6/7) in patients with active chronic gastritis without lymphoid follicles. Analysis of prevalence of *cagA* gene in strains showed that 38 (77.5%) of the 49 *H. pylori* isolates tested positive for the presence of *cagA*. The presence of the *cagA* gene was related to the severity of the disease ($p = 0.004$). This gene was detected in 100% of *H. pylori* isolates from gastric cancer and intestinal metaplasia cases; in patients with active chronic gastritis with lymphoid follicles the prevalence was of 74% (17/23), while in patients with chronic active gastritis without lymphoid follicles only 28% (2/7) were *cagA* positive (Table 1).

TABLE 1 - Relationship between gastric disease, *cagA* status and metronidazole resistance.

Gastric Diseases n = 46*	<i>cagA</i> Status	Mz R n = 27
GC n = 7	Pos: 7 Neg: 0	2 -
IM n = 9	Pos: 9 Neg: 0	6 -
ACGF n = 23	Pos: 17 Neg: 6	8 6
ACG n = 7	Pos: 2 Neg: 5	2 3

* The three unclassified patients (UN) were not considered. GC: gastric cancer, IM: intestinal metaplasia, ACGF: follicular active chronic gastritis, ACG: active chronic gastritis. Mz R: metronidazole resistance

Considering that metronidazole was the only antibiotic that showed different values among the isolated strains, the potential association between specific virulence markers, *vacA* s/m alleles and *cagA* with metronidazole resistance was also investigated. No significant relationship was found between s/m alleles and resistance to this antibiotic. The association between *cagA* status and metronidazole resistance was on the borderline of significance ($p =$

0.074). A prevalence of 82% (9/11) of metronidazole resistant strains was found among the *cagA* negative strains (Table 1). Whereas, between *cagA* positive strains, the frequency of susceptible and resistant strains was essentially equal, 17 and 18 respectively.

RAPD

The 49 *H. pylori* strains were screened by RAPD fingerprinting using three primers, two of these primers (1254 and 1281) generated DNA fingerprints for all 49 unrelated isolated *H. pylori* examined. And the 1247 primer amplified 81% (40 of 49) of the strains. For RAPD analysis the three primers produced different patterns with up to nine bands, showing that each strain had a unique RAPD pattern, with a large heterogeneity of strains isolated from patients.

DISCUSSION

Resistance analysis of *H. pylori* to three antimicrobial drugs frequently used in our country (clarithromycin, metronidazole and amoxicillin) showed that resistance to metronidazole increased from 35% in 1997 to 74% in 2001. On the contrary, resistance to clarithromycin increased only slightly in the same period, and all strains were susceptible to amoxicillin. In this work *H. pylori* resistance to metronidazole (58%) was lower than that reported between 1995 and 1997 by Torres *et al.* (80%)²³, but greater than 37.1% of metronidazole resistance reported by Garza-Gonzalez *et al.*²⁴ in 2002. These discrepancies were probably due to the kind of patients involved in each study, who were from different hospitals, diverse socioeconomic levels and even different regions of the country. The small number of analyzed strains was not enough to explain the differences in metronidazole resistance. Nevertheless, it is important to consider that antibiotics are sold without medical prescription in our country and therefore they are frequently misused, especially metronidazole which is still the main choice when treating *Entamoeba* parasitosis. This could explain the high resistance to metronidazole found among *H. pylori* strains in our country.

In addition to antimicrobial susceptibility, bacterial virulence factors could affect the eradication of the microorganism from the gastric mucosa. Analysis of prevalence of *vacA* genotypes and *cagA* status in strains showed that, in agreement with previous results⁹, there was a strong association between the *cagA*⁺/s1m1 genotype and cancer, intestinal metaplasia, and active chronic gastritis with lymphoid follicles, but a poor correlation, with the milder forms of the disease, as active chronic gastritis without lymphoid follicles. The latter condition was strongly associated with the *vacA* s2/m2 genotype and with the lack of *cagA* gene.

There was a strong association between *cagA*⁺ strains and metronidazole resistance (Table 1). It has been suggested that the physiological environment promoted by *cagA*⁻ strains reduces the exposure of the bacteria to the antibiotic^{34,35}, making them more difficult to eradicate. However, we noticed that among *cagA*⁺ strains the resistance to metronidazole was also high, 69 % (18/26) (Table 1). Moreover, we observed that *in vitro* both *cagA*⁺ and *cagA*⁻ *H. pylori* strains have similar susceptibility since the MIC at which 90% of the strains were inhibited was >256 µg/ml for the two types of strains. In the case of clarithromycin it has been suggested that *cagA*⁺ strains are more susceptible to this antibiotic because they grow faster than *cagA*⁻ strains³⁴. On the contrary, the induction of metronidazole resistance appears to be independent of the growth rate and most probably occurs due to misuse of this antibiotic³⁶. Gradual exposure to suboptimal concentration of metronidazole favors the selection of resistant strains.

CONCLUSIONS

In conclusion, the present study provides evidence of a low prevalent resistance of *H. pylori* to both clarithromycin and amoxicillin. Consequently, we advise the use of clarithromycin plus amoxicillin combined with proton pump inhibitors. However, since the primary metronidazole resistance is high, this could contribute to increased resistance to both clarithromycin and amoxicillin⁸. Thus, in the near future alternative drugs, such as furazolidone and tetracycline, might be considered for the eradication of *H. pylori* in our community. Resistant strains to metronidazole were more frequent among *cagA* negative strains. However, we also detected a high resistance to this antibiotic among *cagA* positive strains. Apparently, the resistance to metronidazole does not depend on the level of tissue damage, and the status of the *cagA* gene (Table 1). The presence of the *cagA* gene was significantly associated with that of the *vacA* s1/m1 genotype and intestinal metaplasia, gastric cancer and follicular gastritis. Thus, the high prevalence of resistance to metronidazole among strains harboring the *cagA*⁺/*vacA*s1/m1 genotype could be one of the reasons for the high prevalence of severe gastroduodenal diseases such as follicular gastritis and gastric cancer in Mexico. We believe that it is important to create an awareness among physicians in our country about patients carrying *cagA*⁺/metronidazole-resistant strains, particularly those suffering active chronic gastritis with lymphoid follicles (Table 1), since this disease can progress into more severe forms such as lymphoma³⁷.

Although the number of subjects included in this study is small, this is the first report in Mexico which includes frequency of antimicrobial resistance, mole-

cular mechanism of clarithromycin resistance, RAPD patterns, and association between clinical outcome and *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori* strains isolated from adult patients with gastrointestinal symptoms.

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by grants 37195-M from CONACYT to JSS and GA. The authors RHG, AM, HGM, JS and GA, are most grateful and acknowledge stipends from SNI (CONACYT, Mexico). We also thank CONACYT for the financial support (No. 169621) granted to Lilia Chihu during her PhD. studies, and very much appreciate the technical support given by Alberto Sanchez-Mañón.

REFERENCES

- International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61:1-241.
- Bardhan PK. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin Infect Dis 1997; 25(5):973-978.
- Graham DY, Adam E, Reddy GT *et al*. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. Dig Dis Sci 1991; 36(8):1084-1088.
- Mitchell HM, Li YY, Hu PJ *et al*. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. J Infect Dis 1992; 166(1):149-153.
- Perez-Perez GI, Taylor DN, Bodhidatta L *et al*. Sero-prevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. J Infect Dis 1990; 161(6):1237-1241.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G *et al*. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis 1998; 178(4):1089-1094.
- Lopez-Carrillo L, Lopez-Cervantes M, Robles-Diaz G *et al*. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* positivity and gastric cancer in Mexico. Int J Cancer 2003; 106(2):277-282.
- de Boer WA, Tytgat GN. Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. BMJ 2000; 320(7226):31-34.
- Walsh JH, Peterson WL. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N Engl J Med 1995; 333(15):984-991.
- Bazzoli F. Key points from the revised Maastricht Consensus Report: the impact on general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13 Suppl 2:S3-S7.
- de Wit NJ, Mendive J, Seifert B, Cardin F, Rubin G. Guidelines on the management of *H. pylori* in primary care: development of an implementation strategy. Fam Pract 2000; 17 Suppl 2:S27-S32.
- Hunt RH, Fallone CA, Thomson AB. Canadian *Helicobacter pylori* Consensus Conference update: infections in adults. Canadian Helicobacter Study Group. Can J Gastroenterol 1999; 13(3):213-217.
- Sherman P, Hassall E, Hunt RH, Fallone CA, Veldhuyzen VZ, Thomson AB. Canadian Helicobacter Study Group Consensus Conference on the Approach to *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adolescents. Can J Gastroenterol 1999; 13(7):553-559.
- Kato S, Fujimura S, Udagawa H *et al*. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. J Clin Microbiol 2002; 40(2):649-653.
- Adamek RJ, Suerbaum S, Pfaffenbach B, Opferkuch

W. Primary and acquired *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole, and amoxicillin—influence on treatment outcome. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(3):386-389.

¹⁶ Gotoh A, Kawakami Y, Akahane T *et al.* Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates against agents commonly administered for eradication therapy and the efficacy of chemotherapy. *Microbiol Immunol* 1997; 41(1):7-12.

¹⁷ Graham DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 1998; 115(5):1272-1277.

¹⁸ Debets-Ossenkopp YJ, Reyes G, Mulder J *et al.* Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1):141-145.

¹⁹ Megraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115(5):1278-1282.

²⁰ Megraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 1:43-53.

²¹ Megraud F, Lehn N, Lind T *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(11):2747-2752.

²² Ryan KA, van Doorn LJ, Moran AP, Glennon M, Smith T, Maher M. Evaluation of clarithromycin resistance and *cagA* and *vacA* genotyping of *Helicobacter pylori* strains from the west of Ireland using line probe assays. *J Clin Microbiol* 2001; 39(5):1978-1980.

²³ Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G *et al.* Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2677-2680.

²⁴ Garza-Gonzalez E, Perez-Perez GI, Alanis-Aguilar O, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. Antibiotic susceptibility patterns of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern Mexico. *J Chemother* 2002; 14(4):342-345.

²⁵ Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):4071-4080.

²⁶ 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(10):1161-1181.

²⁷ Laur'en P. The two histological main types of gastric carcinoma diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An

attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31-49.

²⁸ Harris NL, Jaffe ES, Diebold J *et al.* World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17(12):3835-3849.

²⁹ Engstrand L, Nguyen AM, Graham DY, el Zaatari FA. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. *J Clin Microbiol* 1992; 30(9):2295-2301.

³⁰ Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., 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(30):17771-17777.

³¹ Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29(9):2072-2075.

³² Fontana C, Favaro M, Minelli S *et al.* New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12):3765-3769.

³³ Fontana C, Favaro M, Pietrojusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3636-3640.

³⁴ Broutet N, Marais A, Lamouliatte H *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):1319-1322.

³⁵ van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WG, de Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut* 2000; 46(3):321-326.

³⁶ Lui SY, Yeoh KG, Ho B. Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* is more prevalent in patients with nonulcer dyspepsia than in peptic ulcer patients in a multiethnic Asian population. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11):5011-5014.

³⁷ Herrera-Goepfert R, Arista-Nasr J, Alba-Campomanes A. Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29(3):266-269.

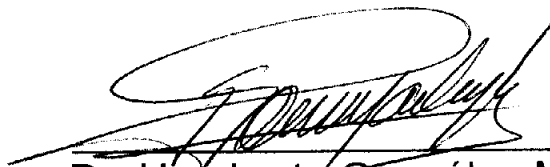
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la presente tesis el día 25 de agosto de 2006.



Dr. Pablo Damian Matzumura
Presidente



Dra. Guadalupe Ayala Aguilar
Vocal



Dr. Humberto González Márquez
Vocal



Dra. Irma Romero Alvarez
Vocal



Dr. Carlos Eslava Campos
Secretario