



Universidad de Oviedo

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Programa Biología Molecular y Celular

**Epidemiología, diagnóstico y estudio de resistencias
de *Helicobacter pylori*.**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Ana Morilla Morilla

Oviedo, 2018

Universidad de Oviedo

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Programa Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral



**Epidemiología, diagnóstico y estudio de resistencias de
*Helicobacter pylori***

***Epidemiology, diagnosis and study of antimicrobial
susceptibility of Helicobacter pylori***

Autor: Ana Morilla Morilla

Directores: Dra. Marta E Álvarez Argüelles

Dr. Santiago Melón García

Oviedo, 2018



RESUMEN DEL CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL

1.-Título de la tesis	
Español/Otro idioma:	Inglés:
Epidemiología, diagnóstico y estudio de resistencias de <i>Helicobacter pylori</i>	Epidemiology, diagnosis and study of antimicrobial susceptibility of <i>Helicobacter pylori</i> .

2.- Autor
Nombre: Ana Morilla Morilla
Programa de Doctorado: Biología Celular y Molecular
Órgano responsable: Dpto: Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo

RESUMEN EN ESPAÑOL

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más prevalentes a nivel mundial, y se relaciona principalmente con patología digestiva. Su incidencia tiende a disminuir en los últimos años en los países occidentales, aunque el incremento de las resistencias a los antimicrobianos comienza a suponer un problema. Desde el punto de vista microbiológico, los métodos clásicos de diagnóstico son el cultivo y el test de la ureasa rápida, métodos que tienen sus limitaciones en cuanto a tiempo de respuesta y sensibilidad, respectivamente. Las técnicas de biología molecular han demostrado tener buenos resultados, tanto en el diagnóstico de la infección como en la predicción de resistencias a los antimicrobianos. Se estudiaron 3426 pacientes durante un período de 13 años (2004-2016) para conocer la tasa de infección y el perfil de resistencia a los antimicrobianos de *H. pylori*. La tasa de infección fue del 47%, disminuyó significativamente a lo largo del período de estudio desde el 63% al comienzo hasta alcanzar un 37%. Fue significativamente mayor entre los pacientes con enfermedad ulcerosa. De los 1439 aislamientos un 19% fueron resistentes a claritromicina, 40% a metronidazol y 17% a levofloxacino. Estos porcentajes fueron constantes durante el período estudiado. Un 1% de los aislamientos fueron resistentes a los tres fármacos. La resistencia a claritromicina fue significativamente mayor entre las mujeres mientras que a metronidazol fue mayor en los pacientes menores de 70 años. Por el



contrario, la resistencia a levofloxacinó aumentó con la edad de los pacientes Para conocer la resistencia genómica a claritromicina se secuenció un fragmento del gen ARNr 23S en 63 cepas, 38 fenotípicamente resistentes y 25 sensibles. En 31 (82%) de las cepas resistentes se detectaron mutaciones previamente descritas relacionadas con resistencia a claritromicina: A2143G en 27, A2142C en 1, A2142G en 1 y T2182C en 7 (5 de ellas asociado a A2143G). No se encontró ninguna otra mutación asociada con la resistencia fenotípica. Se desarrolló una técnica de amplificación genómica a tiempo real (PCR-tr) dirigida sobre una región del gen *ureA*. La PCR-tr detectó *H. pylori* en 90 (45%) de las 199 muestras en las que se ensayó, frente a 81 (41%) detectadas mediante cultivo y 64 (32%) mediante test de la ureasa rápida. Esta técnica permitió además una cuantificación normalizada de la carga bacteriana que fue significativamente mayor en aquellas muestras en las que se detectó el microorganismo por más de un método. Esta técnica no resultó útil sobre una muestra no invasiva, el exudado faríngeo. Por último, se desarrolló una técnica de detección genómica de la mutación A2143G (la más frecuentemente asociada a resistencia) mediante análisis de discriminación de polimorfismos en un único nucleótido. Se ensayó sobre 135 pacientes con una concordancia del 94% con respecto a la sensibilidad fenotípica. Según los datos de esta tesis, aunque la incidencia de *H. pylori* parece disminuir, las resistencias a los fármacos aumentan, por lo que es fundamental su control. Teniendo en cuenta las ventajas de las técnicas moleculares, se debe seguir incidiendo en su aplicación sobre muestras no invasivas, así como en el desarrollo de nuevas técnicas de detección de resistencia a antibióticos o factores de virulencia.

Helicobacter pylori infection is one of the most prevalent worldwide and is mainly related to digestive pathology. In recent years its incidence tends to decrease in Western countries although the increase of antimicrobials resistance starts to be a problem. From the microbiological point of view, classic methods of diagnosis are culture and rapid urease test, methods that have their limitations in terms of response time and sensitivity, respectively. Molecular techniques have shown good results, both in the diagnosis of the infection and in the prediction of resistance to antimicrobials. In this work, 3426 patients were studied over a period of 13 years (2004-2016) to determine the infection rate and the antimicrobial resistance profile of *H. pylori*. The infection rate



was 47% and it decreased significantly during the study period from 63% at the beginning to 37%. It was significantly higher among patients with ulcer disease. Of 1439 isolates, 19% were resistant to clarithromycin, 40% to metronidazole and 17% to levofloxacin, and these percentages were maintained during the study period. Just 1% of the isolates were resistant to these drugs. Clarithromycin resistance was significantly higher among women while metronidazole was higher in patients younger than 70 years. On the other hand, resistance to levofloxacin increases with the age of the patients. In order to know the genomic clarithromycin resistance, a fragment of 23S rRNA gene was sequenced in 63 strains, 38 phenotypically resistant and 25 susceptibles. In 31 (82%) of the resistant strains, previously described mutations related to resistance to clarithromycin were detected: A2143G in 27, A2142C in 1, A2142G in 1 and T2182C in 7 (5 of them associated with A2143G). No other mutation associated with phenotypic resistance was found. A real-time amplification technique (rt-PCR) on a region of the *ureA* gene was developed. This rt-PCR detected *H. pylori* in 90 (45%) of the 199 samples in which it was tested, compared to 81 (41%) detected by culture and 64 (32%) using rapid urease test. This technique also allowed a standardized quantification of the bacterial load that was significantly higher in those samples in which the microorganism was detected by more than one method. This technique was not useful in non-invasive sample, the pharyngeal exudate. Finally, a genomic technique for detection of A2143G mutation (the most frequently associated with clarithromycin resistance) was also developed using analysis of a single nucleotide polymorphisms. It was tested on 135 patients with 94% concordance compared with phenotypic susceptibility. According to this thesis data, although the incidence of *H. pylori* seems to decrease, the resistance to the drugs increases, so its control is really important. Taking into account the advantages of molecular techniques, we should continue to focus on its application on non-invasive samples, and on the development of new techniques to detect resistance to antibiotics or virulence factors as well.

A mi familia

Agradecimientos

Son muchas las personas que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral, tanto académica como personalmente, a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A los Dres. Marta E. Álvarez y Santiago Melón, por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección; por compartir su experiencia y conocimientos e implicarse en ella como si fuese propia.

A la Dra. María de Oña, por acogerme en el mundo de la Microbiología y alentarme siempre en el objetivo de llegar a ser Doctora.

Al personal del Servicio de Digestivo del Hospital San Agustín de Avilés por su inestimable colaboración y asesoramiento.

Al personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital San Agustín de Avilés, donde prácticamente he realizado mi segunda residencia y en especial al personal de micobacterias, que con su trabajo diario me han permitido disponer de los datos microbiológicos: a Henar, que me dió la idea para esta tesis y a Elena, Inés y Ana que han colaborado todo lo que estaba en su mano en el desarrollo de la misma.

Al personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de Asturias, los que formaron parte, a los que tengo que agradecer mi formación como microbióloga; y los que la forman actualmente, por ponerme las cosas fáciles para poder finalizar esta tesis. A todos, gracias por su cariño, confianza y apoyo constante. Gracias en especial al personal de Virología por facilitarme todos los medios a su alcance para realizar este trabajo, gracias a Ana por dedicar también parte de su tiempo a este proyecto.

A mis compañeras de Doctorado, a Lucía y Zulema, por animarme, apoyarme y ayudarme con los trámites burocráticos.

A mis amigos, por animarme, entender y soportar mis ausencias.

A mi familia, por todas las horas robadas, por animarme y ayudarme siempre en todo lo que estaba en vuestra mano.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Historia y epidemiología de la infección por Helicobacter pylori</i>	1
1.2. <i>Clínica de la infección</i>	3
1.3. <i>Características microbiológicas de H. pylori</i>	6
1.4. <i>Mecanismos de patogenicidad</i>	8
1.4.1. Factores que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica	8
1.4.2. Factores que contribuyen al daño de la mucosa gástrica	11
1.5. <i>Métodos diagnósticos</i>	13
1.5.1. Métodos invasivos	13
1.5.2. Métodos no invasivos	15
1.6. <i>Tratamiento de la infección por H. pylori</i>	17
1.6.1. Indicaciones del tratamiento erradicador.....	17
1.6.2. Antimicrobianos y vacunas	18
1.6.3. Pautas de tratamiento.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
3.1. <i>Pacientes y muestras</i>	29
3.1.1. Estudio epidemiológico.....	29
3.1.2. Determinación genotípica de resistencias y ensayos moleculares	30
3.2. <i>Métodos</i>	32
3.2.1. Técnicas fenotípicas	32
3.2.1.1. Test de la ureasa rápida.....	32
3.2.1.2. Cultivo de la biopsia gástrica	32
3.2.1.3. Estudio de sensibilidad fenotípica	33
3.2.2. Técnicas genotípicas	34
3.2.2.1. Extracción genómica.....	34
3.2.2.2. Técnicas de detección genómica.....	35
3.2.2.3. Secuenciación	39

3.3. Análisis estadístico.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	45
4.1.1. Prevalencia de la infección	45
4.1.2. Resistencias fenotípicas	47
4.2. Estudio genotípico de resistencias.....	53
4.3. Técnicas de detección genómica.....	55
4.3.1. Diagnóstico mediante detección genómica	55
4.3.1.1. Especificidad de la PCR-tr y límite de detección	55
4.3.1.2. Aplicación de la PCR-tr de diagnóstico a muestras clínicas.....	57
4.3.1.3. Aplicación de la PCR-tr en una muestra no invasiva.....	58
4.3.1.4. Análisis de la carga bacteriana	59
4.3.2. Detección genómica de resistencia a claritromicina por discriminación génica.....	63
5. DISCUSIÓN	65
6. CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	83

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CH	Claritromicina
CH-R	Resistentes a claritromicina
CH-S	Sensibles a claritromicina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
EIA	<i>Enzyme immune assay</i> (enzimoinmunoensayo)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comité Europeo de pruebas de sensibilidad antibiótica)
EUGD	Enfermedad ulcerosa gastroduodenal
HDA	Hemorragia digestiva alta
IARC	Internationa Agency Research of Cancer (agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
LIPA	<i>Line Probe Assay</i> (Ensayos de hibridación reversa sobre tiras de nitrocelulosa)
LV	Levofloxacino
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i> (Linfoma asociado a mucosas)
MZ	Metronidazol
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open reading fragments</i> (fragmentos abiertos de lectura)
PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i> (Proteínas de unión a penicilina)
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)

PCR-tr	<i>Real time polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)
SNP	<i>Single nucleotide polymorfism</i> (polimorfismos de nucleótido único)
TUA	Test de la ureasa en aliento
TUR	Test de la ureasa rápida
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos diagnósticos de infección por <i>H. pylori</i>	17
Tabla 2. Mutaciones asociadas a resistencia a la claritromicina.	19
Tabla 3. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio.	29
Tabla 4. Distribución de cepas y muestras seleccionadas para el estudio de resistencias.	30
Tabla 5. Distribución de los individuos incluidos en el estudio genotípico de resistencias.	31
Tabla 6. Muestras incluidas en cada apartado del estudio.	31
Tabla 7. Cebadores y sondas para la PCR-tr de <i>H. pylori</i> y β -globina humana.	36
Tabla 8. Cebadores y sonda utilizados en la detección de resistencia genómica a CH	37
Tabla 9. Reactivos utilizados en las reacciones de amplificación genómica.....	38
Tabla 10. Perfiles térmicos aplicados en las reacciones de amplificación	39
Tabla 11. Mezcla y condiciones de reacción para la PCR previa a la secuenciación.	40
Tabla 12. Mezcla y condiciones de reacción para la secuenciación.	41
Tabla 13. Evolución de los aislamientos de <i>H. pylori</i> desde 2004 hasta 2016.	45
Tabla 14. Aislamientos de <i>H. pylori</i> en el período 2004-2016.	46
Tabla 15. Resistencias fenotípicas de <i>H. pylori</i> (2004 y 2016).	48
Tabla 16. Porcentaje de resistencia según el sexo y la edad de los pacientes.....	49
Tabla 17. Mutaciones relevantes.	53
Tabla 18. Relación de los cambios asociados a resistencia a claritromicina y la CMI.	54
Tabla 19. Poblaciones mixtas.	54
Tabla 20. Especificidad y sensibilidad de la PCR-tr.....	56
Tabla 21. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> según los criterios de erradicación.	57
Tabla 22. Concordancia entre test diagnósticos.....	58
Tabla 23. Carga bacteriana en función de la clínica, el sexo y la edad.....	59
Tabla 24. Mutaciones encontradas por secuenciación y mediante SNPs.....	63
Tabla 25. Comparación de la sensibilidad fenotípica y genotípica.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia global de <i>Helicobacter pylori</i>	2
Figura 2. Cascada de Correa de la patología gástrica.	4
Figura 3. Formas helicoidales y cocoides de <i>H. pylori</i>	7
Figura 4. Genoma de <i>Helicobacter pylori</i>	8
Figura 5. Mecanismos de patogenicidad de <i>H. pylori</i>	9
Figura 6. Estructura del gen <i>vacA</i> y diversidad alélica.	11
Figura 7. Métodos de diagnóstico basados en la actividad ureasa.	14
Figura 8. Pautas de tratamiento de <i>H. pylori</i>	22
Figura 9. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio.....	30
Figura 10. Pruebas de identificación de <i>H. pylori</i>	33
Figura 11. Fundamento y resultados de la metodología de discriminación génica.....	36
Figura 12. Dominio V de la subunidad 23S ARNr de <i>H. pylori</i>	37
Figura 13. Gel de agarosa.....	41
Figura 14. Evolución de los aislamientos de <i>H. pylori</i>	45
Figura 15. Aislamientos de <i>H. pylori</i> según la clínica, el sexo y la edad.	46
Figura 16. Aislamientos de <i>H. pylori</i> según los criterios de erradicación.....	47
Figura 17. Porcentaje de resistencia fenotípica a los antibióticos (2004-2016)	48
Figura 18. Tasa de resistencia de <i>Helicobacter pylori</i> según la clínica, el sexo y la edad.....	50
Figura 19. Tasa de resistencias múltiples de <i>Helicobacter pylori</i>	51
Figura 20. Distribución de CMI para cada antibiótico según el sexo y la edad.	52
Figura 21. Secuencia de una cepa con población mixta.	54
Figura 22. Diluciones de los controles para construir la curva estándar.	56
Figura 23. Curva estándar de carga bacteriana.....	57
Figura 24. Biopsias con <i>Helicobacter pylori</i>	58
Figura 25. Carga bacteriana de <i>H. pylori</i> según los criterios de erradicación, sexo y edad.....	60
Figura 26. Comparación de la carga bacteriana media según los distintos test diagnósticos.	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia y epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

La presencia de bacterias en el estómago y su posible relación con enfermedades gástricas comenzó a estudiarse tanto en humanos como en animales a finales del siglo XIX. Sin embargo, no se llegó a probar esta relación y durante años estos microorganismos se consideraron flora saprofítica que invadía la mucosa gástrica, hasta que a finales del siglo XX se logró demostrar la existencia e implicación clínica de *Helicobacter pylori*.

La relevancia de la infección por *H. pylori* es reconocida en 2005 al concederse el Premio Nobel de Medicina a B.J. Marshall y J. R. Warren por el descubrimiento de este microorganismo y su relación con la gastritis y las úlceras gastroduodenales. En un estudio prospectivo llevado a cabo en el año 1981 en Australia, Marshall y Warren habían logrado visualizar bacterias helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica en el 98% de los pacientes con gastritis crónica y en el 80% de los pacientes con úlcera gástrica (Marshall & Warren 1984). Además, consiguieron cultivar estas bacterias en las condiciones que habían sido descritas para el cultivo de *Campylobacter spp.* aumentando el tiempo de incubación (Skirrow 1977; Warren & Marshall 1983). En 1985 Marshall demuestra que este microorganismo cumple los postulados de Koch al ingerirlo él mismo, provocándose una gastritis, hecho repetido por Morris en 1987 (Marshall et al. 1985; Morris & Nicholson 1987). Al microorganismo aislado se le dio el nombre de *Campylobacter pyloridis*. En 1987 se adaptó la nomenclatura a las formas gramaticales latinas correctas tomando el nombre de *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin 1987). En 1989, estudios de secuenciación de la región 16S del ARN ribosómico demostraron que esta especie era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas y pasó a denominarse *Helicobacter pylori* (Goodwin et al. 1989). El primer trabajo en el que se describe el aislamiento de *H. pylori* en España se publica en 1985 (López-Brea et al. 1985).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS clasificó a *H. pylori* como carcinógeno de clase I en 1994, con evidente relación con el cáncer gástrico y cuya erradicación se considera como una estrategia para prevenir esta neoplasia (International Agency for Research on Cancer 2014).

Helicobacter pylori es hoy en día uno de los patógenos más prevalentes a nivel mundial. Se estima que esta infección afecta aproximadamente al 50% de la población, constituyendo un importante problema de salud pública (Hunt et al. 2011). La prevalencia es más elevada en países en vías de desarrollo y con menor nivel socio-económico y sanitario, alcanzando el 70% en África, 66% en Asia o 69% en Sudamérica, siendo menor en América del Norte (37%) y los países del Oeste de Europa (34%), aunque hay excepciones dentro de estas zonas, como es el caso de Portugal, con una prevalencia aproximada del 85% (Figura 1). Dentro de cada país, la prevalencia también varía en función del nivel socio-económico de la población. En España la prevalencia global es del 55% (Hooi et al. 2017).

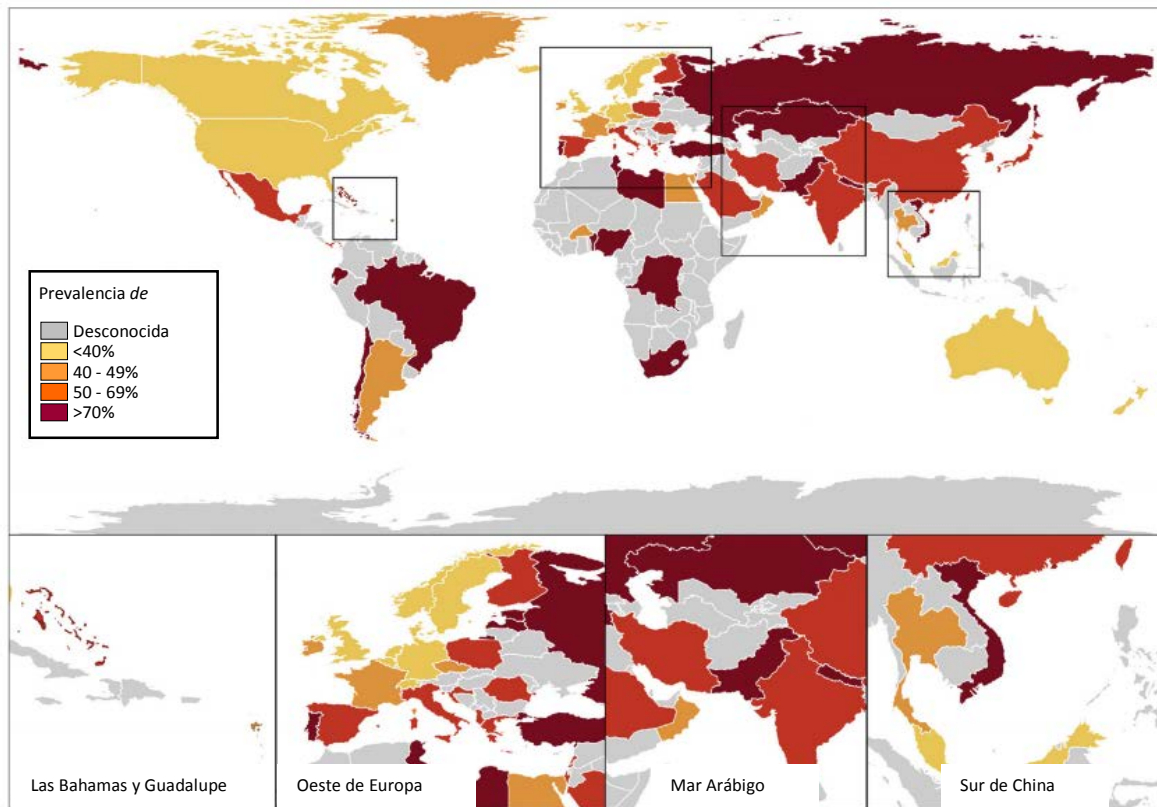


Figura 1. Prevalencia global de *Helicobacter pylori*. Tomado de Hooi et al. 2017.

Desde comienzos del siglo XXI la prevalencia de *H. pylori* ha ido disminuyendo en los países industrializados del mundo Occidental: del 43% en América del Norte antes del año 2000 hasta el 27% después, o del 49% en Europa antes del año 2000 al 39% después (Hooi et al. 2017).

1.2. Clínica de la infección

El principal reservorio de *H. pylori* es el estómago humano y, aunque existe consenso acerca de la vía de entrada (la boca), no se conoce el mecanismo exacto de transmisión. Algunas evidencias hacen sospechar que puede transmitirse a partir de una fuente ambiental común o directamente de persona a persona (lo que parece más probable) a través de diferentes vías no excluyentes entre sí: la vía fecal-oral, la vía oro-oral y la vía gastro-oral.

La infección por se produce generalmente en la infancia colonizando la mucosa gástrica y produciendo una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida, o ser el punto de partida para el desarrollo de úlcera gástrica, úlcera duodenal o neoplasia gástrica. Factores genéticos, ambientales o factores de patogenicidad de la propia bacteria afectan al desarrollo de la enfermedad en cada individuo (Mishra 2013).

Se admite que la infección por *H. pylori* no sólo está relacionada directamente con la enfermedad ulcerosa gastroduodenal, el carcinoma gástrico y el linfoma MALT gástrico, sino que, sin conocerse bien los mecanismos patogénicos, puede ser causa de anemia ferropénica, púrpura trombocitopénica o déficit de vitamina B₁₂. Además, *H. pylori* ha intentado relacionarse con otras enfermedades digestivas y extradigestivas como enfermedades hepato biliares, cardiovasculares, neurológicas o dermatológicas.

Enfermedades asociadas con *Helicobacter pylori* con evidente relación patogénica

Gastritis crónica

La mayoría de los pacientes tras un episodio de gastritis aguda (probablemente en la infancia y habitualmente no diagnosticado) desarrollan una gastritis crónica activa de extensión e intensidad variable que se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica con linfocitos y células plasmáticas, así como la presencia de folículos linfoides (Versalovic 2003). La colonización de *H. pylori* se puede limitar al antro produciendo una gastritis crónica predominantemente antral que cursa con hipersecreción ácida favoreciendo el desarrollo de úlceras duodenales, o puede predominar en el corpus gástrico cursando con hiposecreción ácida y favoreciendo el desarrollo de úlceras gástricas y la evolución a metaplasia y adenocarcinoma (Correa & Piazzuelo 2012). Por último, la gastritis crónica también puede ser difusa (pangastritis o gastritis multifocal).

Enfermedad ulcerosa gastroduodenal

La infección por *H. pylori* es la principal causa de las úlceras pépticas gástricas y duodenales. Entre un 15 y un 20% de los individuos infectados desarrollan una úlcera gástrica o duodenal. La prevalencia de la enfermedad ulcerosa gastroduodenal relacionada con *H. pylori* ha disminuido en las últimas décadas, aumentando la relacionada con un aumento en el consumo de AINEs (Musumba et al. 2012). Tras la erradicación de la infección por *H. pylori* la recurrencia de la enfermedad ulcerosa y sus complicaciones es prácticamente inexistente (Jin & Li 2007).

Linfoma gástrico asociado a mucosa (MALT)

En el 90% de los pacientes con linfoma MALT gástrico de bajo grado se detecta infección por *H. pylori*, siendo este microorganismo la principal causa de estos linfomas. Esta relación causal se refuerza por la regresión histológica de la mayoría de los linfomas en estadios iniciales (75-85%) tras la erradicación de *H. pylori* (Fukui et al. 2004). De hecho, la erradicación de este microorganismo constituye el tratamiento de primera línea en estos pacientes.

Adenocarcinoma gástrico

La infección por *H. pylori* es el principal factor de riesgo y la causa más frecuente de carcinoma gástrico no cardial, la quinta neoplasia maligna más frecuente, encontrándose en el 90% de estos pacientes (Moss 2017). El riesgo de cáncer gástrico es hasta 20 veces superior en población infectada por *H. pylori* e incluso más en poblaciones infectadas por las cepas bacterianas más agresivas. Se admite que la infección por *H. pylori* produce cáncer gástrico a través de la denominada cascada de Correa (Figura 2) (Correa & Piazuolo 2012). La erradicación de *H. pylori* reduce el riesgo de cáncer gástrico si se produce antes de la aparición de metaplasia (Chen et al. 2016).

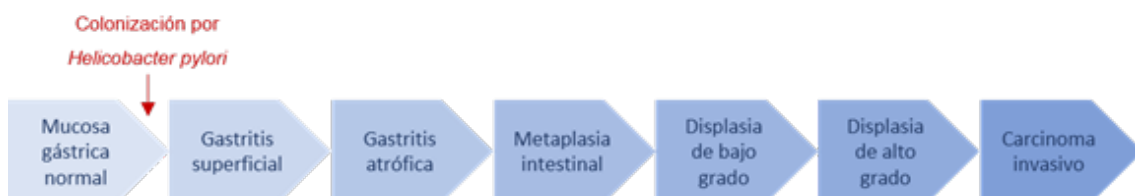


Figura 2. Cascada de Correa de la patología gástrica.

Enfermedades con relación patogénica no bien establecida pero con beneficio del tratamiento erradicador

Anemia ferropénica

Diversos trabajos han demostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y la anemia ferropénica, tanto en niños como en adultos, y un beneficio del tratamiento erradicador (Muhsen & Cohen 2008). Además, teniendo en cuenta que la infección por *H. pylori* es causa reconocida de enteritis linfocítica, la erradicación de *H. pylori* en un paciente con anemia ferropénica puede ayudar a diferenciar si la enteritis se debe a la infección por *H. pylori* o a la enteropatía inducida por gluten (Gisbert et al. 2013).

Dispepsia funcional

El beneficio del tratamiento erradicador en los pacientes con dispepsia funcional sigue siendo motivo de debate (Du et al. 2016), pero se considera en los últimos documentos de consenso como una estrategia terapéutica recomendable, siendo más coste-efectiva en poblaciones con mayor prevalencia de infección por *H. pylori* (Gisbert et al. 2013).

Púrpura trombocitopénica idiopática

Se trata de una entidad de etiología desconocida aunque diversos estudios han observado una correlación entre el incremento de plaquetas y la respuesta al tratamiento erradicador de *H. pylori* (George 2009; Franchini et al. 2010).

Déficit de vitamina B₁₂

En la población con infección por *H. pylori* se han observado bajos niveles de vitamina B₁₂, así como un incremento en estos niveles tras el tratamiento erradicador (Lahner et al. 2012). Por tanto, en pacientes con déficit de vitamina B₁₂ no explicable por otras causas se recomienda investigar y tratar la infección por *H. pylori* (Gisbert et al. 2013).

Enfermedades sin evidencia de relación patogénica ni beneficio del tratamiento erradicador

Se ha estudiado la relación de *H. pylori* con otras enfermedades digestivas y extradigestivas, pero los resultados no permiten establecer una relación patogénica clara ni beneficio con el tratamiento erradicador: enfermedades cardiovasculares, pulmonares, dermatológicas (urticaria y rosácea), diabetes, enfermedades reumatológicas, enfermedades hepatobiliares, pancreáticas o encefalopatía hepática, enfermedades oculares, neurológicas y patologías crónicas como adenomas y cáncer de colon. También se plantea la relación de la infección por *H. pylori* con una menor incidencia de esófago de Barrett y la posterior evolución a adenocarcinoma faríngeo, así como carcinoma colorectal y otros linfomas (Kuo et al. 2014, Schulz et al. 2014; Testerman & Morris 2014).

1.3. Características microbiológicas de *H. pylori*

El género *Helicobacter*, junto con *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* forman parte de la clase *Epsilonbacteria*, subdivisión *Thibacteria*, división *Proteobacteria* (Cavalier-Smith 2002).

H. pylori es un bacilo gramnegativo de 0,5-1,0 µm de ancho por 2,5-4 µm de largo, curvo y microaerófilico (Marshall & Warren 1984; Goodwin et al. 1989). Posee entre 4 y 8 flagelos monopolares recubiertos por una vaina de estructura lipídica que los protege frente a la degradación por el medio ácido (Goodwin et al. 1989). Tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica, aunque en cultivos antiguos o sometido a condiciones menos favorables adopta formas cocoides viables pero no cultivables (Figura 3) (Sarem & Corti 2016). Es considerada una bacteria exigente ya que requiere medios suplementados para su crecimiento.

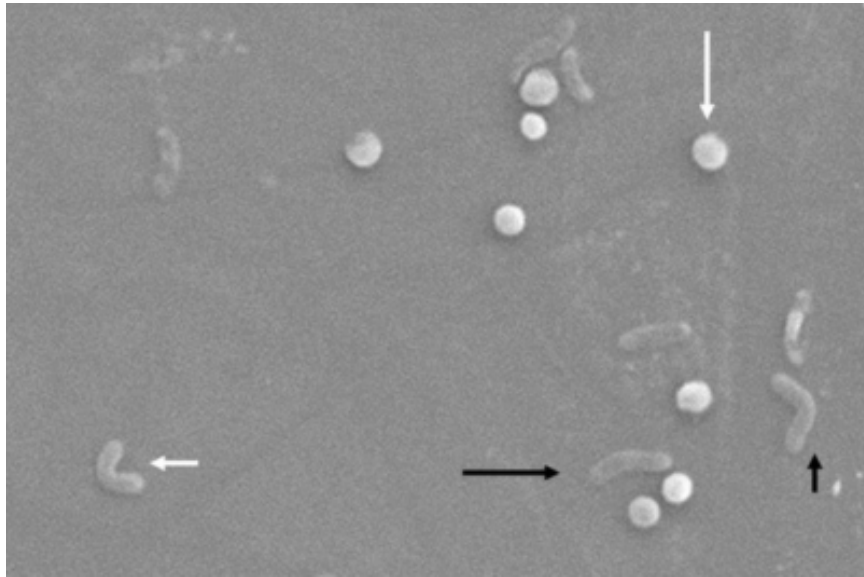


Figura 3. Formas helicoidales y cocoides de *H. pylori*. Tomada de Sarem & Corti 2016.

Con respecto a su metabolismo, a pesar de ser un microorganismo microaerófilico, *H. pylori* es capaz de metabolizar la glucosa (único carbohidrato que utiliza) tanto por la vía oxidativa como por la fermentativa. Además de la vía metabólica de Entner-Doudoroff posee las vías de pentosa fosfato y el ciclo de ácidos tricarboxílicos. En cuanto a sus requerimientos metabólicos, todas las cepas necesitan los siguientes aminoácidos: arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina (Marais et al. 1999). No hidrolizan la gelatina, el almidón, la caseína o la tirosina, y son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativos. Presenta actividad oxidasa, catalasa y ureasa, siendo esta última su característica bioquímica más destacada. Aunque *H. pylori* es muy homogéneo en cuanto a las características bioquímicas utilizadas para el diagnóstico en microbiología clínica, presenta variabilidad genética por medio de mutaciones puntuales y recombinación inter e intragenómica, pudiendo producirse la colonización por varias cepas. Es una de las especies más variadas de la biosfera humana (Israel et al. 2001). El genoma tiene un tamaño de 1,6 Mb, con una composición G+C promedio del 39%. Se ha determinado la secuencia de nucleótidos del genoma de dos cepas: *H. pylori* 26695 y J99 comprobándose que el contenido genómico de las cepas variaba (Alm et al. 1999). El genoma posee 1495 marcos abiertos de lectura (ORF) y una isla de patogenicidad *cagPAI* (Figura 4).

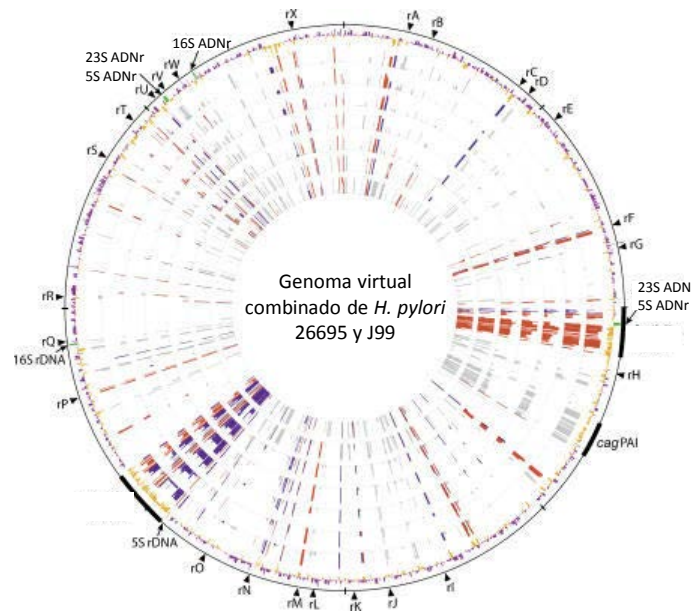


Figura 4. Genoma de *Helicobacter pylori*. Tomado de https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.pH.pylori?img=PMC1245399_pgen.0010043.g001&req=4.

En los últimos años se han identificado otras especies de *Helicobacter* “no-*helicobacter pylori*” que engloban 34 microorganismos de los cuales sólo 14 se relacionan con infecciones en humanos (Powers-Fletcher & Couturier 2015). Algunas de ellas se asocian con gastroenteritis, colangiocarcinoma o bacteriemia: *H. bilis*, *H. cinaedi* o *H. fennelliae* (Malfertheiner et al. 2016). Otras de estas especies zoonóticas (*H. heimanii*, *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. salomois* y *H. suis*) pueden producir enfermedad gástrica en humanos e incluso se han descrito acompañando a *H. pylori* en enfermedad ulcerosa o linfoma tipo MALT, aunque su prevalencia en la población general es menor del 6% (Øverby et al. 2017).

1.4. Mecanismos de patogenicidad

Existen una serie de factores o mecanismos de patogenicidad que permiten a *H. pylori* permanecer y dañar la mucosa gástrica una vez que entra en contacto con el huésped.

1.4.1. Factores que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica

H. pylori es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el medio gástrico, hostil para el crecimiento de la mayoría de las bacterias debido a su pH ácido. Las principales características que permiten

a *H. pylori* colonizar el moco gástrico son la actividad ureasa, la microaerofilia, la forma espiral, los flagelos y las adhesinas (Figura 5).

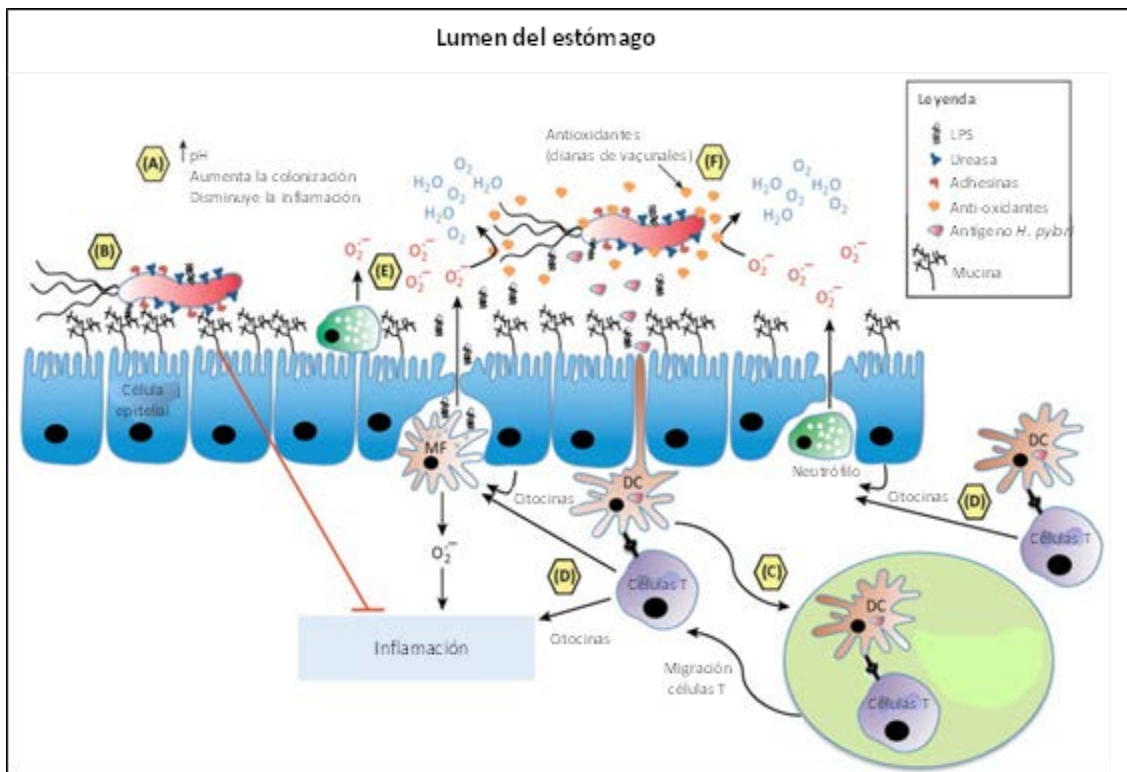


Figura 5. Mecanismos de patogenicidad de *H. pylori*. Tomado de Every 2013.

Ureasa

Es el enzima más abundante producido por *H. pylori*, compuesta por dos subunidades *UreA* y *UreB* y permite regular el pH alrededor de la bacteria (Tomb et al. 1997). La ureasa es una metaloenzima que hidroliza la urea en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido permite neutralizar el medio ácido, aunque un aumento excesivo de amonio sería tóxico para la bacteria. La regulación se produce mediante el transportador *UreI*. El amonio tiene una función importante en la respuesta inmune del huésped, activando los monocitos y linfocitos polimorfonucleares e induciendo la liberación de citocinas, lo que contribuye al daño del epitelio gástrico (Mobley 1996). Además produce una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales, originando una necrosis del tejido profundo, colaborando en el desarrollo de gastritis atrófica crónica y facilitando el incremento de infecciones virales y carcinogénesis.

Sistemas antioxidantes

Helicobacter pylori es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad del oxígeno. La respuesta inflamatoria promovida por la bacteria durante la colonización da lugar a una gran cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno, por lo que *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos (enzima superóxido, la catalasa o peroxidasa, las peroxirredorreductasas, la flavoproteína *MdaB* y el sistema tiorredoxina), así como para la reparación de los daños sufridos (proteínas *RecA*, *UvrABC*, endonucleasa III, *MutS* y *RuvC*) (Cervantes-García 2016).

Motilidad

La motilidad que confieren los flagelos a *H. pylori* es fundamental para colonizar la mucosa gástrica. Cada uno de los flagelos está compuesto por dos flagelinas: FlaA, en el exterior y FlaB, en la base del flagelo. La morfología espiral junto con la producción de una proteasa facilitan también la motilidad en el moco gástrico (Josenhans et al. 1995).

Proteínas de membrana externa

La adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica es de gran importancia tanto para la colonización inicial como para la persistencia de la bacteria. Existen distintas familias de proteínas de membrana externa implicadas en este proceso:

- *Bab-A (blood antigen binding adhesion)*: interactúa con las células del epitelio gástrico a través de los antígenos de Lewis B. La unión promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de anti-anticuerpos, lo que contribuye a la gastritis crónica, al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Olfat et al. 2005).
- *H. pyloriaA (Helicobacter pylori adhesin A)*: media la unión a glicoconjugados con ácido siálico presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y de los neutrófilos. Está codificada por el gen *H. pyloriaA*. Es un antígeno reconocido por anticuerpos y estimula la proliferación de linfocitos T y B (Nyström & Svennerholm 2007).
- *SabA (sialic acid binding adhesión)*: se une a los receptores del ácido siálico de los neutrófilos estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (Yamaoka 2010).

- *OipA* (*outer membrane inflammatory protein*): aunque todas las cepas poseen el gen *oipA*, no todas expresan esta adhesina. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8 (Yamaoka et al. 2000).

1.4.2. Factores que contribuyen al daño de la mucosa gástrica

Citotoxina vacuolizante *VacA*

Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA*, que codifica una toxina que se expresa en el 50-60% de las cepas (Cervantes-García 2016). La toxina *VacA*, compuesta por dos subunidades p33 y p55, se une a las células del huésped e induce una vacuolización mediante la formación de canales selectivos de aniones. Además, *VacA* parece desencadenar la cascada apoptótica afectando directamente a la función mitocondrial e induciendo la liberación de citocromo C (Palframan et al. 2012). También puede activar el receptor Fas/CD95 relacionado con la ruptura de la membrana mitocondrial; aumentar la expresión de ciclooxigenasa 2, y, por tanto, del factor de crecimiento vascular endotelial, relacionado con carcinomas; e interrumpir la maduración de los fagosomas en los macrófagos, lo que permite a la bacteria sobrevivir dentro de ellos (Cover & Blanke 2005).

Existe una diversidad de secuencias significativa en los genes *vacA* de las distintas cepas de *H. pylori*, identificándose el polimorfismo en tres regiones variables: región de secuencia de señal (alelos s1, s2 y subtipo), región media (alelos m1, m2 y subtipos) y región intermedia (alelos i1 y i2). Se ha observado que los tipos s1/m1 son más agresivos, los tipos s1/m2 son menos tóxicos y los tipos s2/m2 no poseen actividad tóxica. Con respecto a la región intermedia, las cepas con la presentación i1 son más citotóxicas y se encuentran asociadas con la estructura alélica s1m1 (Figura 6) (Rhead et al. 2007; Cervantes-García 2016)

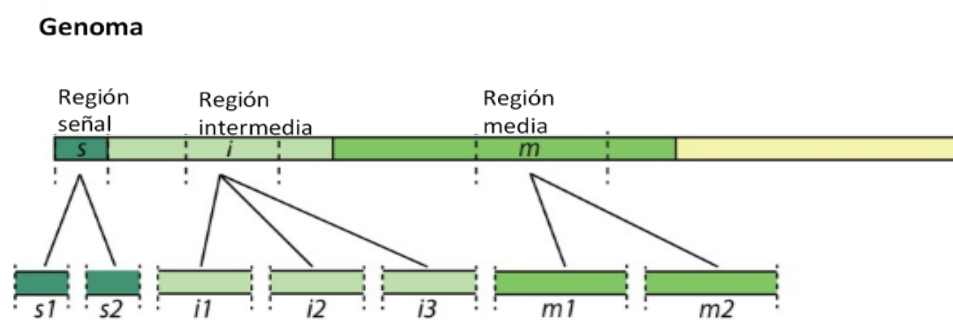


Figura 6. Estructura del gen *vacA* y diversidad alélica.

Isla de patogenicidad *cagPAI*

Es un elemento de inserción de ADN de 40 kb con un contenido G+C del 35% y 27 ORF. Está flanqueada por secuencias repetidas directas de 31 pb. No se expresa constitutivamente, sino que responde a señales ambientales tales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, la presencia de ácidos grasos de cadena corta, etc. La *cag PAI* es un determinante de virulencia de *H. pylori* bien caracterizado presente en el 60-70% de las cepas de *H. pylori* occidentales y, virtualmente, el 100% de las cepas de Asia Oriental. Aunque todas las cepas de *H. pylori* inducen gastritis, las cepas que albergan el *cagPAI* (*cag* +) aumentan el riesgo de atrofia, displasia y adenocarcinoma gástrico. La *cagPAI* codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta moléculas efectoras bacterianas en las células epiteliales gástricas del huésped. Se describe una asociación entre la presencia de *cagA* y *vacA s1*, siendo estas cepas más virulentas (Noto et al. 2012).

Citotoxina *CagA*

Es el factor de virulencia más estudiado. Se localiza en el final de la isla de patogenicidad y se considera un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad *cagPAI*. Se asocia con síntomas graves como gastritis severa, atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico. La diana de *CagA* más estudiada es la fosfatasa SH. PYLORI-2, relacionada con la carcinogénesis gástrica. *CagA* varía de tamaño entre las distintas cepas, debido a la variación de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxi-terminal, conocida como "EPIYA motif". Diferencias en la secuencia de EPIYA muestran variabilidad geográfica y patogénica (Evans & Evans 2001; Chomvarin et al. 2008).

Otros factores de patogenicidad

- Proteína activadora de neutrófilos (NAP): tiene función de bacterioferritina para captar iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el ADN. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o expresa en la superficie bacteriana.
- Fosfolipasas: actúan como proteasas, degradando el complejo lípido-gluco-proteico de la capa de moco que cubre las células del epitelio gástrico.

- Lipopolisacárido (LPS): es un factor de virulencia de baja toxicidad comparado con otras bacterias gram negativas, pudiendo explicarse así la capacidad de *H. pylori* para evitar provocar una respuesta inmunológica eficaz del huésped y producir una infección crónica. Puede modular la actividad del pepsinógeno I en el estómago, afectando a la integridad de la mucosa.

- Tip α (*THF- α inducing protein*): tienen potente actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF- α y la activación de NF- κ B.

- Otras enzimas: mucinasas, lipasas, proteasas o dismutasas favorecen la virulencia de la bacteria y la protegen de metabolitos tóxicos.

1.5. Métodos diagnósticos

El diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* puede realizarse mediante métodos invasivos, que implican la realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica; o métodos no invasivos. Todos los métodos tienen sus ventajas y limitaciones y la elección de uno u otro se hace en función de su coste, disponibilidad, objetivo del diagnóstico (epidemiológico, diagnóstico o seguimiento) y la prevalencia de la infección en la zona (Pourakbari et al. 2013; Gisbert et al. 2016).

1.5.1. Métodos invasivos

Se obtienen una o más muestras de biopsias de la mucosa gástrica para valorar la presencia de *H. pylori* mediante la detección de su actividad ureasa, la visualización de las tinciones histológicas o mediante su cultivo. El cultivo microbiológico permite además realizar un estudio de sensibilidad a antibióticos. En los últimos veinte años se han desarrollado técnicas que detectan el genoma bacteriano para el diagnóstico y detección de genes de resistencia o patogenicidad de *H. pylori* (Cambau et al. 2009; Tamayo et al. 2017).

Test de ureasa

Se basa en la presencia de ureasa de *H. pylori*. En los test clásicos se coloca la biopsia en un tubo con urea con un indicador de pH; si la muestra contiene *H. pylori* el pH aumenta y la alcalinización del medio produce un cambio de color. El resultado se obtiene a las 24-48 horas. Existen también pruebas en las que la reacción tiene lugar en una tira reactiva y el resultado se

obtiene en 1 hora, con sensibilidad y especificidad similares (90 y 95% respectivamente) (Figura 7).



Figura 7. Métodos de diagnóstico basados en la actividad ureasa.

El resultado de los test de ureasa depende de la carga bacteriana, necesitándose un mínimo de 10^5 microorganismos por biopsia para obtener un resultado positivo. En controles post-tratamiento la sensibilidad disminuye hasta un 60% debido a la baja carga bacteriana, lo mismo que ocurre en pacientes con hemorragia digestiva por ulcus péptico (Uotani et al. 2015).

Histología

La histología permite visualizar directamente la bacteria en el tejido, así como determinar el daño histológico, valorándose el grado de gastritis, metaplasia o atrofia. Se utilizan distintas tinciones como Giemsa, hematoxilina-eosina o Warthin-Starry con nitrato de plata (Uotani et al. 2015). Se recomienda la obtención de tres biopsias (curvatura mayor del cuerpo, incisura *angularis* y curvatura mayor del antro) para que la sensibilidad de la histología sea superior al 90% (Chey et al. 2007). Esta técnica no permite distinguir entre *H. pylori* y otras especies del género *Helicobacter* o bacterias con morfología similar (Patel et al. 2013). Técnicas complementarias, como la inmunohistoquímica y la hibridación “*in situ*” (FISH) alcanzan una sensibilidad del 98% y especificidad del 100% (Tajbakhsh et al. 2008).

Cultivo

El cultivo es considerado el método de referencia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* pero necesita medios suplementados para crecer, una atmósfera microaerófila y tiempo de incubación prolongado: se puede tardar entre 5 y 7 días en obtener la cepa. Las mejores muestras para el aislamiento de *H. pylori* son biopsias tomadas del antro y cuerpos anterior y posterior (Mégraud & Lehours 2007). La sensibilidad del cultivo (50-70%) varía en función de la

experiencia del laboratorio donde se realiza (Patel et al. 2014). Su principal ventaja es que se obtiene la cepa, pudiendo realizarse el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como un mejor conocimiento de la bacteria, sus mecanismos de patogenicidad e interacción con el huésped.

Técnicas de detección molecular

Se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia de ADN de *H. pylori* directamente de biopsia gástrica, la mayoría de ellas basadas en técnicas de PCR con alta sensibilidad y especificidad, pero un coste no asumible por todos los laboratorios. Algunas de estas técnicas permiten además la detección de genes de patogenicidad y mutaciones asociadas con resistencia a antibióticos. Estas técnicas se basan en la amplificación de fragmentos de regiones conservadas del genoma de *H. pylori*. La mayoría amplifican un fragmento del gen *ureA*, *ureC*, *Hsp60* o las regiones 16S rRNA o 23S rRNA (Clayton et al. 1991; Belda et al. 2012; Shukla et al. 2011). Existen kits comerciales que se basan en la amplificación genómica seguida de una hibridación sobre tiras de nitrocelulosa (LiPA, Line Probe Assay) (Mégraud & Lehours 2007). La ventaja de las técnicas de biología molecular frente a otros métodos no invasivos es que aumentan la sensibilidad y permiten la cuantificación de la bacteria (Shukla et al. 2011).

1.5.2. Métodos no invasivos

Test de la ureasa en aliento

Es el método de elección tanto para el diagnóstico inicial de la infección como para la comprobación de la eficacia del tratamiento. Es la prueba no invasiva más sensible (96%) y específica (100%) (Gisbert et al. 2003). Se basa en la detección indirecta de la actividad ureasa de *H. pylori* utilizando urea marcada con ^{13}C . Si *H. pylori* se encuentra en el estómago, hidrolizará la urea liberando CO_2 marcado que se absorbe, difunde a sangre, pasa a los pulmones y se elimina por el aliento. Indica una infección actual, por lo que se recomienda su uso para confirmar la erradicación de la infección. Para la realización del test se recomienda aplicar el protocolo europeo, que incluye la administración previa de ácido cítrico, lo que disminuye el riesgo de resultados falsos positivos o negativos. (Gisbert et al. 2013).

Detección de antígeno en heces

Consiste en la detección de antígeno de *H. pylori* en heces utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, presentando estos últimos una eficacia similar al test de la ureasa en aliento (TUA) (Malfertheiner et al. 2012). Se recomienda como alternativa al TUA para el diagnóstico no invasivo de *H. pylori* siempre que se utilice un método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) monoclonal (Gisbert et al. 2013).

Serología

Los métodos serológicos se basan en la detección cuantitativa de anticuerpos frente a *H. pylori*, generalmente IgG en sangre u orina (menos frecuente). Existen distintas técnicas, siendo las más utilizadas los ensayos de inmunoenzimología (EIA). No permiten diferenciar entre infección activa y exposición previa al microorganismo, por lo que no se recomienda su uso para la confirmación de la erradicación tras el tratamiento. Múltiples estudios muestran que la fiabilidad de la serología varía según el método comercial que se emplee y es, en general, inferior a la de otras técnicas diagnósticas, por ello no se recomienda su uso si no se ha validado previamente en la población en la que se va a utilizar (Garza-González et al. 2014). La serología podría ser útil, sin embargo, en situaciones en las que disminuye la sensibilidad de otras técnicas, como en casos de úlceras sangrantes o ante el uso reciente de antibióticos o IBPs. Su uso también es justificable en el improbable caso de que no se disponga de ninguna otra prueba diagnóstica y siempre que se haya realizado una validación local del método comercial utilizado (Gisbert et al. 2013).

Otros métodos no invasivos

Se han tratado de encontrar muestras no invasivas en las que se pueda cultivar *H. pylori*, como el jugo gástrico, que no ha resultado ser una buena muestra porque disminuye la sensibilidad del cultivo al 60% o las heces, que tienen el inconveniente que la mayoría de las formas de *H. pylori* excretadas son formas cocoides siendo difícil su cultivo (Kabir 2001; Falsafi et al. 2007; Mégraud & Lehours 2007). Las técnicas moleculares, sin embargo, han demostrado mejores resultados aplicadas sobre heces, puesto que no se necesita que el germen sea viable (Rimbara et al. 2013), sobre jugo gástrico o incluso sobre saliva (Kabir 2001). Sin embargo, el uso de estas muestras no invasivas aún no se ha extendido, se necesitan más estudios que prueben su eficacia.

En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas de los distintos métodos diagnósticos.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos diagnósticos de infección por *H. pylori*.

TEST INVASIVOS	Ventajas	Inconvenientes
Test de la ureasa rápida	Barato y rápido. Alta especificidad y selectividad en determinados pacientes.	La sensibilidad se reduce significativamente en pacientes tratados.
Histología	Alta sensibilidad y especificidad.	Caro y requiere infraestructura y personal entrenado.
Cultivo	Alta especificidad. Permite determinar la sensibilidad antibiótica.	Difícil de realizar y no accesible para todos los laboratorios.
PCR	Alta sensibilidad y especificidad. Puede permitir determinar la sensibilidad antibiótica.	Metodología no estandarizada en todos los laboratorios.
TEST NO INVASIVOS	Ventajas	Inconvenientes
Test de la ureasa en aliento (TUA)	Identifica infección activa. Alto VPP y VPN independientemente de la prevalencia de <i>H. pylori</i> . Útil para control de tratamiento.	Precio.
Test de antígeno en heces	Identifica infección activa. Atlo VPP y VPN independientemente de la prevalencia de <i>H. pylori</i> . Útil para control de tratamiento.	Menos validado que el TUA en control post-tratamiento.
Serología	Barato, buen VPN.	El VPP depende de la prevalencia de Hp. No se recomienda como control de tratamiento.

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

La alta prevalencia de la infección por *H. pylori* así como sus implicaciones clínicas, siempre han hecho necesario racionalizar el diagnóstico de la infección y establecer las indicaciones de su tratamiento, aunque en el último consenso de Kioto se establece la gastritis por *H. pylori* como una entidad en sí misma y se recomienda su erradicación en todos los casos (Sugano et al. 2015). Sin embargo, una erradicación indiscriminada podría repercutir en un aumento de las resistencias bacterianas, un elevado coste económico y el riesgo de eliminar cepas que pudieran tener efecto beneficioso para el ser humano.

1.6.1. Indicaciones del tratamiento erradicador

Desde el año 1997 en Europa y 1999 en España se han realizado guías de consenso sobre la infección por *H. pylori*. Durante estos años también se han realizado reuniones de consenso en el resto del mundo: Asia en 1997 y 2009, Latinoamérica en el año 2000 y Canadá en los años 1997 y 2016 (Lam & Talley 1998; Fock et al. 2009; Coelho et al. 2000; Fallone et al. 2016).

El Consenso de Maastrich del año 2005 (Malfertheiner et al. 2005) consideraba que existía una indicación clara de tratamiento erradicador de *H. pylori* en caso de:

- Enfermedad ulcerosa gástrica o duodenal (curada, activa o sangrante).
- Linfoma MALT de bajo grado.
- Gastritis atrófica.
- Después de una resección de un cáncer gástrico.
- En pacientes con antecedentes de familiares de primer grado con cáncer gástrico.
- Si es deseo del paciente tras un examen médico completo.

El penúltimo consenso Español del año 2013 (Gisbert et al. 2013) amplió estas recomendaciones añadiendo:

- Pacientes menores de 55 años con dispepsia no investigada y sin síntomas de alarma.
- Atrofia de la mucosa gástrica o metaplasia intestinal.
- Anemia ferropénica de causa no aclarada.
- Púrpura trombocitopénica idiopática.
- Déficit de vitamina B₁₂ no explicable por otras causas.

1.6.2. Antimicrobianos y vacunas

Claritromicina

La claritromicina, macrólido bacteriostático, es un fármaco de primera línea en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Es el antimicrobiano más potente ya que se absorbe bien en la mucosa gástrica y es estable a pH ácido. Tres mutaciones en la secuencia de la región peptidiltransferasa del ARN ribosómico 23S, A2143G, A2142G y A2142C, son responsables de más del 90% de resistencia a claritromicina (Versalovic et al. 1997) con diferentes tasas de prevalencia según la localización geográfica. La mutación más frecuente en aislamientos clínicos es la A2143G, seguida de la mutación A2142G (De Francesco et al. 2011; Tamayo et al. 2017), aunque se han descrito otras mutaciones menos frecuentes (Tabla 2). Otros mecanismos como bombas de expulsión activa o metilaciones en el ARN también pueden provocar resistencia a claritromicina.

Tabla 2. Mutaciones asociadas a resistencia a la claritromicina.

Mutaciones descritas	
T2182C	Kim et al. 2002; Khan et al. 2004
T2717C	Fontana et al. 2002
C2694A	Rimbara et al. 2008
T2190C, T2195C, A2223G	Kim et al. 2008
A2115G, G2141A, A2144T	De Francesco et al. 2014

La resistencia a claritromicina en Europa ha aumentado desde un 9% hasta un 17,5% en una década (Mégraud et al. 2013; Nishizawa et al. 2014) posiblemente debido al aumento del uso de este antibiótico en el tratamiento de las infecciones pediátricas y respiratorias. En España se ha descrito recientemente una tasa de resistencia del 18% (Tamayo et al. 2017).

Amoxicilina

Es un fármaco de primera línea en el tratamiento de *H. pylori* con potente acción bactericida. Se utiliza en distintas pautas de tratamiento asociado a claritromicina, metronidazol o tetraciclina. Las resistencias a betalactámicos se deben a alteraciones de las PBP, concretamente en el gen *pbp-1*, la reducción de la permeabilidad o a mecanismos de expulsión activa. Otro mecanismo adicional es que la amoxicilina favorece la conversión a formas cocoides (Sarem & Corti 2016). La resistencia de *Helicobacter pylori* a amoxicilina oscila entre el 1,4% en España y 2% en EEUU hasta alcanzar tasas más altas en África y Asia, llegando al 97% en Sudáfrica (Ghotaslou et al. 2015).

Metronidazol

Tercer fármaco de primera línea. Pertenece al grupo de los nitroimidazoles, con actividad bactericida. En *H. pylori* la reducción del metronidazol es mediada por NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno (RdxA), NADPH flavin nitroreductasa (FrxA) y enzimas ferredoxina-like (FrxB) (De Francesco et al. 2011). El principal mecanismo de resistencia a metronidazol se relaciona con una serie de mutaciones en el gen *rdxA*. Otras mutaciones puntuales en los genes *frxA* y *frxB* pueden aumentar la resistencia bacteriana en aquellas cepas que presenten la mutación *rdxA*. Mutaciones en el regulador férrico (Fur) también producen resistencias (Nishizawa et al. 2014). La resistencia a metronidazol se ha mantenido estable en Europa durante

INTRODUCCIÓN

los últimos 14 años, en torno al 35% (Mégraud et al. 2013). El porcentaje de resistencia varía entre países, siendo más alto en los países en vías de desarrollo debido a su uso para tratar enfermedades parasitarias y ginecológicas (John Albert et al. 2006).

Tetraciclinas

Actualmente la doxiciclina es un antibiótico de primera línea con actividad bacteriostática por unión a la subunidad 30S y se combina con sales de bismuto y metronidazol (Pylera®). El mecanismo de resistencia descrito para *H. pylori* consiste en mutaciones puntuales en el gen 16S RNA en las posiciones 965-967 (cambio de AGA por TTC). El nivel de resistencia antibiótica es proporcional al número de cambios en estas posiciones (Gerrits et al. 2002). Otro mecanismo de resistencia propuesto es la reducción de la permeabilidad, ya que algunas cepas resistentes no presentan las mutaciones descritas y muestran una disminución en la acumulación de la tetraciclina. La resistencia a tetraciclinas es baja, por debajo del 2% (Suzuki et al. 2010).

Levofloxacino

Es un fármaco de segunda línea que actúa sobre la enzima ADN girasa. Los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a quinolonas implican mutaciones en la subunidad *gyrA*, concretamente en la región QRDR (Quinolones Resistance-Determining Region) (Matsuzaki et al. 2010). Las mutaciones más frecuentemente descritas en la región QRDR son en los aminoácidos 87 (cambio de Asn por Lys o Tyr) o 91 (Asp por Gly, Asn o Tyr). Otras mutaciones como el cambio en la posición 463 de *gyrB* podrían estar también implicadas en resistencia de *H. pylori* a quinolonas (Rimbara et al. 2012). En relación a la tasa de resistencia a levofloxacino, se ha descrito una alta variabilidad geográfica, desde el 4% de resistencia en Croacia al 28% en Bélgica. En España el porcentaje de resistencia es del 14% (Cuadrado-Lavín et al. 2012; Navarro-Jarabo et al. 2015) y se ha demostrado que se asocia con el consumo de quinolonas (Mégraud et al. 2013).

Rifabutina

Es un fármaco de rescate (cuarta línea) en el tratamiento de *H. pylori* que inhibe la expresión de la subunidad beta de la ARN polimerasa, codificada por el gen *rpoB* (Nishizawa et al. 2011).

La resistencia de *H. pylori* a la rifabutina se debe a mutaciones en ese gen *rpoB* descritas en los codones 149, 524-545 y 586 (Heep et al. 2002). La tasa de resistencia de *H. pylori* a rifabutina es del 1,3% (Gisbert & Calvet 2012).

Vacunas

Aunque aún no se ha aprobado ninguna vacuna eficaz frente a *H. pylori*, sí se están llevando a cabo diversos estudios para su desarrollo, trabajando sobre distintos antígenos (Robinson et al. 2017; Hong et al. 2018). En China una vacuna oral recombinante que se encuentra en fase III ha demostrado una eficacia del 72% (Zeng et al. 2015) y en Estados Unidos una simulación demostró que una vacuna aplicada en la infancia sería coste-efectiva (Rupnow et al. 2009).

1.6.3. Pautas de tratamiento

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan dos o tres antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso que modifica el pH para permitir la actuación del antibiótico. En la IV Conferencia Española de consenso sobre el tratamiento de la infección por *H. pylori* (Gisbert et al. 2016) se actualizan las recomendaciones para el tratamiento (Figura 8), siendo el tratamiento de elección de primera línea una pauta cuádruple concomitante sin bismuto: IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol durante 14 días. No se recomienda la triple terapia clásica (IBP, claritromicina y amoxicilina) si la tasa de resistencia a claritromicina es mayor del 15% (Malfertheiner et al. 2012).

La eficacia del tratamiento erradicador depende de varios factores, siendo el más importante la resistencia antimicrobiana. Otros factores que influyen en el fallo del tratamiento son la falta de adherencia del paciente, la enfermedad gastroduodenal de base, la edad y el tabaquismo.

En la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos influyen factores del huésped tales como la zona geográfica, el consumo previo de antibióticos, el pH gástrico o la respuesta inmunológica del huésped, y factores del microorganismo como las mutaciones genéticas y la morfología, relacionándose la forma cocoide con una mayor resistencia a los antibióticos (Sarem & Corti 2016).

En caso de fallo del tratamiento debe evitarse repetir dos veces el mismo tratamiento, y se recomienda realizar estudios de sensibilidad a los antibióticos. Se ha comprobado que el

tratamiento dirigido tras el estudio de la sensibilidad a los antibióticos mejora la tasa de erradicación de *H. pylori* (Cosme et al. 2012; Sugimoto et al. 2014; López-Góngora et al. 2015)

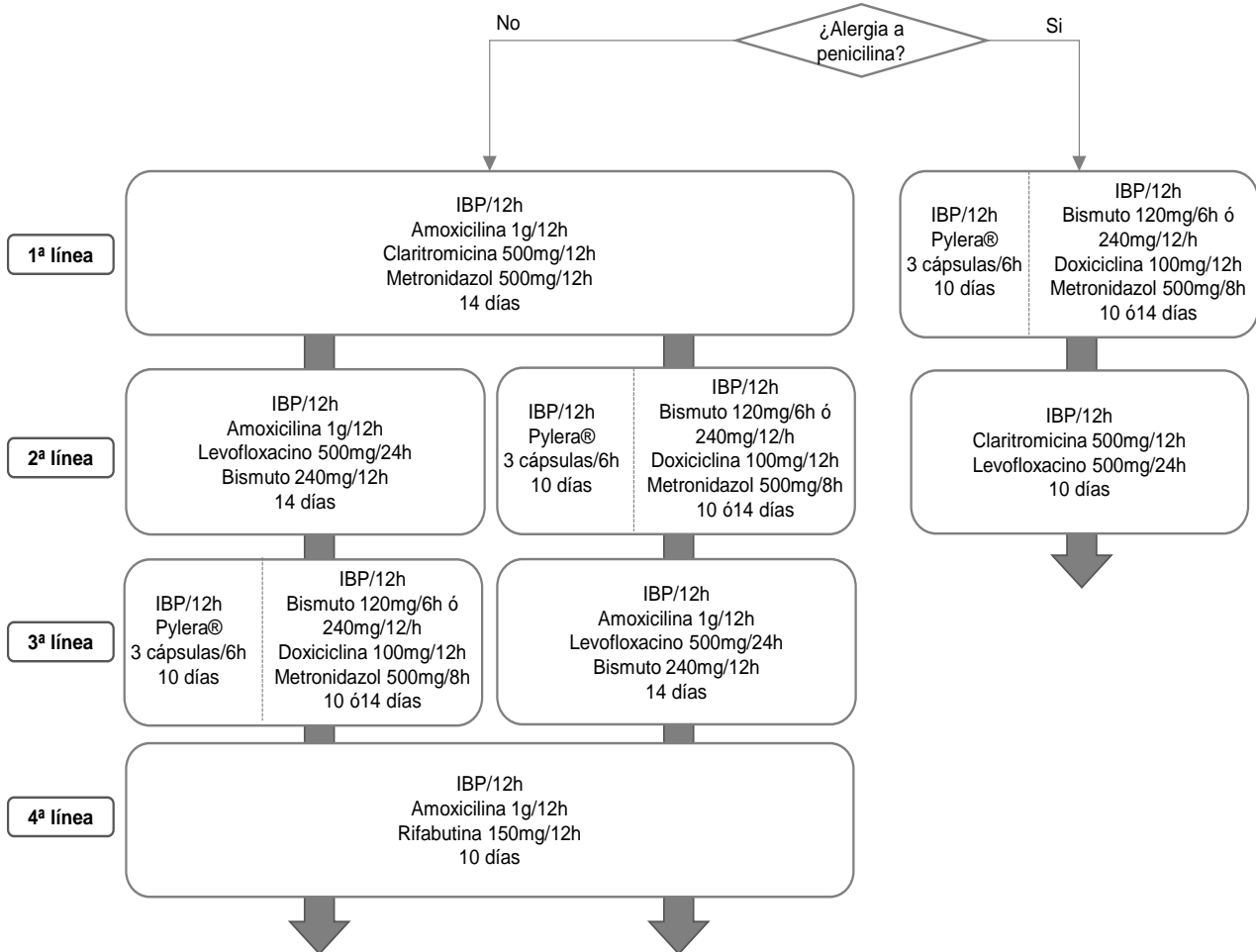


Figura 8. Pautas de tratamiento de *H. pylori* según la IV Conferencia Española de Consenso.

2. OBJETIVOS

Como se ha comentado en el apartado introducción, *Helicobacter pylori* es uno de los patógenos más prevalentes a nivel mundial y provoca patologías como la gastritis crónica activa o la úlcera péptica, que pueden desencadenar linfoma MALT gástrico y cáncer gástrico.

La triple terapia empírica clásica que combina un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina se está viendo comprometida en los últimos años debido al aumento de resistencias antibióticas, por lo que cada vez hay una mayor tendencia al tratamiento dirigido según antibiograma.

Para tomar decisiones adecuadas en cuanto al manejo del paciente es necesario conocer los datos de nuestro entorno.

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* puede realizarse mediante técnicas invasivas o técnicas no invasivas. El cultivo microbiológico se considera el método de referencia permitiendo el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. El problema de este método, además de que se realiza sobre una muestra invasiva, es que es lento y laborioso, debido a los requerimientos de *H. pylori* para su crecimiento.

Las técnicas de detección y amplificación genómica han supuesto un avance en el diagnóstico microbiológico mejorando la sensibilidad del cultivo y la rapidez en la obtención de resultados, no sólo con respecto a la presencia o no del microorganismo, sino también de su perfil de resistencias. Además, podrían aplicarse sobre muestras no invasivas.

Con estas premisas, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Conocer la tasa de infección de *Helicobacter pylori* y su asociación con factores del paciente en un período de 13 años (2004-2016).
2. Analizar el perfil de resistencias fenotípicas a claritromicina, metronidazol y levofloxacino en los aislados de *H. pylori* durante ese período de tiempo (2004-2016).

OBJETIVOS

3. Caracterizar genotípicamente los perfiles de resistencias a claritromicina en los aislamientos de *Helicobacter pylori*.
4. Desarrollar una técnica de detección genómica que permita el diagnóstico y la cuantificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas.
5. Aplicar esta técnica sobre una muestra no invasiva, exudados faríngeos, alternativa a la biopsia gástrica.
6. Diseñar y estandarizar una técnica de detección genómica que permita evidenciar las mutaciones más frecuentemente asociadas con resistencia a claritromicina a partir de muestras de biopsia gástrica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes y muestras

3.1.1. Estudio epidemiológico

Para conocer la tasa de infección y el perfil de resistencias fenotípicas a los antibióticos utilizados en el tratamiento de *Helicobacter pylori* se tomó una muestra de biopsia gástrica de todos los pacientes mayores de 14 años que acudieron a la Unidad de Gastroenterología del Hospital Universitario San Agustín (Avilés) entre enero de 2004 y diciembre de 2016 para realizar una endoscopia. Para evitar falsos negativos se excluyeron aquellos pacientes que habían sido previamente tratados para erradicar *H. pylori*, pacientes que habían tomado IBPs en las dos semanas previas a la endoscopia y pacientes que habían tomado antibióticos en las 4 semanas previas al procedimiento. Las muestras se recogieron en medio de transporte *Portagerm pylori* (BioMérieux, Francia) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su envío al laboratorio en las siguientes 24-48 horas.

En total se incluyeron en el estudio 3426 pacientes con distintas patologías asociadas a la infección por *H. pylori* con una edad media de 55,7±16,9 años (15-94 años). En la Tabla 3 y la Figura 9 se muestran las características clínicas según el sexo y la edad.

Tabla 3. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio según el sexo, la edad y la clínica.

	Total (n=3426)	Sexo		Edad (años)		
		Hombre (n=1686)	Mujer (n=1740)	14-55 (n=1670)	56-70 (n=999)	>70 (n=755)
Enfermedad ulcerosa	1895 (55,3%)	1099 (65,2%)	796 (45,7%)	853 (51,1%)	567 (56,8%)	475 (62,9%)
Úlcera duodenal	616 (18,0%)	388	228	301	179	136
Úlcera (localización desconocida)	357 (10,4%)	188	169	138	106	113
Úlcera gástrica	333 (9,7%)	178	155	114	112	107
Duodenitis erosiva	232 (6,8%)	150	82	142	60	30
Gastritis erosiva	188 (5,5%)	101	87	83	58	47
Enfermedad ulcerosa antigua	169 (4,9%)	94	75	75	52	42
Enfermedad no ulcerosa	1531 (44,7%)	587 (34,8%)	944 (54,3%)	817 (48,9%)	432 (43,2%)	280 (37,1%)
Dispepsia	957 (27,9%)	360	597	569	253	133
Anemia ferropénica	263 (7,7%)	101	162	95	84	84
Antecedentes familiares cáncer gástrico	155 (4,5%)	55	100	75	53	27
Otros criterios/desconocido	122 (3,6%)	61	61	51	37	34
Preoperatorio cirugía bariátrica	26 (0,8%)	7	19	23	3	-
Déficit de B ₁₂	8 (0,2%)	3	5	4	2	2

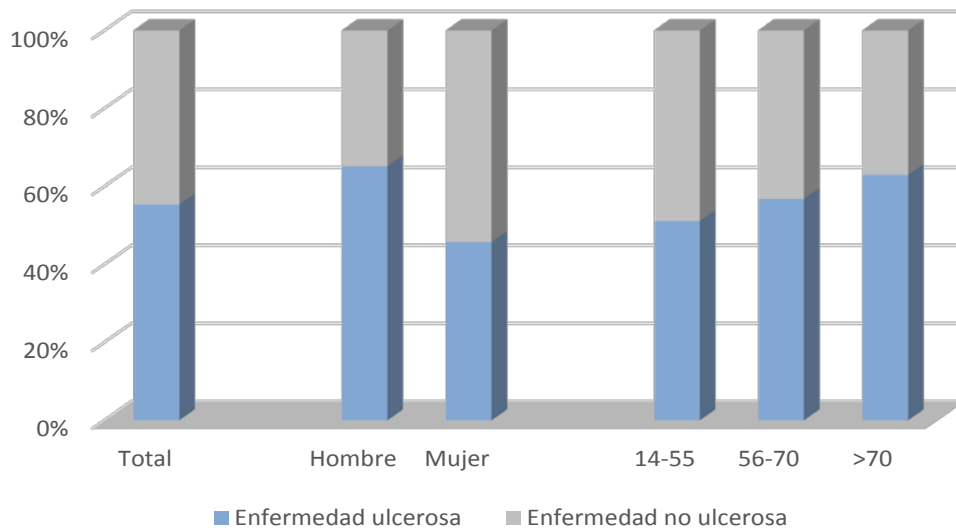


Figura 9. Distribución de los pacientes según el sexo, la edad y la clínica.

En todas las biopsias se llevó a cabo el cultivo convencional y el estudio fenotípico de resistencias cuando se aislaba *H. pylori* según se explicará posteriormente.

3.1.2. Determinación genotípica de resistencias y ensayos moleculares

Para conocer las mutaciones asociadas a resistencia genotípica a claritromicina se seleccionaron 63 pacientes en el período de estudio comprendido entre febrero y diciembre de 2016. En 35 pacientes se estudió la cepa de *Helicobacter pylori* aislada a partir del cultivo, en 24 casos el estudio se hizo tanto a partir de la cepa aislada como de la biopsia gástrica y en 4 individuos el estudio se realizó únicamente a partir de la biopsia (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de cepas y muestras seleccionadas para el estudio de resistencias genotípicas a claritromicina.

Estudio realizado a partir de la cepa de <i>H. pylori</i>	35
Estudio realizado a partir de la cepa <i>H. pylori</i> y de la biopsia gástrica	24
Estudio realizado a partir de la biopsia gástrica	4

Se diseñó un método de amplificación genómica a tiempo real (PCR-tr) para el diagnóstico de *H. pylori*. Para su desarrollo se escogieron 199 biopsias gástricas recogidas en el período comprendido entre febrero y agosto de 2016 pertenecientes a otros tantos pacientes, con una edad media de $57,0 \pm 17,7$ años (15-92 años) (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de los individuos incluidos en el diagnóstico de *H. pylori* mediante PCR-tr según sus características demográficas.

	Total (n=199)	Sexo		Edad		
		Hombre (n=75)	Mujer (n=124)	14-55 (n=90)	56-70 (n=63)	>70 (n=46)
Enfermedad ulcerosa	97 (48,7%)	45 (60,0%)	52 (41,9%)	31 (34,4%)	34 (54,0%)	32 (69,6%)
Úlcera duodenal	50 (25,1%)	27	23	16	17	17
Úlcera gástrica	25 (12,5%)	8	17	7	9	9
Enfermedad ulcerosa antigua	9 (4,5%)	7	2	4	2	3
Gastritis erosiva	7 (3,5%)	1	6	2	3	2
Duodenitis erosiva	6 (3,0%)	2	4	2	3	1
Enfermedad no ulcerosa	102 (51,3%)	30 (40,0%)	72 (58,1%)	59 (65,6%)	29 (46,0%)	14 (30,4%)
Dispepsia	43 (21,6%)	16	27	28	10	5
Anemia ferropénica	24 (12,1%)	4	20	13	5	6
Otros criterios/desconocido	18 (9,0%)	6	12	12	5	1
Antecedentes familiares cáncer gástrico	16 (8,0%)	4	12	5	9	2
Déficit de B ₁₂	1 (0,5%)	-	1	1	-	-

Se estudió la utilidad de esta PCR-tr en una muestra no invasiva, los exudados faríngeos. Para ello se recogieron exudados faríngeos de 39 hombres y 58 mujeres en torunda con medio de transporte de *Stuart-Amies*. Estos pacientes acudieron a realizar un test de la ureasa en aliento entre mayo y octubre de 2016. Los 97 individuos tenían una edad media de 50,1±16,04 años (15-75 años).

También se diseñó una técnica de amplificación genómica de detección de resistencias a claritromicina. Para su estandarización se incluyeron un total de 135 muestras pertenecientes a individuos con edad media de 55,7±16,9 años (15-92 años) a las que previamente se les había realizado la PCR-tr de diagnóstico de *H. pylori*. Estas muestras se recogieron entre febrero y diciembre de 2016.

En la Tabla 6 se resumen los pacientes que participaron en cada parte del estudio.

Tabla 6. Muestras incluidas en cada apartado del estudio.

	Período de estudio	Muestras	Cepas
Estudio epidemiológico (técnicas fenotípicas)	enero 2004-diciembre 2016	3426	
Detección genómica de resistencias	febrero-diciembre 2016	28	59
Diagnóstico genómico por PCR-tr	febrero-agosto 2016	199	
Aplicación de la PCR-tr de diagnóstico sobre muestra no invasiva	mayo-octubre 2016	97	
Detección genómica de mutaciones asociadas a resistencia a CH	febrero 2016-marzo 2017	135	

CH: Claritromicina

3.2. Métodos

Como se indicaba anteriormente las biopsias se enviaron al laboratorio en las 12-24 horas siguientes a su recogida. Una vez en el laboratorio, una parte de la biopsia gástrica se procesó inmediatamente por técnicas fenotípicas y otra parte se conservó a -20°C hasta su procesamiento mediante técnicas genotípicas.

3.2.1. Técnicas fenotípicas

3.2.1.1. Test de la ureasa rápida

Todas las muestras procesadas para técnicas fenotípicas se dividieron en dos y a un fragmento se le realizó un test de la ureasa rápida mediante inoculación en 1mL de caldo de urea (NaCl, KH₂PO₄, NaOH) e incubación durante dos días a 37 °C. Se consideró un resultado positivo cuando se produjo un viraje de color de amarillo a rosa, debido al incremento de pH en el medio por acción de la enzima ureasa de *H. pylori*.

3.2.1.2. Cultivo de la biopsia gástrica

Helicobacter pylori es un microorganismo capaz de crecer en distintos medios de cultivo, aunque requiere factores de crecimiento y condiciones especiales. Los medios de cultivo sólidos más utilizados son Agar Sangre junto con un medio suplementado con antibióticos para evitar el sobrecrecimiento de otra flora gastrointestinal que puede acompañar a *H. pylori* en la biopsia. Es un microorganismo microaerófilico que necesita para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C con una humedad del 90-95%. Es necesario incubar la muestra hasta 10 días antes de considerar el cultivo negativo.

Las biopsias se sembraron utilizando un asa estéril, rotándolas varias veces sobre la superficie de los medios de cultivo utilizados:

- selectivo (*Pylori agar*, BioMérieux, Francia)
- no selectivo (*Columbia agar* con 5% de sangre de cordero, BioMérieux, Francia)

Ambos medios se incubaron durante 10 días a 37°C en atmósfera microaerófila. Los cultivos se revisaron semanalmente durante esos 10 días, y las colonias con una morfología

compatible con *H. pylori* se identificaron mediante tinción de Gram y pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa (Figura 10).

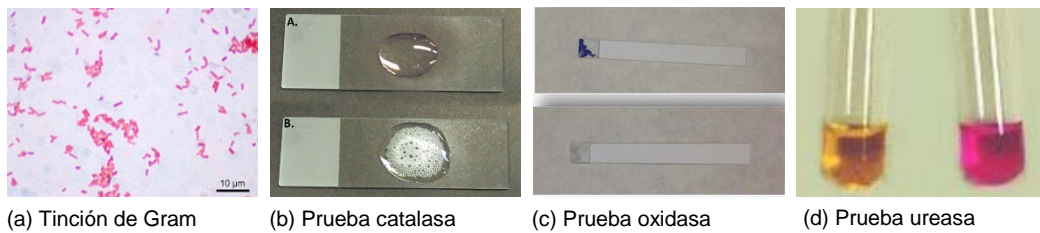


Figura 10. Pruebas de identificación de *H. pylori*: (a) tinción de Gram, (b) prueba de la catalasa, (c) prueba de la oxidasa, (d) prueba de la ureasa.

3.2.1.3. Estudio de sensibilidad fenotípica

En las cepas de *H. pylori* aisladas se estudió la sensibilidad a claritromicina (CH) y metronidazol (MZ) durante todo el período de estudio. A partir del año 2010 se incluyó el estudio de la sensibilidad a levofloxacino (LV). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron mediante E-test® (E-test®, BioMérieux, Francia) según el siguiente procedimiento:

- Las cepas identificadas como *H. pylori* se subcultivaron en un medio no selectivo (*Columbia agar* con 5% de sangre de cordero, BioMérieux, Francia) durante 48-72 horas.
- Se realizó una suspensión en suero salino con una turbidez equivalente a 3,0 Mc Farland (aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL). Se estudió la morfología de la bacteria en la suspensión al microscopio, descartándose aquellas suspensiones en las que la forma cocoide representaba más del 10%.
- Se inoculó en cuatro placas con medio *Mueller Hinton* con sangre de cordero (BioMérieux, Francia) que previamente se había dejado atemperar un mínimo de 15 minutos.
- Se colocó una tira de E-test® de cada uno de los antibióticos a ensayar (claritromicina, metronidazol y levofloxacino) por cada placa y se incubaron a 37°C en atmósfera microaerofílica. Una placa sin E-test® se utilizó como control de pureza de la cepa.
- Todo el proceso se llevó a cabo tomando las precauciones necesarias para evitar las contaminaciones.

La lectura de los E-test® se llevó a cabo después de 48-72 horas de incubación. En caso de no haber crecimiento tras 72 horas, la incubación no se prolongó y se consideró el crecimiento insuficiente para realizar antibiograma. En caso de haber crecimiento, pero no ser claramente visible la elipse, se reincubó hasta que ésta estuviese bien definida. Las CMI se leyeron en el punto de corte de la elipse con la tira de E-test®. Para los antibióticos bactericidas (claritromicina y levofloxacino) la CMI se leyó en el punto de completa inhibición, incluyendo las micro- y macro-colonias de la elipse.

La interpretación de las CMI se realizó siguiendo criterios de EUCAST (EUCAST 2016) que consideran la cepa resistente si:

- MIC \geq 0,5mg/L para claritromicina
- MIC \geq 8mg/L para metronidazol
- MIC \geq 1mg/L para levofloxacino

El crecimiento de las placas utilizadas para comprobar la pureza de las cepas se utilizó también para congelar éstas, para ello se recogió el microorganismo con una torunda que se depositó en un criovial con 2mL de suero salino y se congelaron a -20°C.

3.2.2. Técnicas genotípicas

3.2.2.1. Extracción genómica

En la fase de extracción se obtuvieron altas concentraciones de ADN libre y se inactivaron posibles inhibidores que pudiesen afectar a la reacción de amplificación posterior.

Extracción a partir de biopsia gástrica

El proceso de extracción de ADN a partir de muestras de biopsia gástrica consistió en los siguientes pasos:

- Digestión enzimática con tripsina al 0.25% durante toda la noche, para ayudar a individualizar las células.
- Adición de 200µL de reactivo de lisis con Proteinasa K con la siguiente composición: 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM cloruro de potasio, 2,5mM cloruro de magnesio, 0,5% Igepal, 0,5% Tween 20 y 10µg of Proteinasa K.

- Homogeneización e incubación durante 40 minutos a 60°C para la liberación del ADN, seguidos de 10 minutos a 96°C para inactivar la Proteinasa K.

El material extraído se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Extracción a partir de exudados faríngeos

Las muestras de exudado faríngeo previamente homogeneizadas en agua destilada se procesaron igual que las biopsias gástricas, utilizando el protocolo de extracción con Proteinasa K pero sin realizar la digestión enzimática inicial con tripsina.

El material extraído también se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Extracción a partir de cepas de Helicobacter pylori

Se llevó a cabo una extracción del ADN bacteriano total, siguiendo los siguientes pasos:

- Se preparó una suspensión de la cepa en agua destilada estéril con una densidad superior a 3 McFarland que se incubó 10 minutos a 95°C.
- Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante.
- Se realizaron dos lavados con agua destilada añadiendo 200µL de agua destilada estéril, mezclando, centrifugando 10 minutos a 13000rpm y desechando el sobrenadante.

El último pellet, con el ADN extraído y purificado se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.2.2.2. Técnicas de detección genómica

La amplificación genómica es un método enzimático en el que, utilizando una polimerasa termoestable, se duplica cíclicamente una secuencia específica de ADN de doble cadena, obteniéndose millones de copias. Cada ciclo consta de tres fases térmicas: desnaturalización, en la que se separan las dos hebras de ADN; anillamiento o hibridación, cuando se unen los cebadores; y polimerización o elongación, paso en el que se sintetiza la hebra complementaria.

Diseño de PCR-tr de diagnóstico

Para el diagnóstico de *H. pylori* mediante amplificación genómica se desarrolló un protocolo de PCR a tiempo real (PCR-tr), con dos cebadores y una sonda *Taqman* MGB marcada con el fluoróforo FAM de la región *ureA*. Los cebadores y la sonda se diseñaron utilizando el programa

Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®, USA) y la cepa de referencia *H. pylori* 26695 (GenBank U27270). En todas las muestras se incluyó un protocolo de detección de amplificación del gen de la β -globina humana. La composición oligonucleotídica de los cebadores y la sonda se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Cebadores y sondas para la amplificación de la región *ureA* de *H. pylori* y β -globina humana.

Región	Cebadores y sondas	Secuencia
gen <i>ureA</i>	Cebador sentido	5'-TGCAAGAAGGGCGCACTCT-3'
	Cebador antisentido	5'-CCATCAGGAAACATCGCTTCA-3'
	Sonda	(FAM) 5'-CCGGATGATGTGATGGA-3'MGB-NFQ
gen β -globina	Cebador sentido	5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3'
	Cebador antisentido	5'-CCAATTCATCCACGTTCCACC-3'
	Sonda	(FAM) 5'-TGCATCTGACTCCTGAGGA-3'MGB-NFQ

Diseño de PCR de detección de mutaciones

La discriminación génica es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido, los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica. La tecnología *TaqMan* puede emplearse para el estudio de SNPs utilizando dos sondas *TaqMan* complementarias, cada una de ellas con cada uno de los SNPs y marcadas con un fluoróforo distinto (Figura 11).

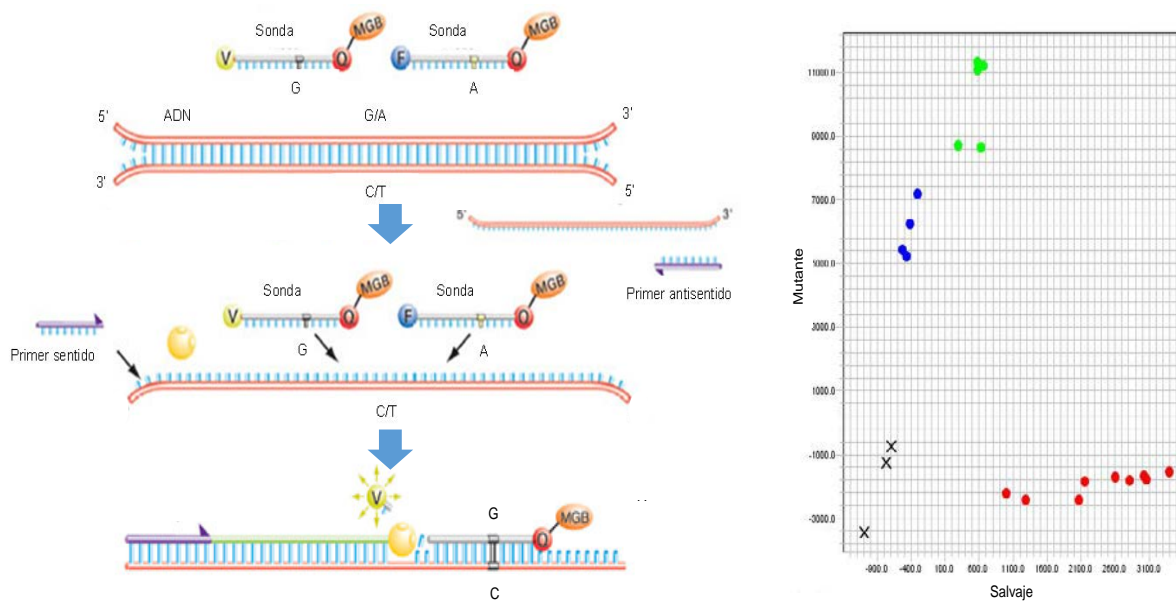


Figura 11. Fundamento y resultados de la metodología de discriminación génica

Utilizando esta tecnología se diseñó una PCR a tiempo real para detectar la mutación más frecuentemente asociada a resistencia genotípica a claritromicina basándose en los resultados de las cepas de nuestro entorno. Los cebadores y sonda diseñados se encuentran en una región conservada del dominio V de la subunidad 23S ARNr de *Helicobacter pylori* (Figura 12 y Tabla 8).

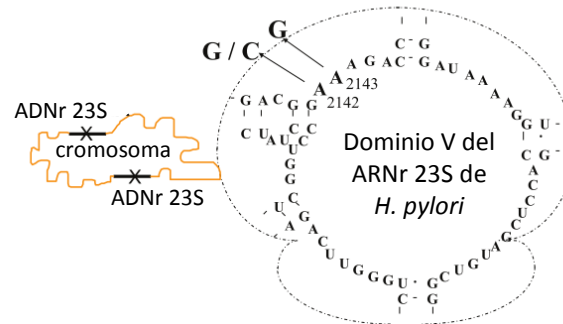


Figura 12. Dominio V de la subunidad 23S ARNr de *H. pylori*.

Tabla 8. Cebadores y sonda utilizados en la detección de resistencia genómica a claritromicina.

Región	Cebadores y sondas	Secuencia
Dominio V 23S rRNA	Cebador sentido	5'-CTGTCTCAACCAGAGATTCAGTGA-3'
	Cebador antisentido	5'-TCCCATAGCAGTGCTAAGTTGT-3'
	Sonda salvaje	(VIC) 5'-AAGACGGAAAGACC-3'MGB-NFQ
	Sonda CH-R	(NED) 5'-AAGACGGAGAGACC-3'MGB-NFQ

CH-R: Resistentes a claritromicina.

Ensayo de idoneidad de los métodos diseñados

Los cebadores y sondas diseñados se ensayaron con cepas control antes de su uso en muestras clínicas. Con ellas se evaluó la especificidad y el límite de detección de los cebadores, sondas y perfiles térmicos utilizados.

Se evaluó la especificidad de la PCR-tr de diagnóstico de *H. pylori* probándola frente a una serie de cepas de microorganismos presentes en la microbiota gastrointestinal: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Citrobacter spp.* y *Morganella morganii*. Cada una de estas cepas se extrajo según el protocolo previamente descrito, y se hicieron diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000. Se aplicó el protocolo de amplificación a estas diluciones por triplicado.

En cada serie de PCR-tr se introdujeron controles negativos y positivos para controlar su buen funcionamiento y las posibles contaminaciones durante el proceso. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Como controles positivos se utilizaron fragmentos de *H. pylori* obtenidos de amplificadores purificados a partir de gel de agarosa, para ello se llevó a cabo una reacción de amplificación en las condiciones descritas y una electroforesis en gel de agarosa según se explicará posteriormente. Las bandas se cortaron y purificaron como se explicará más adelante y el ADN presente en cada banda se secuenció confirmando que se trataba de *H. pylori* y se midió utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000/2000c* (Termo Scientific^{4ta}, USA). Se hicieron alícuotas para utilizar como control positivo.

Para conocer el límite de detección o sensibilidad analítica de la PCR-tr de diagnóstico de *H. pylori* se realizaron diluciones seriadas del control positivo que contenía $2,47 \times 10^{10}$ moléculas/ μL (medido mediante espectrofotometría): 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000. Se estableció una curva relacionando las distintas concentraciones con los correspondientes ciclos de amplificación (Ct).

Protocolos de amplificación

Con cada una de las parejas de cebadores y la correspondiente sonda o sondas descritas en los apartados anteriores se realizó una mezcla de reacción de amplificación. Para evitar trabajar con cantidades mínimas de los reactivos, se preparó una mezcla “madre” con todos los componentes de la reacción que se alícuotó a razón de $5\mu\text{L}$ en tubos *Eppendorf®* con capacidad para $200\mu\text{L}$. La Tabla 9 y la

Tabla 10 muestran los reactivos y los perfiles térmicos aplicados en cada caso.

Tabla 9. Reactivos utilizados en las reacciones de amplificación genómica.

Reactivos	
Brilliant III Ultra fast QPCR Master Mix (<i>Agilent Technologies</i> , USA)	5 μL
Cebadores y sonda (900 nM y 250 nM, respectivamente)	1 μL
ADN de la muestra	5 μL

Tabla 10. Perfiles térmicos aplicados en las reacciones de amplificación de *ureA*, ARNr 23S y β -globina.

Región	Perfil térmico	Ciclos	Tª	Tiempo
<i>ureA</i> β -globina	Preciclo	1	95°C	10'
	Ciclos	40		
	Desnaturalización		95°C	10"
	Anillamiento		55°C	22"
	Elongación		60°C	60"
23S ARNr	Preciclo	1	95°C	5'
	Ciclos	40		
	Desnaturalización		95°C	30"
	Anillamiento		53°C	50"
	Elongación		72°C	60"

La preparación de las mezclas de reacción y la dispensación de las mismas se realizó en un alicuotador *QIAgility* (*QIAGEN*, Alemania), ubicado en un cuarto separado del lugar donde se llevó a cabo la extracción de las muestras, la amplificación y la detección de los productos amplificados según las normas de seguridad aplicadas en el laboratorio (Persing & Landry 1989).

El ADN de cada muestra se añadió a la mezcla de reacción utilizando un alicuotador *Eppendorf epMotion 5070* (*eppendorf*, Alemania), situado en otra zona del laboratorio.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un amplificador *Cobas 480 real-time PCR platform* (*Roche Diagnostics GmbH*, Germany) para el diagnóstico de *H. pylori* y la amplificación del gen de la β -globina humana, y un amplificador *7500 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*®, USA) para la detección de resistencias a claritromicina mediante SNPs.

El protocolo de detección de amplificación del gen de la β -globina humana permitió la cuantificación de la carga bacteriana expresada como copias/10⁵ células relacionando los ciclos de amplificación de las muestras (Ct) según la curva de la β -globina humana descrita por Álvarez-Argüelles (Álvarez-Argüelles et al. 2015).

3.2.2.3. Secuenciación

La caracterización genómica por secuenciación permite conocer la composición de un fragmento de genoma y evaluar sus cambios con respecto a una cepa patrón. Todos los métodos de secuenciación genómica, tanto los que utilizan dideoxinucleótidos marcados como los que utilizan cebadores marcados, tienen en común la generación de una hebra de ADN que comienza en un punto específico determinada por el cebador y acaba con la incorporación a la cadena en síntesis de un terminador dideoxinucleótido trifosfato. Se obtienen así secuencias de distinta

longitud que difieren en una sola base y pueden ser separadas electroforéticamente por tamaños al aplicar una corriente eléctrica.

Para determinar las mutaciones asociadas a resistencia a claritromicina más comunes en los pacientes estudiados se secuenció un fragmento de 727pb del dominio V de la subunidad 23S ARNr.

Los cebadores se diseñaron utilizando el programa *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems*, USA) y la cepa de referencia *H. pylori* 26695 (GenBank U27270): sentido 5'-CATAGTCGTCGGTACCGCAA-3' [posiciones 1701 a 1721] y antisentido 5'-AGGCTGGCTTGTGCCATTA-3' [posiciones 2408 a 2427].

Protocolo de secuenciación "Kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing"

Previo a la secuenciación según el método de Sanger se realizó una amplificación genómica con los cebadores descritos anteriormente en una mezcla de amplificación con los reactivos y bajo el perfil térmico indicados en la Tabla 11.

Tabla 11. Mezcla y condiciones de reacción para la amplificación genómica previa a la secuenciación.

Reactivos		Cantidades	
<i>PuReTaq™Ready-To-Go™ PCR beads</i> (GE Healthcare, UK)		1 unidad	
Cebadores (12,5 µM c/u)		2 µL	
ADN de la muestra		5 µL	
Perfil térmico	Ciclos	Tª	Tiempo
Preciclo	1	95°C	5'
Ciclos	40		
Desnaturalización		95°C	10"
Anillamiento		55°C	22"
Elongación		60°C	60"

Los productos de PCR se purificaron a partir de una electroforesis en gel de 2% de agarosa. El gel se preparó disolviendo agarosa en tampón TAE al 1%. A continuación se añadieron 5µL de bromuro de etidio por cada 100mL de mezcla y se puso en el molde con un peine de 3mm de grosor. Cuando el gel obtuvo consistencia se procedió a realizar la electroforesis mezclando 10µL del producto amplificado con 2µL del tampón de carga (0,25% azul bromofenol, 40% sucrosa en agua), se transfirió al gel de agarosa sumergido en una cubeta de electroforesis con tampón TAE y se sometió a un campo eléctrico continuo con una diferencia de potencial de 100 voltios durante 30-40 minutos. Se utilizó transiluminación con luz ultravioleta para monitorizar el producto amplificado considerándose la reacción positiva si se observaba una banda a 727pb (Figura 13).



Figura 13. Gel de agarosa con bandas a 727pb.

Las bandas obtenidas se cortaron y purificaron utilizando columnas de extracción (*Montage DNA Gel Extraction Kit*, Millipore, USA). Una vez obtenido el fragmento se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el preparado comercial “*BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*” (*Applied Biosystems*, USA) con los mismos cebadores que los de la reacción de amplificación del fragmento de 727pb por separado. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 12.

Tabla 12. Mezcla y condiciones de reacción para la secuenciación.

Reactivo	Volumen	Concentración/volumen final	
Tampón (5x)	2 µL	1x	
Mezcla de secuenciación (5x)	2 µL	1x	
DMSO (5%)	0.5 µL	0,25%	
Cebador (5µM)	0.5 µL	0,25µL	
Muestra	3 µL	-	
Agua	2 µL	-	

Perfil térmico	Ciclos	Tª	Tiempo
Preciclo	1	94°C	5'
Ciclos	30		
Desnaturalización		94°C	30"
Anillamiento/hibridación		50°C	20"
Elongación		60°C	4'

Antes del revelado de la secuenciación se purificó el producto de la PCR añadiendo 40 µL de *BigDye®Xterminator™ Purification Kit* (*Applied Biosystems*, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se cargaron 20µL de la muestra en el secuenciador *310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, USA) con un tiempo de análisis de 36 minutos, que permite la caracterización de un fragmento de unos 400pb.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa *MEGA 3.1* y se compararon con la secuencia de la cepa de referencia *H. pylori* 26695. Se tuvo en cuenta en la recogida de datos cualquier mutación significativa (que apareciese en un porcentaje superior al 10%) además de las mutaciones previamente descritas asociadas a resistencia a claritromicina.

3.3. Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando los programas para ordenador *IBM SPSS Statistics* (versión 22.0, SPSS, Chicago, IL, USA) y *GraphPad InStat* (versión V2.04a).

El significado estadístico de la diferencia entre las proporciones se determinó usando la prueba *Chi* cuadrado con corrección de *Yates* o el test exacto de *Fisher* para variables cualitativas en celdas 2x2 cuando en la tabla teórica existía un dato menor de 5 o el global de los datos no llegaba a 50. Se aplicó el test *t-Student* para datos no apareados cuando se compararon medias aritméticas, aplicando a corrección de *Welch* cuando las diferencias entre las varianzas eran estadísticamente significativas. La concordancia entre distintos métodos se midió utilizando el coeficiente *kappa de Cohen*.

Se utilizaron test de dos colas para todas las determinaciones. El nivel de significación requerido en todos los casos fue de $p < 0,05$, así como para el cálculo de los intervalos de confianza.

4. RESULTADOS

4.1. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

4.1.1. Prevalencia de la infección

Entre los años 2004 y 2016 se aisló *H. pylori* en 1604 (46,8%) pacientes de los que el 770 (48,0%) eran mujeres y 834 (52,0%) hombres, con una edad media 54,1±15,9 años (15-94 años).

Durante el período de estudio el porcentaje de aislamientos de *H. pylori* disminuyó desde el 62,7% en 2004 hasta el 36,6% en 2016 ($p < 0,0001$) como muestran la Tabla 13 y la Figura 14.

Tabla 13. Evolución de los aislamientos de *H. pylori* en función del sexo (número de aislamientos/total; %).

2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Hombres (n= 834)												
71/118 (60,2%)	92/142 (64,8%)	65/100 (65,0%)	58/116 (50,0%)	59/108 (54,6%)	67/111 (60,4%)	74/132 (56,1%)	75/141 (53,2%)	36/117 (30,8%)	61/152 (40,1%)	66/156 (42,3%)	53/158 (33,5%)	57/135 (42,2%)
Mujeres (n= 770)												
62/94 (66,0%)	59/99 (59,6%)	40/76 (52,6%)	42/88 (47,7%)	41/72 (56,9%)	49/99 (49,5%)	49/96 (51,0%)	71/147 (48,3%)	55/149 (36,9%)	68/174 (39,1%)	80/234 (24,2%)	74/200 (37,0%)	80/212 (37,7%)
Total (n=1604)												
133/212 (62,7%)	151/241 (62,7%)	105/176 (59,7%)	100/204 (49,0%)	100/180 (55,6%)	116/210 (55,2%)	123/228 (53,9%)	146/288 (50,7%)	91/266 (34,2%)	129/326 (39,6%)	146/390 (37,4%)	127/358 (35,5%)	137/374 (36,6%)

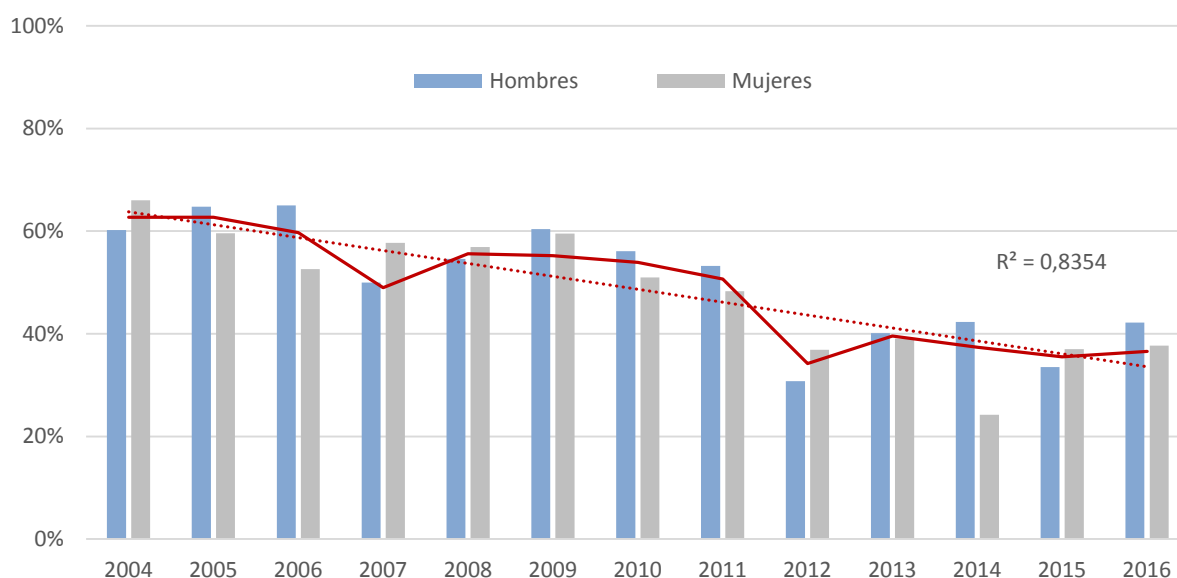


Figura 14. Evolución de los aislamientos de *H. pylori* durante el período de estudio (2004-2016).

RESULTADOS

De los 1604 pacientes en los que se aisló *H. pylori* 1084 (67,6%) tenían enfermedad ulcerosa y 520 (32,4%) enfermedad no ulcerosa ($p<0,0001$). Los datos de los pacientes con cultivo positivo para *H. pylori* según el sexo, la edad y sus criterios de erradicación se muestran en la Tabla 14 y la Figura 15.

Tabla 14. Aislamientos de *H. pylori* según el sexo, la edad y los criterios de erradicación en el período 2004-2016.

	Total	Sexo		Edad		
		Hombre	Mujer	14-55	56-70	>70
Enfermedad ulcerosa (n=1895)	1084* (57,2%)	633/1099 (57,6%)	451/796 (56,7%)	550/853 (64,5%)	330/567 (58,2%)	204/475 (42,9%)
Úlcera duodenal	427/616 (69,3%)	260	167	225	126	76
Úlcera (localización desconocida)	153/357 (42,9%)	80	73	74	52	27
Úlcera gástrica	180/333 (54,1%)	101	79	70	62	48
Duodenitis erosiva	147/232 (63,4%)	92	55	91	37	19
Gastritis erosiva	104/188 (55,3%)	62	42	46	34	24
Enfermedad ulcerosa antigua	73/169 (43,2%)	38	35	44	19	10
Enfermedad no ulcerosa (n=1531)	520* (33,9%)	201/587 (34,8%)	319/944 (33,8%)	318/817 (38,9%)	130/432 (30,0%)	70/280 (25,0%)
Dispepsia	319/957 (33,3%)	122	197	207	74	37
Anemia ferropénica	79/263 (30,0%)	32	47	36	24	19
Antecedentes familiares cáncer gástrico	65/155 (41,9%)	21	44	43	18	4
Otros criterios/desconocido	48/122 (39,3%)	25	22	26	12	10
Preoperatorio cirugía bariátrica	7/26 (26,9%)	1	7	5	2	
Déficit B ₁₂	2/8 (25,0%)		2	1	1	

* $p<0,0001$

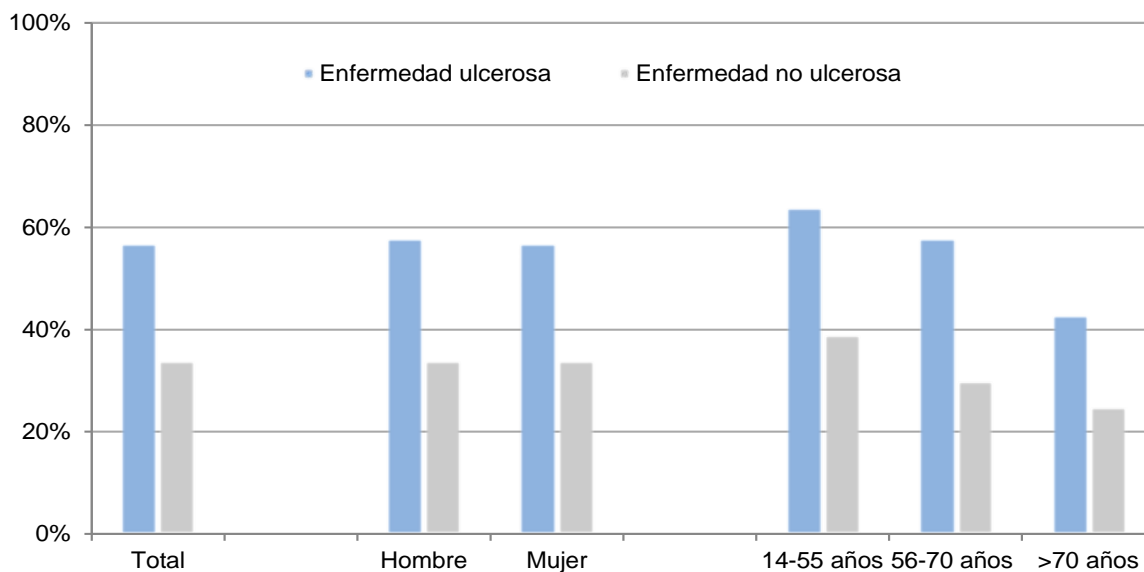


Figura 15. Aislamientos de *H. pylori* en pacientes con/sin úlcera según el sexo y la edad.

En la Figura 16 se muestran los aislamientos de *H. pylori* según los criterios de erradicación, dentro de los grupos de pacientes con y sin enfermedad ulcerosa. Los porcentajes varían entre el 42,9% y el 69,3% en pacientes con enfermedad ulcerosa, y entre el 25,0% y el 41,9% en pacientes sin enfermedad ulcerosa (Figura 16).

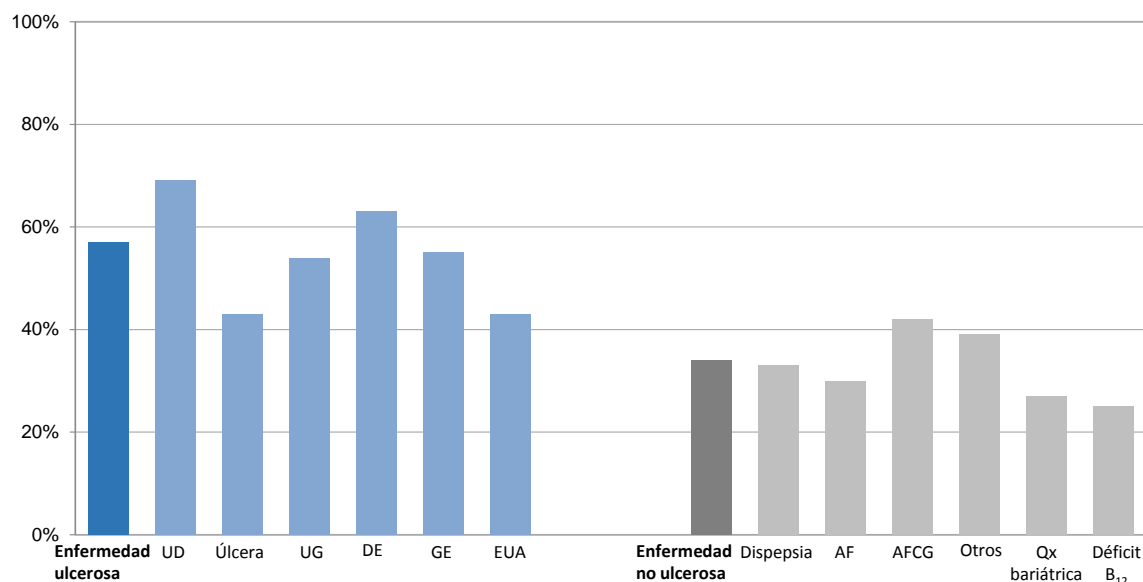


Figura 16. Aislamientos de *H. pylori* según los criterios de erradicación. UD: úlcera duodenal; UG: úlcera gástrica; DE: duodenitis erosiva; GE: gastritis erosiva; EUA: enfermedad ulcerosa antigua; AF: anemia ferropénica; AFCG: antecedentes familiares carcinoma gástrico; Qx bariátrica: preoperatorio cirugía bariátrica.

4.1.2. Resistencias fenotípicas

A lo largo del estudio se encontraron 762 (47,5%) cepas con resistencia a alguno de los antibióticos estudiados, 278 (19,3%) de 1439 cepas resistentes a claritromicina, 572 (39,8%) de 1437 cepas resistentes a metronidazol y 130 (17,0%) de 764 cepas resistentes a levofloxacino (la sensibilidad a levofloxacino empezó a testarse en el año 2010). La resistencia a claritromicina varió durante el período de estudio entre el 12,3% y el 30,3%, a metronidazol entre el 30,4% y el 51,7% y a levofloxacino entre el 12,7% y el 22,3%. La Tabla 15 y la Figura 17 muestran la distribución de las resistencias a los tres antibióticos entre los años 2004 y 2016.

RESULTADOS

Tabla 15. Resistencias fenotípicas de *H. pylori* a los antibióticos entre 2004 y 2016 (resistentes/total; %).

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
CH	26/122 (21,3%)	26/131 (19,8%)	19/104 (18,3%)	27/89 (30,3%)	20/87 (23,0%)	20/109 (18,3%)	22/131 (16,8%)	20/115 (17,4%)	10/81 (12,3%)	17/113 (15,0%)	18/124 (14,5%)	26/112 (23,2%)	27/121 (22,3%)
MZ	55/122 (45,1%)	54/132 (40,9%)	45/104 (43,3%)	45/87 (51,7%)	34/86 (39,5%)	37/108 (34,3%)	46/115 (40,0%)	59/131 (45,0%)	28/81 (34,6%)	43/114 (37,7%)	51/124 (41,1%)	34/112 (30,4%)	41/121 (33,9%)
LV	-	-	-	-	-	-	10/79 (12,7%)	19/131 (14,5%)	14/81 (17,3%)	20/116 (17,2%)	21/124 (16,9%)	25/112 (22,3%)	21/121 (17,4%)

CH: Claritromicina, MZ: Metronidazol, LV: Levofloxacino.

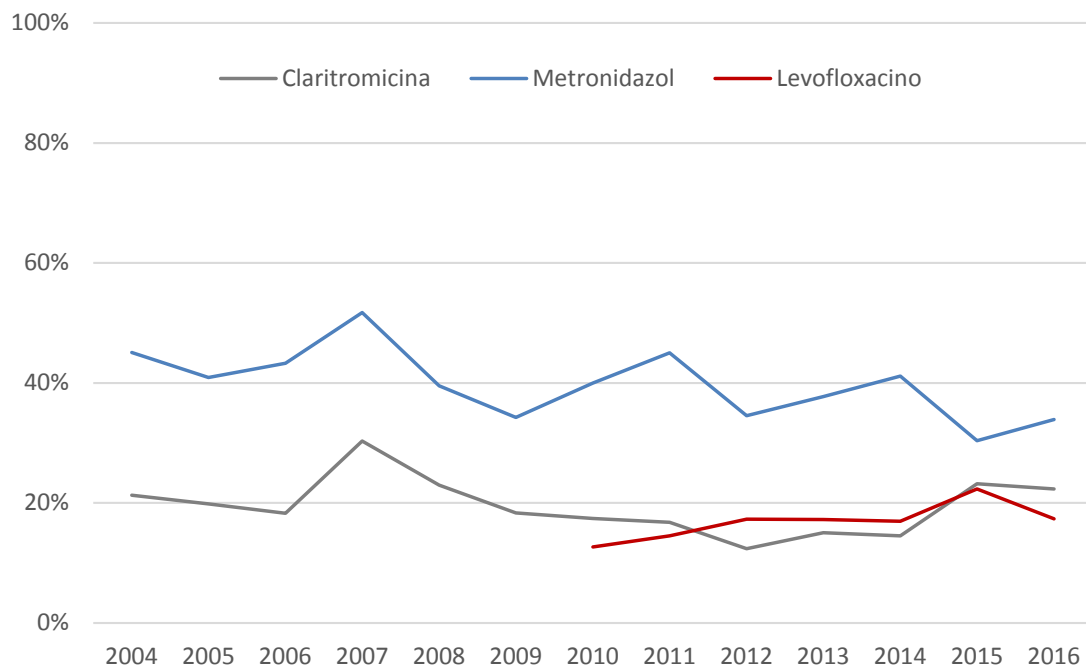


Figura 17. Porcentaje de resistencia fenotípica a los antibióticos de los aislamientos de *H. pylori* durante el período de estudio.

Los resultados de las resistencias a antibióticos se analizaron de acuerdo a la edad y al sexo. La Tabla 16 muestra los datos de resistencia a los antibióticos al clasificar a los pacientes según estas dos variables.

Tabla 16. Porcentaje de resistencia según el sexo y la edad de los pacientes.

		14-55 años	56-70 años	>70 años	Total
Claritromicina	Hombre	61/406 (15,0%)	32/229 (14,0%)	18/117 (15,4%)	111/753 (14,7%)*
	Mujer	91/384 (23,7%)	46/175 (26,3%)	30/127 (23,6%)	167/686 (24,3%)*
	Total	152/790 (19,2%)	78/404 (19,3%)	48/244 (19,7%)	278/1439 (19,3%)
Metronidazol	Hombre	168/404 (41,6%)	96/230 (41,7%)	35/118 (29,7%)	300/753 (39,8%)
	Mujer	166/383 (43,3%)	69/173 (39,9%)	37/128 (28,9%)	272/684 (39,8%)
	Total	334/787 (42,4%)**	165/403 (40,9%)**	72/246 (29,3%)**	572/1437 (39,8%)
Levofloxacino	Hombre	18/182 (9,9%)	24/129 (18,6%)	14/48 (29,2%)	56/359 (15,6%)
	Mujer	36/233 (15,4%)	21/98 (21,4%)	17/74 (23,0%)	74/404 (18,3%)
	Total	54/415 (13,0%***)	45/227 (19,8%***)	31/122 (25,4%***)	130/764 (17,0%)

*p=0,0002; **p=0,0396; ***p=0,0087

En la tabla se puede observar que la resistencia a claritromicina fue del 24,3% (167/686) en mujeres frente al 14,7% (111/753) en hombres (p=0,0002). La resistencia a metronidazol fue del 41,9% (499/1190) en pacientes menores de 70 años frente al 29,3% (72/246) en mayores de esa edad (p=0,0396) y la resistencia a levofloxacino aumentó al aumentar la edad de los pacientes (p=0,0087). Al clasificar a los pacientes según su clínica en úlcera/no úlcera, las tasas de resistencia fueron, respectivamente, 176/970 (18,1%) y 102/469 (21,7%) para claritromicina (p=0,1170), 387/970 (39,9%) y 185/467 (39,6%) para metronidazol (p=0,9541), 75/437 (17,1%) y 55/327 (16,8%) para levofloxacino (p=0,9228) (Figura 18).

RESULTADOS

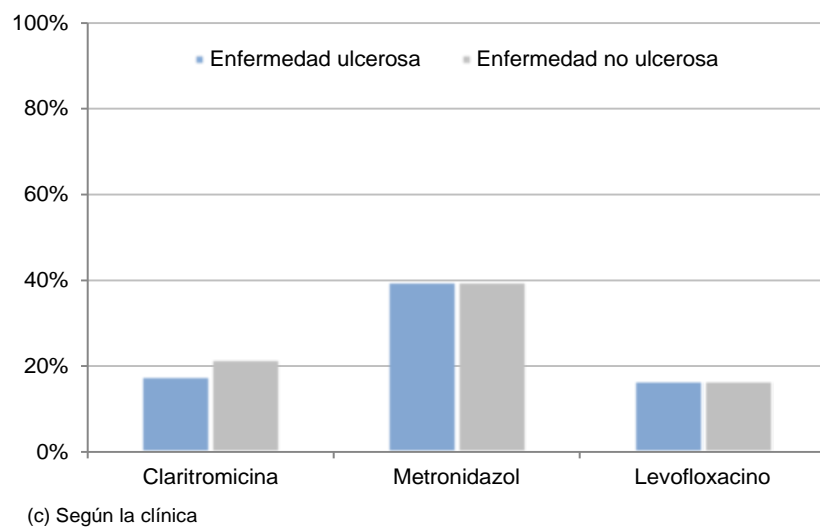
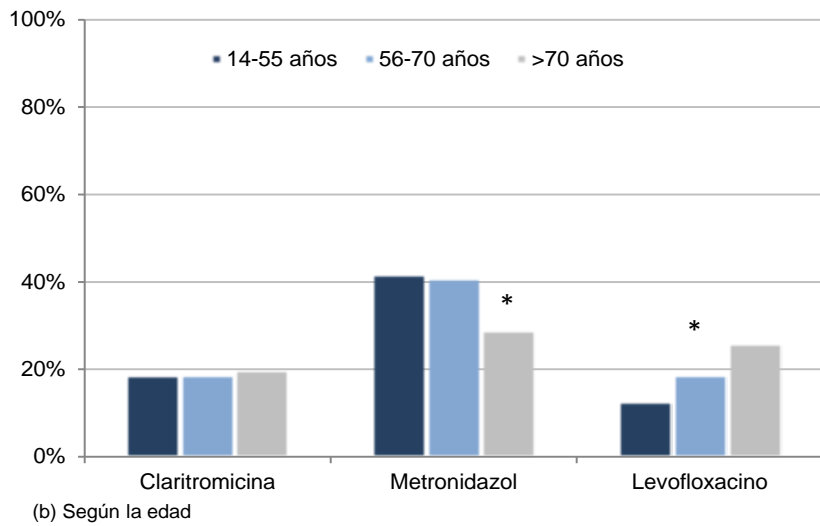
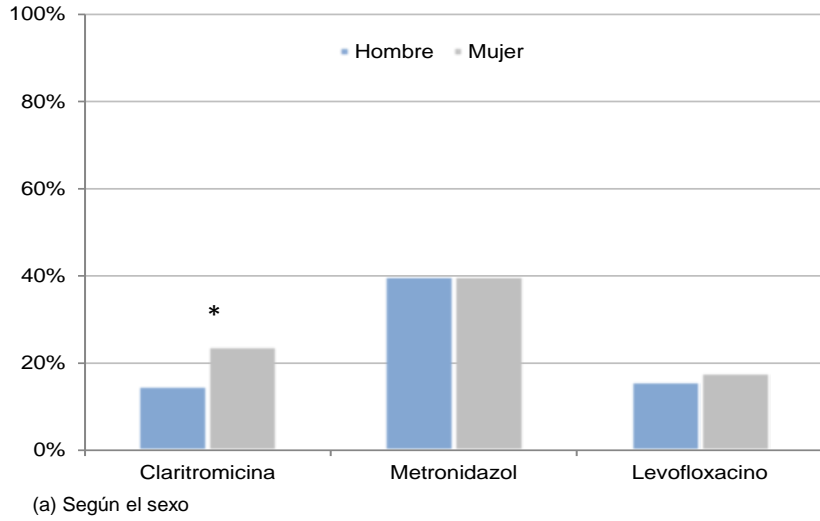


Figura 18. Tasa de resistencia de *Helicobacter pylori* según (a) el sexo, (b) la edad y (c) los criterios de erradicación.

Se detectaron resistencias múltiples en un total de 223 pacientes. La combinación claritromicina más metronidazol se encontró en 127 (9,7%) de los 1306 pacientes en los que se realizó el ensayo para ambos antibióticos, seguida de metronidazol más levofloxacino que se detectó en 54 (7,2%) de los 750 pacientes estudiados y claritromicina más levofloxacino que se encontró en 30 (3,9%) de los 760 pacientes en los que se testaron los tres fármacos. Resistencia a los tres antibióticos testados se encontró en 12 (1,5%) de 806 aislamientos (Figura 19).

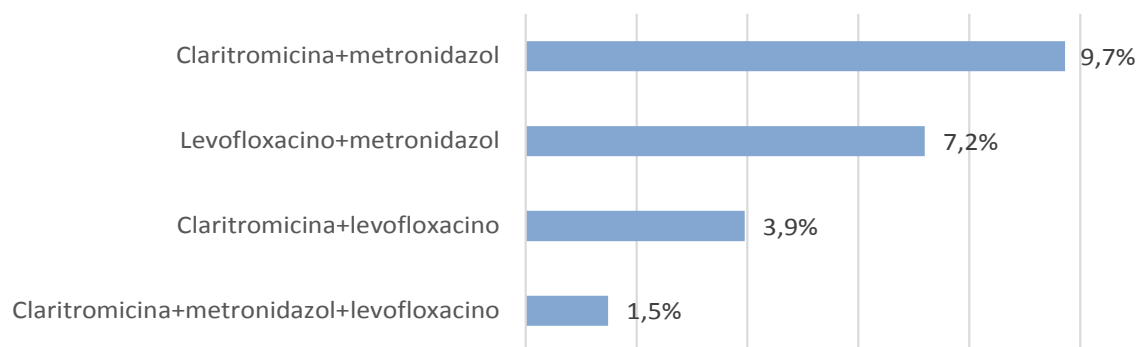
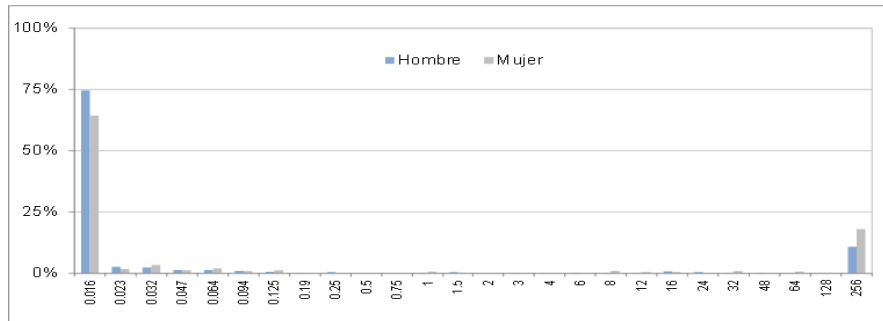


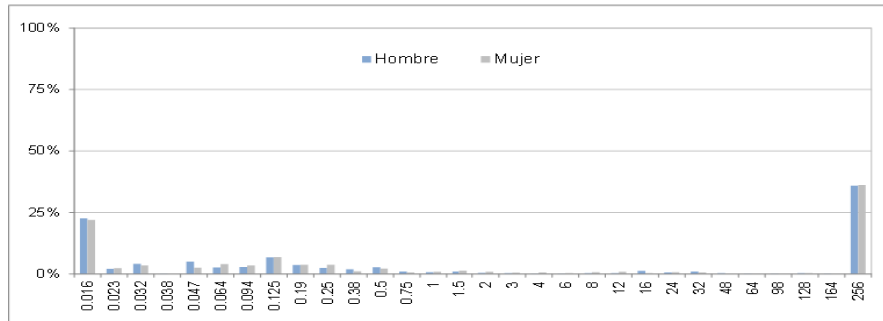
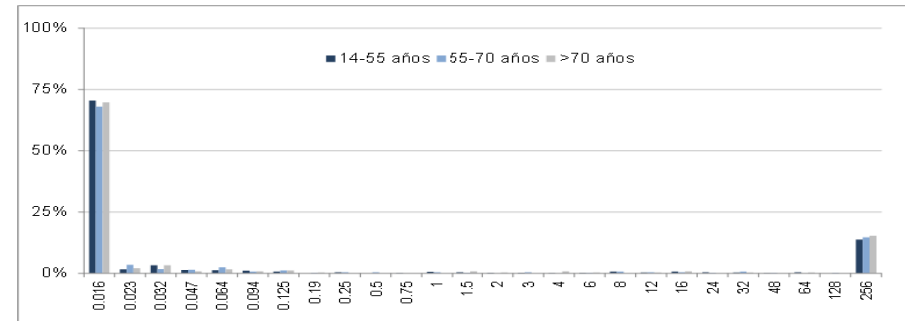
Figura 19. Tasa de resistencias múltiples de *Helicobacter pylori* a los tres antibióticos testados.

Con respecto a los datos de las CMIs, se observó que en las cepas resistentes la mayoría de los valores de CMI para cada antibiótico estaban por encima de la concentración más alta de la tira de E-test® (256µg/mL para CH y MZ y 8µg/mL para LV), aunque si había diferencias en las cepas sensibles: 992 (87%) de 144 cepas sensibles a claritromicina tenían un valor de CMI por debajo de la concentración mínima de la tira de E-test®, mientras que 317 (37%) de 853 cepas sensibles a metronidazol tenían un valor de CMI menor de la concentración mínima del E-test®. En contraste, 595 (90%) de 663 cepas sensibles a levofloxacino presentaban valores de CMI cercanos al punto de corte (entre 0,015 y 0,5) ($p < 0,0001$). No se encontraron diferencias en esta distribución de las CMIs según el sexo o la edad (Figura 20).

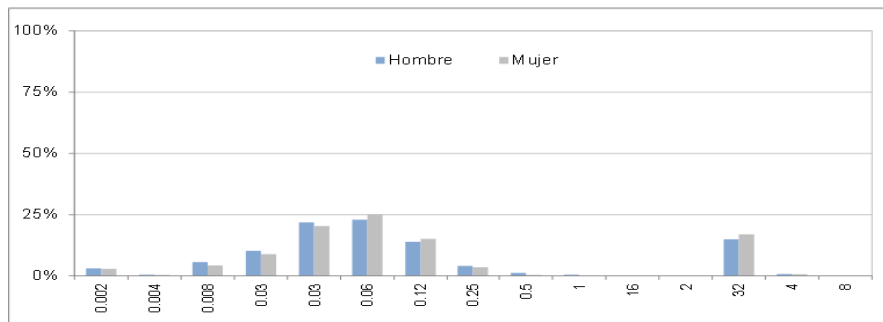
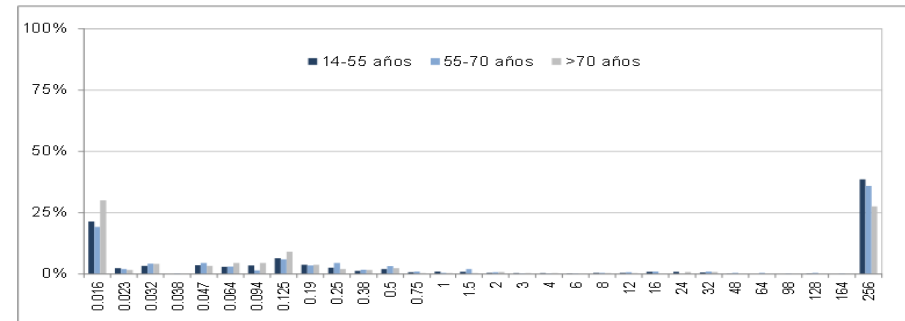
RESULTADOS



(a) Distribución de CMI de claritromicina



(b) Distribución de CMI de metronidazol



(c) Distribución de CMI de levofloxacin

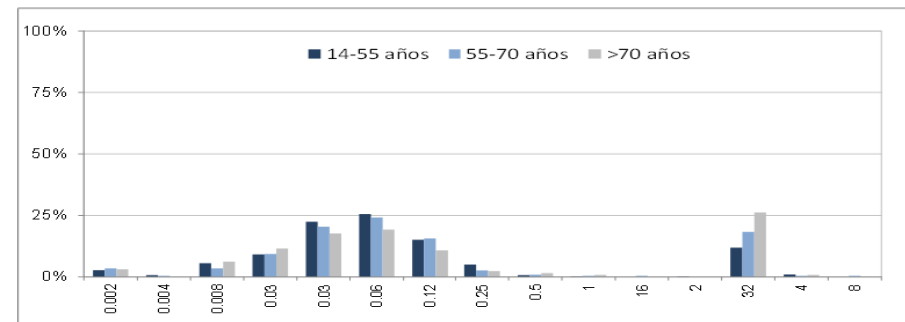


Figura 20. Distribución de CMI para cada antibiótico según el sexo y la edad, (a) claritromicina, (b) metronidazol, (c) levofloxacin.

4.2. Estudio genotípico de resistencias

Para el estudio genotípico de resistencias se seleccionaron 63 cepas de *Helicobacter pylori*: 35 a partir de la cepa obtenida del cultivo (18 fenotípicamente resistentes y 17 sensibles), 24 a partir de la muestra directa y de la cepa obtenida del cultivo (16 fenotípicamente resistentes y 8 sensibles) y 4 a partir de la muestra directa (fenotípicamente resistentes). Estas cepas se caracterizaron por secuenciación de un fragmento de 727pb del dominio V del gen 23S ARNr.

Se consideraron cambios relevantes cuando aparecían en más del 10% de las cepas analizadas en comparación con la cepa de referencia. Según este criterio se encontraron 8 cambios importantes que implican un cambio aminoacídico y una mutación puntual presente en todas las cepas (Tabla 17).

Tabla 17. Mutaciones relevantes encontradas mediante secuenciación.

Fenotipo	A1821G	G1826A	T1830C	T1833C	A2142G/C	A2143G	G2167A	T2182C	A2300G
CH-R (n=38)	16 (42,1%)	15 (39,5%)	16 (42,1%)	5 (13,2%)	2 (5,2%)	27* (71,0%)	34 (100%)	7 (18,4%)	3 (7,9%)
CH-S (n=25)	15 (60,0%)	14 (56,0%)	13 (52,0%)	4 (16,0%)	-	-	25 (100%)	1 (4,0%)	2 (8,0%)
Total (n=63)	31 (49,2%)	29 (46,0%)	29 (46,0%)	9 (14,3%)	2 (3,2%)	23 (36,5%)	59 (100%)	8 (12,7%)	5 (7,9%)

CH-R: cepas resistentes a claritromicina; CH-S: cepas sensibles a claritromicina.

*p<0,0001

En total se detectaron mutaciones previamente relacionadas con resistencia genotípica a claritromicina en 31 (81,6%) de las cepas resistentes y en 1 (4,0%) cepa fenotípicamente sensible. La mutación A2143G fue la más frecuente, presente en 27 cepas (71,0%); la mutación A2142C se encontró en 1 cepa (2,6%), la mutación A2142G se encontró en otra cepa (2,6%) y la mutación T2182C se detectó en 7 (18,4%) cepas resistentes, en 5 de ellas asociada a la mutación A2143G. En una de las cepas sensibles se encontró la mutación T2182C.

Con respecto a las CMIs, en la Tabla 18 se relacionan con las mutaciones asociadas a resistencia genotípica a claritromicina.

Tabla 18. Relación de los cambios asociados a resistencia a claritromicina y la CMI.

	CMIs (µg/mL)							Total
	1,5	8	12	32	64	128	>256	
A2142G	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	1
A2142A/C	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	1
A2143G	1 (7,1%)	2 (14,3%)	-	-	1 (7,1%)	1 (7,1%)	9 (64,3%)	14
A2143A/G	-	-	1 (11,1%)	1 (11,1%)	-	-	7 (77,8%)	9
A2143G+T2182C	-	1 (25,0%)	-	-	-	-	3 (75,0%)	4
A2143A/G+T2182C	-	-	-	-	-	-	1 (100%)	1
T2182C	-	1 (50,0%)	-	-	-	-	1 (50,0%)	2
Sin mutaciones	2 (33,3%)	1 (16,7%)	-	1 (16,7%)	-	-	2 (33,3%)	6

Se encontraron poblaciones mixtas en 11 casos (35,5%) (Tabla 19 y Figura 21).

Tabla 19. Mutaciones encontradas a partir de muestra directa y a partir de cepa.

		Secuencias a partir de cepas			
		Salvaje	Mixta	Mutante	No realizado
Secuencias a partir de muestra directa	Salvaje	9	-	-	-
	Mixta	7	1	-	1
	Mutante	-	-	7	3
	No realizado	22	2	11	-

En 3 (27,3%) muestras la población mixta se detectó a partir de las cepas obtenidas del cultivo y en 8 (72,7%) casos a partir de la muestra directa.

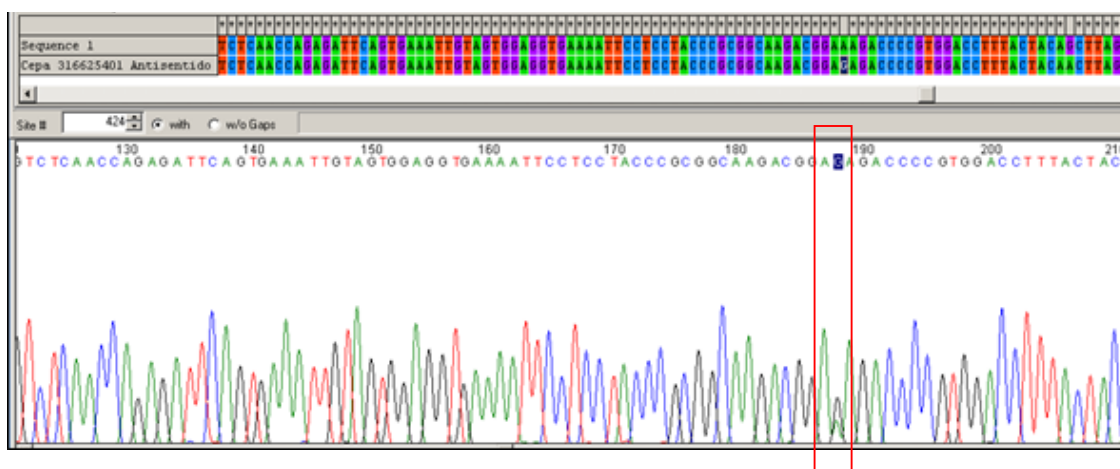


Figura 21. Secuencia de una cepa con población mixta comparada con la secuencia de referencia.

De las 24 cepas en que se secuenció la cepa aislada del cultivo y la obtenida de la muestra los resultados coinciden en 17 (70,8%) (Tabla 19).

De las 8 cepas fenotípicamente sensibles se encontró en un caso la mutación T2182C tanto de cepa de cultivo como de muestra. En las 16 cepas fenotípicamente resistentes los resultados de la secuenciación coinciden en 9 casos. En los otros 7 se encontró mutación en la cepa obtenida de la muestra directa pero no en la del cultivo.

Por tanto, en la muestra directa se encontraron mutaciones en las cepas resistentes en 19 (95,0%) de los 20 casos fenotípicamente resistentes analizados y en la cepa obtenida a partir del cultivo se encontraron mutaciones en 20 (58,8) de los 34 casos resistentes analizados ($p=0,0044$) (Tabla 19).

4.3. Técnicas de detección genómica

4.3.1. Diagnóstico mediante detección genómica de *H. pylori*

4.3.1.1. Especificidad de la PCR-tr y límite de detección

Como se comentó en el apartado material y métodos, antes de aplicar la PCR-tr para detección de *H. pylori* sobre muestras clínicas se ensayó en cepas de distintos microorganismos recogidas de cultivos identificados previamente. Cada cepa se probó por triplicado. Los resultados se recogen en la Tabla 20.

De los controles de *H. pylori* se realizaron diluciones (probadas también por triplicado). Con estas diluciones se construyó una curva estándar (Figura 22 y Figura 23) que sirvió de referencia en la cuantificación bacteriana.

Tabla 20. Microorganismos ensayados para el estudio de especificidad y límite de detección de la PCR-tr.

	Copias	Puntos de corte		
		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>E. coli</i>		NA	NA	NA
<i>P. mirabilis</i>		NA	NA	NA
<i>C. jejuni</i>		NA	NA	NA
<i>Citrobacter spp.</i>		NA	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>		NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i>		NA	NA	NA
<i>Staphylococcus spp.</i>		NA	NA	NA
<i>M. morganii</i>		NA	NA	NA
<i>H. pylori</i> 1	10 ⁷	26,8	27,5	28,5
	10 ⁶	24,5	24,3	25,0
	10 ⁵	19,9	21,2	21,3
	10 ⁴	17,8	18,5	17,7
	10 ³	14,5	15,1	12,7
	10 ²	10,7	11,9	9,8
	10 ¹	7,8	8,9	6,7
<i>H. pylori</i> 2	10 ⁷	27,5	26,7	28,6
	10 ⁶	24,5	24,1	25,3
	10 ⁵	21,3	19,8	21,3
	10 ⁴	17,8	18,7	17,3
	10 ³	14,5	15,1	12,5
	10 ²	11,0	11,5	10,1
	10 ¹	7,8	8,2	7,3
<i>H. pylori</i> 3	10 ⁷	28,3	27,5	26,8
	10 ⁶	25,6	24,3	24,2
	10 ⁵	21,3	21,5	19,9
	10 ⁴	17,5	18,1	17,5
	10 ³	12,5	14,5	14,5
	10 ²	10,5	11,2	11,2
	10 ¹	7,3	7,8	6,9

NA: no amplifica

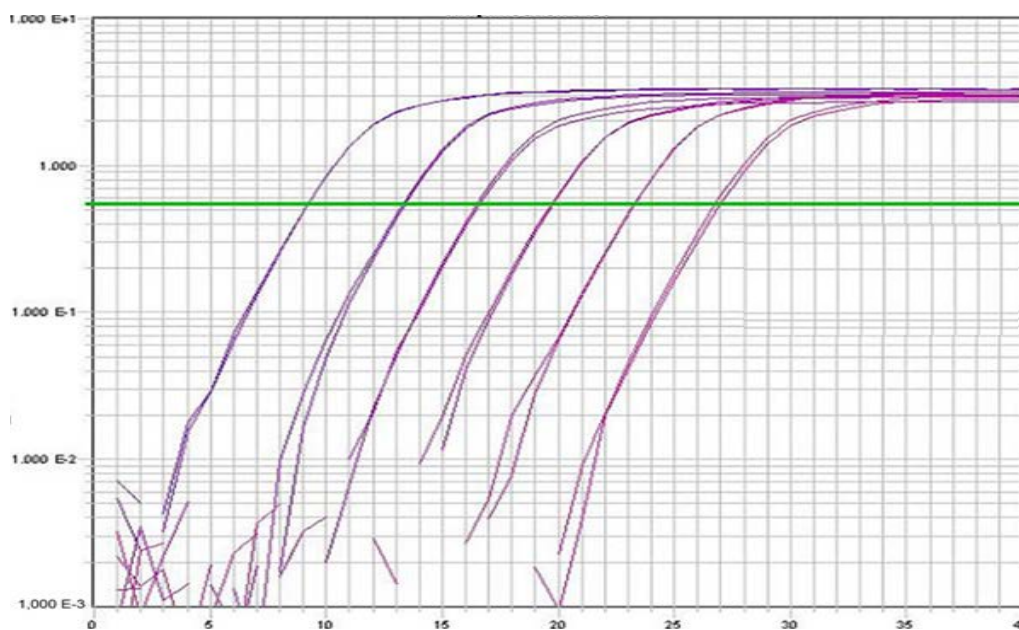


Figura 22. Diluciones de los controles para construir la curva estándar.

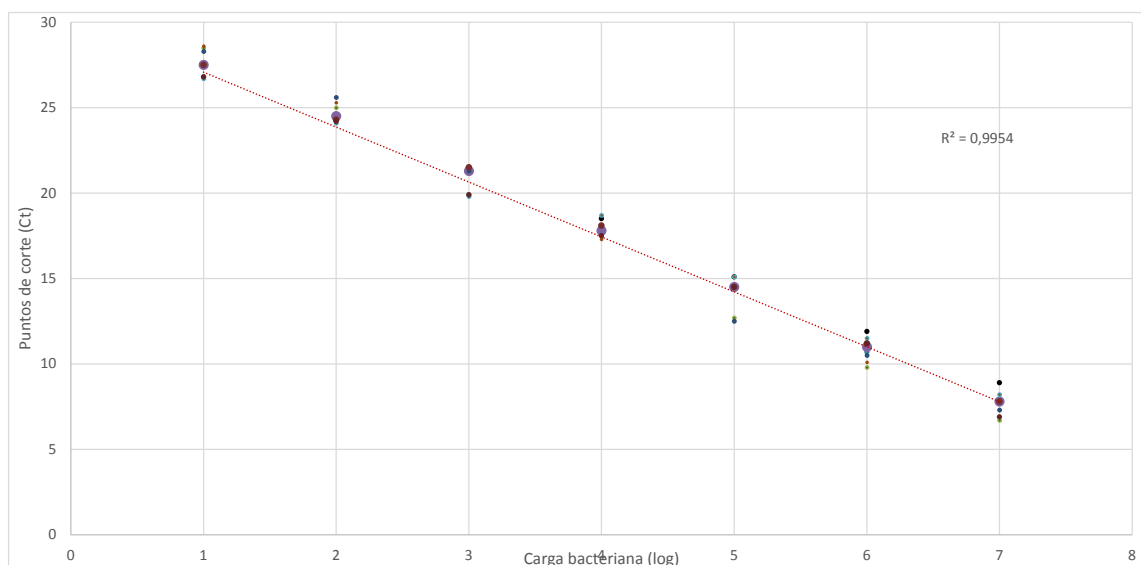


Figura 23. Curva estándar que compara el momento de la amplificación (Ct) con las diluciones de la bacteria.

4.3.1.2. Aplicación de la PCR-tr de diagnóstico a muestras clínicas

Se ensayó la PCR a tiempo real en 199 biopsias tomadas entre febrero y diciembre de 2016, detectando *H. pylori* en 90 (45,2%). En estas mismas muestras se consiguió aislar *H. pylori* en 81 (40,7%) mediante cultivo y en 64 (32,2%) se puso de manifiesto la presencia del microorganismo mediante el test de la ureasa ($p=0,0255$). Combinando los dos métodos tradicionales de diagnóstico (cultivo y test de la ureasa) *H. pylori* fue positivo en un total de 89 (44,7%) pacientes (Tabla 21).

Así pues, y teniendo en cuenta la clínica de los pacientes, se diagnosticó infección por *H. pylori* por cualquiera de los tres métodos (cultivo, test de la ureasa rápida o PCR-tr) en 91 (45,7%) pacientes: en 48 (49,5%) pacientes con enfermedad ulcerosa y en 43 (42,2%) pacientes con enfermedad no ulcerosa (Tabla 21).

Tabla 21. Diagnóstico de *H. pylori* por diferentes métodos en relación con los criterios de erradicación.

	Enfermedad ulcerosa (n=97)	Enfermedad no ulcerosa (n=102)	Total (n=199)
PCR-tr	48 (49,5%)	42 (41,2%)	90 (45,2%)
Cultivo	44 (45,4%)	37 (36,3%)	81 (40,7%)
Test de la ureasa	34 (35,1%)	30 (29,4%)	64 (32,2%)*
Cultivo+test de la ureasa	48 (49,5%)	41 (40,2%)	89 (44,7%)

$p=0,0255$

El porcentaje de biopsias positivas para *H. pylori* según el método de diagnóstico utilizado y los criterios de erradicación del paciente se muestran en la Figura 24.

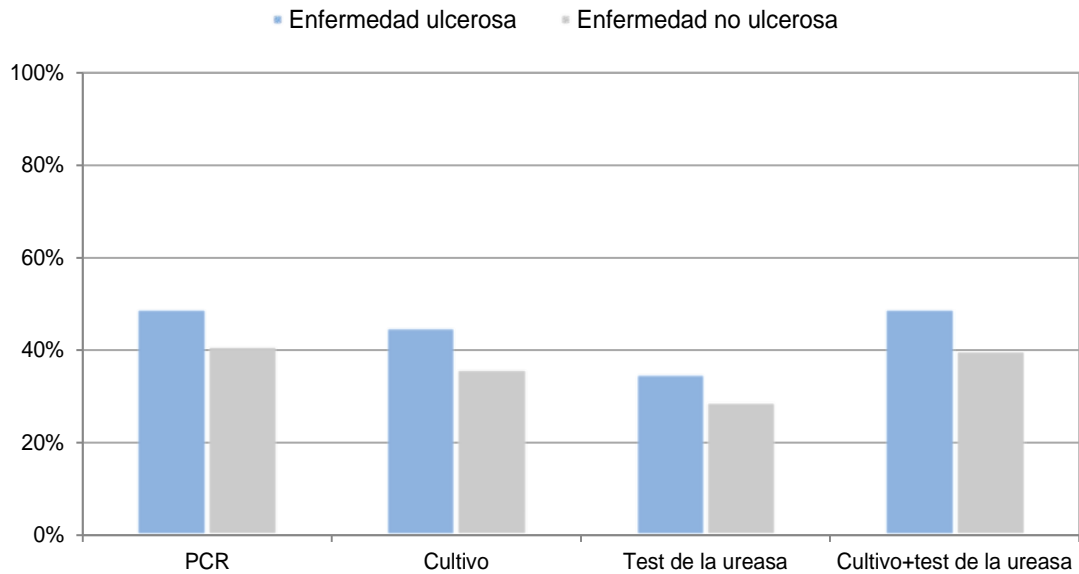


Figura 24. Porcentaje de biopsias con resultado positivo por alguno de los test diagnósticos.

Se obtuvieron resultados concordantes utilizando los dos métodos de diagnóstico tradicionales y la PCR-tr en un total de 196 pacientes (98,4%) (Tabla 22).

Tabla 22. Concordancia entre test diagnósticos.

	Cultivo		Test de la ureasa		Cultivo+Test de la ureasa	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>H. pylori</i> positivo por PCR-tr	80 (40,2%)	10 (5,0%)	63 (31,6%)	27 (13,6%)	88 (44,2%)	2 (1,0%)
<i>H. pylori</i> negativo por PCR-tr	1 (0,5%)	108 (54,3%)	1 (0,5%)	108 (54,3%)	1 (0,5%)	108 (54,3%)

Entre los resultados no concordantes, 10 biopsias fueron positivas por PCR-tr pero negativas por cultivo, 8 de ellas con el test de la ureasa positivo. Una biopsia fue negativa por PCR-tr pero positiva por cultivo y test de la ureasa. La PCR-tr y el cultivo mostraron la mayor concordancia ($kappa=0,887$), seguidos de PCR-tr y el test de la ureasa ($kappa=0,709$) y, por último, cultivo y test de la ureasa ($kappa=0,645$) (Tabla 22).

4.3.1.3. Aplicación de la PCR-tr en una muestra no invasiva

Se aplicó la PCR-tr diseñada sobre 97 exudados faríngeos recogidos en pacientes en los que se realizó el test de la ureasa en aliento, de los cuales éste fue positivo en 25 (25,8%). La PCR-tr para detección de *H. pylori* fue negativa en todas las muestras. En todos los casos se consiguió amplificar el gen de la β -globina, indicando una buena calidad de las muestras y una correcta extracción del ADN.

4.3.1.4. Análisis de la carga bacteriana

En todas las biopsias también se logró la amplificación del gen de la β -globina, indicando una correcta extracción del ADN. La amplificación del gen de la β -globina permitió determinar la cantidad de bacterias por número de células, como se señalaba en el apartado material y métodos.

La carga bacteriana media (expresada como logaritmo de copias de ADN/10⁵ células) fue 3,3±1,0 log (0,7-5,9). En función de los criterios de erradicación de *H. pylori*, la carga bacteriana fue 3,2±1,1 log (0,9-5,7) en pacientes sin enfermedad ulcerosa y 3,4±1,0 log (0,8-5,9) en pacientes con enfermedad ulcerosa (p=0,4847). Teniendo en cuenta el sexo la carga bacteriana fue 3,3±1,0 log (0,8-5,7) en hombres y 3,4±1,1 log (0,9-5,9) en mujeres (p=0,6016). Por grupos de edad, la carga bacteriana de *H. pylori* fue 3,4±0,9 log (1,8-5,9) en pacientes entre 15 y 55 años, 3,2±1,2 log (0,8-5,7) en pacientes entre 56 y 70 años y 3,4±1,1 log (0,9-5,2) en pacientes mayores de 70 años (p=0,9167) (Tabla 23 y Figura 25).

Tabla 23. Carga bacteriana en función de la clínica, el sexo y la edad.

	Carga bacteriana	IC 95%	p
Enfermedad ulcerosa (n=48)	3,2±1,1 log (0,9-5,7)	2,9-3,5	p=0,4847
Enfermedad no ulcerosa (n=41)	3,4±1,0 log (0,8-5,9)	3,1-3,8	
Hombre (n=36)	3,3±1,0 log (0,8-5,7)	2,9-3,6	p=0,6016
Mujer (n=54)	3,4±1,1 log (0,9-5,9)	3,1-3,7	
15-55 años (n=41)	3,4±0,9 log (1,7-5,9)	3,1-3,7	p=0,9167
56-70 años (n=32)	3,3±1,1 log (0,8-5,7)	2,9-3,7	
>70 años (n=17)	3,4±1,1 log (0,9-5,2)	2,8-4,0	

RESULTADOS

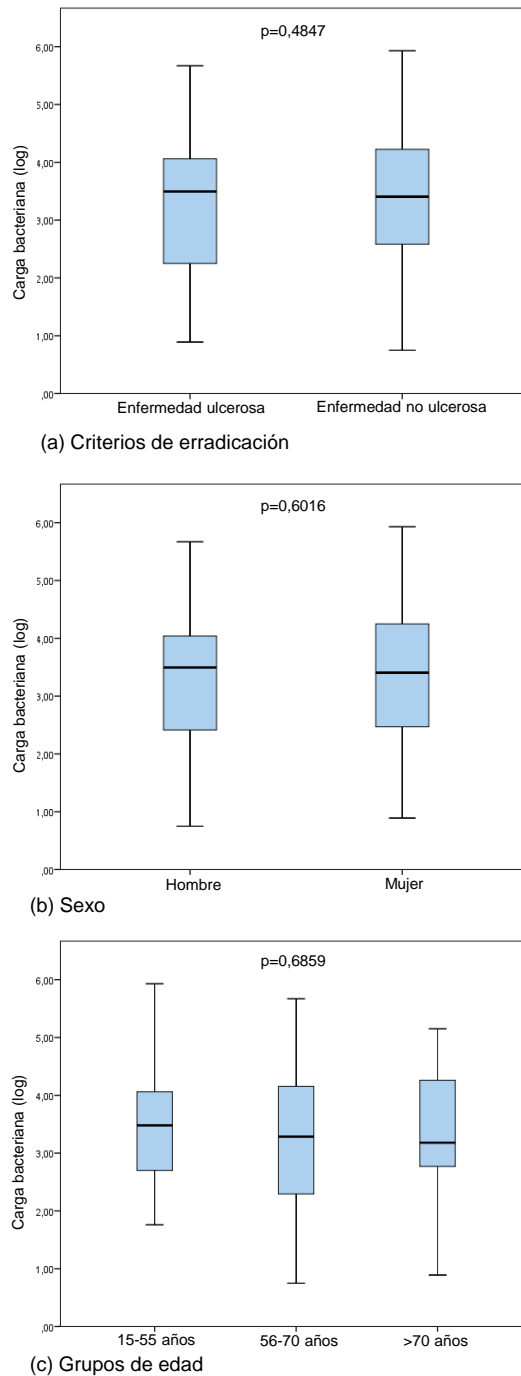


Figura 25. Carga bacteriana de *H. pylori* según los criterios de erradicación, sexo y edad.

La carga bacteriana media para aquellas muestras positivas por el test de la ureasa fue $3,7 \pm 0,9$ log (1,8-5,9; IC 95%: 3,4-3,9) y en las muestras negativas $2,6 \pm 1,1$ log (0,8-4,7; IC 95%: 2,2-3,0) ($p < 0,0001$). Con respecto a los resultados del cultivo, la carga media bacteriana en aquellas muestras en las que se aisló *H. pylori* en el cultivo fue $3,3 \pm 1,0$ log (0,8-5,9; IC 95%: 3,1-3,6) y $3,4 \pm 1,3$ log (1,3-5,7; IC 95%: 2,5-4,3) en las muestras donde no hubo crecimiento bacteriano ($p = 0,8891$).

Se obtuvo un resultado positivo del cultivo en menos de 7 días para 38 (42%) pacientes. La carga bacteriana media para los cultivos positivos antes de 7 días fue $3,4 \pm 0,9$ log (1,7-5,9; IC 95%: 3,1-3,7) y para aquellos en que no se obtuvo el resultado hasta pasados los 7 días fue $3,2 \pm 1,2$ log (0,8-5,7; IC 95%: 3,0-3,6) ($p=0,8261$).

De los 91 *H. pylori* detectados, 2 (2,2%) se diagnosticaron por PCR-tr (1,3 log y 2,9 log). En 33 (36,3%) además de por PCR-tr se diagnosticó *H. pylori* por alguno de los métodos tradicionales (cultivo o test de la ureasa) y la carga bacteriana fue $2,9 \pm 1,2$ log (0,8-5,7; IC 95%: 2,5-3,3). En los 55 (60,4%) casos en que los tres métodos fueron positivos la carga bacteriana fue $3,7 \pm 0,9$ log (1,8-5,9; IC 95%: 3,4-3,9) ($p=0,0005$).

La Figura 26 muestra todos estos datos.

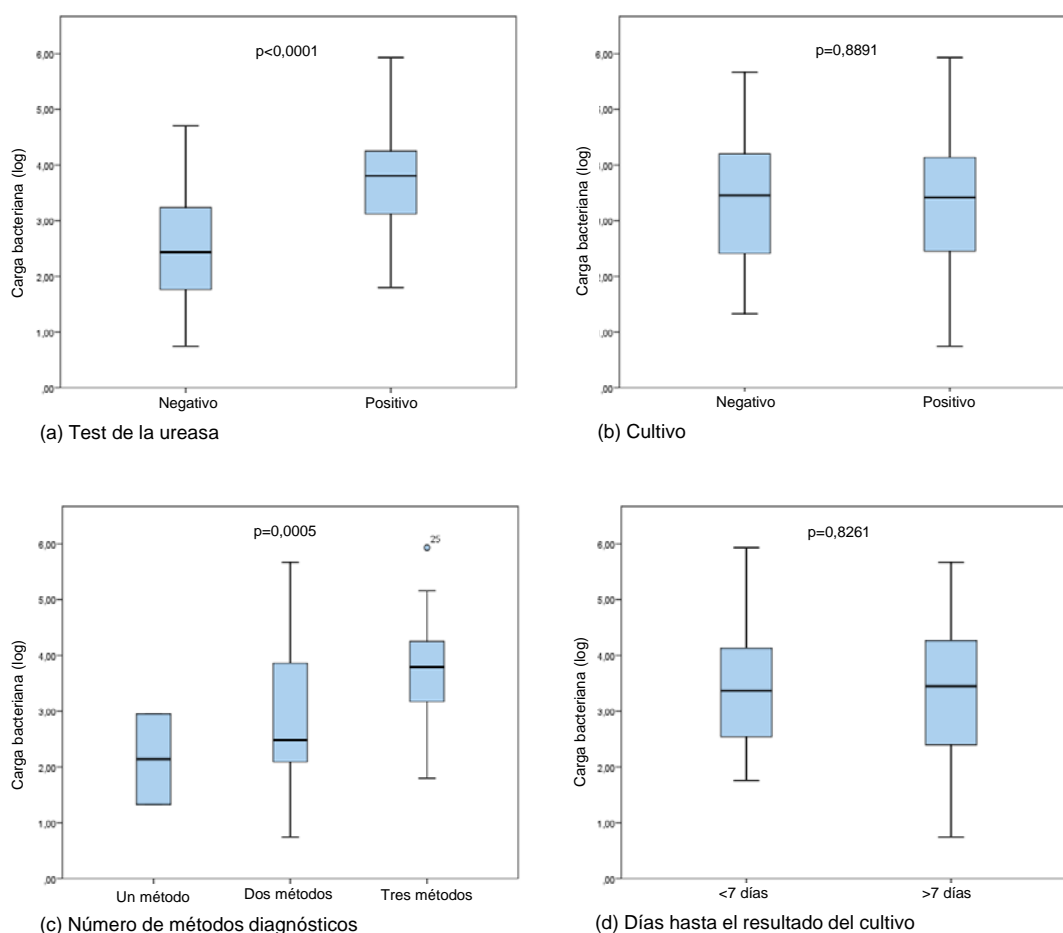


Figura 26. Comparación de la carga bacteriana media de *H. pylori* según los distintos test diagnósticos: (a) muestras con test de la ureasa positivo o negativo; (b) muestras con cultivo bacteriano positivo o negativo; (c) según por cuántos métodos se haya diagnosticado *H. pylori*; (d) según los días de cultivo.

4.3.2. Detección genómica de resistencia a claritromicina por discriminación génica

Se diseñaron cebadores y sonda para detectar la mutación A2143G asociada a resistencia a claritromicina. Esta técnica se aplicó a 135 muestras correlativas en las que la PCR-tr de diagnóstico de *H. pylori* había sido positiva. La mutación se detectó en 27 (20,0%) casos.

Se secuenciaron 53 de estas 135 muestras y la concordancia entre las dos técnicas fue del 81,1% (43/53) (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados comparando las mutaciones encontradas por secuenciación y las encontradas mediante SNPs.

		Secuenciación	
		Mutación A2143G	Cepa salvaje/otras mutaciones
PCR SNPs	Cepa mutante	21 (84,0%)	6 (21,4%)
	Cepa salvaje	4 (16,0%)	22 (78,6%)

De las 135 muestras en las que se aplicó esta técnica 90 fueron sensibles fenotípicamente, 35 resistentes y en 10 no se consiguió realizar el estudio de la sensibilidad fenotípica (Tabla 25).

Tabla 25. Comparación de la sensibilidad fenotípica y la PCR de detección de resistencia a claritromicina.

	PCR SNPs	
	Cepa mutante	Cepa salvaje
Cepas fenotípicamente sensibles (n=90)	-	90 (100%)
Cepas fenotípicamente resistentes (n=35)	27 (77,1%)	8 (22,9%)
Cepas sin sensibilidad fenotípica (n=10)	2 (20,0%)	8 (80,0%)

En 117 (93,6%) muestras el resultado fue concordante por ambos métodos. De las 8 muestras fenotípicamente resistentes en las que no se detectó la mutación A2143G mediante PCR, en 2 casos se conocía mediante secuenciación que esta mutación no estaba presente (una de estas cepas tenía la mutación T2182C). Teniendo en cuenta que estas dos cepas no tienen la mutación detectada mediante PCR, la concordancia entre ambos métodos alcanza el 95,2% (119/125).

Así pues, mediante PCR SNPs la tasa de resistencia a claritromicina detectada fue de 29 (21,5%) de los 135 individuos estudiados.

5. DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es uno de los patógenos más prevalentes a nivel mundial siendo causa de enfermedades digestivas como gastritis, úlcera péptica, linfoma tipo MALT o cáncer gástrico, y su erradicación está relacionada con una disminución en la prevalencia de estas enfermedades (Roberts et al. 2016). En el año 2015 *H. pylori* infectaba aproximadamente a 4500 millones de personas en el mundo, un 60% de la población mundial. En las últimas décadas se ha observado una tendencia a disminuir esta prevalencia en los países occidentales. En un meta-análisis publicado en el año 2017 en el que se incluyeron 184 estudios de 62 países se documenta una disminución en la prevalencia de *H. pylori* a partir del año 2000 del 16% en América del Norte, del 8% en Oceanía y el 9% en Europa, no observándose esta disminución en las zonas con mayor prevalencia (Asia, África y Sudamérica) (Hooi et al. 2017). En este trabajo se analizaron los datos de la infección por *H. pylori* en los últimos 13 años (2004-2016) en el área sanitaria III de Asturias (Hospital Universitario San Agustín). Después de analizar más de 3000 biopsias se evidenció que la prevalencia de esta infección prácticamente alcanzaba el 50% de la población estudiada, comprobando así la alta prevalencia que se indicaba anteriormente. También se pudo constatar que esa prevalencia disminuyó desde el 63% en el primer año del estudio hasta el 37% en el último. Aunque este dato esté en consonancia con otros artículos publicados, hay que tener en cuenta que en los últimos años, la población a estudio se duplicó debido a la actualización en las indicaciones de tratamiento de la infección, aumentando las patologías en las que se considera que *H. pylori* podría estar implicado, y a la tendencia al alza a instaurar un tratamiento dirigido según antibiograma frente a un tratamiento empírico. De hecho, el número de casos brutos aumentó con el tiempo. Los próximos años pueden determinar si realmente estamos o no ante una disminución de esta infección.

VARIABLES COMO LA EDAD, EL SEXO O CIERTAS PATOLOGÍAS SE HAN RELACIONADO CON UNA MAYOR O MENOR PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*. COMO SE COMENTABA EN EL APARTADO DE INTRODUCCIÓN DE ESTA TESIS, ESTÁ DEMOSTRADO QUE CIERTAS PATOLOGÍAS ESTÁN RELACIONADAS CON ESTA INFECCIÓN AUNQUE EN OTRAS LA RELACIÓN ESTÁ EN ENTREDICHO. A ESTE RESPECTO, EN UN PRIMER ANÁLISIS DE LOS DATOS LOS INDIVIDUOS SE CLASIFICARON ENTRE AQUELLOS QUE TENÍAN CLÍNICA DE ENFERMEDAD ULCEROSA Y AQUELLOS QUE NO LA TENÍAN. COMO ERA DE ESPERAR SE AISLÓ *H. PYLORI* EN MAYOR PROPORCIÓN EN AQUELLOS PACIENTES CON ENFERMEDAD ULCEROSA Y, DENTRO DEL GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD ULCEROSA, EN AQUELLOS PACIENTES CON ÚLCERA DUODENAL O DUODENITIS EROSIVA. SIN EMBARGO NINGUNA

DISCUSIÓN

otra entidad clínica parece destacar dentro de esta división realizada. Llama la atención el elevado porcentaje de cultivos positivos en aquellos pacientes en los que el criterio de erradicación registrado fue “antecedentes familiares de carcinoma gástrico”. Probablemente estos pacientes presentaban además otra clínica y se trate de una limitación a la hora del registro en la historia del paciente. No se encontraron diferencias con respecto al porcentaje de aislamientos de *H. pylori* en función del sexo o la edad. Un meta-análisis reciente relaciona el sexo masculino con una mayor prevalencia de *H. pylori* (Ibrahim et al. 2017), sin embargo en este estudio no se pudo comprobar este punto. También se ha descrito una mayor prevalencia en población pediátrica (Tamayo et al. 2017). El grupo de pacientes pediátricos no se incluye en este estudio, sin embargo, aunque los resultados no son concluyentes, se observa una tasa de infección ligeramente más alta en los pacientes menores de 55 años.

La evolución en los tratamientos para erradicar la infección por *H. pylori* durante los últimos 20 años ha traído consigo una disminución en la prevalencia de la infección así como de las enfermedades asociadas (Roberts et al. 2016). Sin embargo hoy en día el éxito de estos tratamientos se ve comprometido por el aumento de las resistencias de *H. pylori* a los distintos antimicrobianos (Mégraud & Lehours 2007). Aunque las resistencias antimicrobianas no son la única razón para el fallo de un tratamiento erradicador, sí son el factor más importante. El uso indiscriminado que se ha hecho de los antibióticos en los últimos años, ha provocado un aumento en las tasas de resistencia a los antimicrobianos que supone un grave problema a nivel mundial. En el caso de *H. pylori* el aumento en la resistencia ha llevado a que en los últimos consensos sobre manejo de la infección por *H. pylori* ya no se recomiende como tratamiento empírico de primera línea la triple terapia clásica (inhibidor de la bomba de protones junto con amoxicilina y claritromicina), sino una terapia cuádruple que incluye IBP, amoxicilina, claritromicina y metronidazol en zonas donde la resistencia a claritromicina sea mayor del 15-20% (Gisbert et al. 2016; Malfertheiner et al. 2016).

La estrategia de tratar empíricamente la infección por *H. pylori* cuenta tanto con defensores como con detractores. En la primera Conferencia de Consenso de Maastrich (Malfertheiner et al. 2002) únicamente se sugería la posibilidad del tratamiento dirigido según el antibiograma en casos de fallo de tratamiento. Diversos estudios sobre este tema muestran resultados contradictorios: Gasbarrini et al. reportan un 77% de erradicación del microorganismo cuando se

trata según antibiograma frente al 52% si el tratamiento es empírico en pacientes con dos fallos de tratamiento (Gasbarrini et al. 2000) y Yahav et al. indican una mejora en la tasa de erradicación cuando se trata según antibiograma en pacientes con un fallo de tratamiento del 23% (Yahav et al. 2006). Sin embargo dos estudios españoles no confirman estos datos y obtienen tasas de erradicación de sólo el 60% cuando tratan según antibiograma (Gomollon et al. 2000; Vicente et al. 2002). Más recientemente se han publicado mejores tasas de erradicación en pacientes “naïve” al tratar según antibiograma, con una disminución del coste por paciente de unos 95€ (Wenzhen et al. 2010; Cosme et al. 2012; Cosme et al. 2017). Esta estrategia de tratar según el antibiograma favorece además un control en el consumo de antibióticos.

En cualquier caso, para un correcto uso de los antibióticos es importante conocer los datos en cada entorno. En el presente estudio se llevó a cabo un análisis de las resistencias a los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori* en las cepas aisladas (claritromicina, metronidazol y levofloxacino). La tasa global de resistencia a los tres antibióticos testados es alta, casi la mitad de las cepas (hasta el 48%) presentaban resistencias a alguno de los fármacos empleados en la erradicación de este microorganismo, datos similares a los publicados en otros estudios Europeos (S. Agudo et al. 2010; Mégraud et al. 2013; Tamayo et al. 2017). A diferencia de la prevalencia de la infección, la resistencia a los antibióticos se mantiene estable a lo largo del período de estudio, lo cual puede plantear cierta preocupación ya que como se comentaba anteriormente, el número de pacientes estudiados se ha duplicado en los últimos años.

La tasa de resistencia a claritromicina, aunque se mantiene estable durante los años analizados, aumentó hasta alcanzar a 1 de cada 5 pacientes estudiados (20%) con respecto a un estudio previo llevado a cabo en el mismo entorno en el año 1999 en el que la tasa de resistencia a claritromicina fue del 4% (Gisbert & María Pajares 2001). Como en la prevalencia de la infección, está descrito que variables como la edad, el sexo o la clínica pueden influir en la tasa de resistencias. Sin embargo en este trabajo no se encontraron diferencias en la resistencia a claritromicina según la edad de los pacientes, pero si en función del sexo, siendo significativamente mayor en mujeres que en hombres. Probablemente la explicación esté en el uso de los macrólidos para tratar infecciones ginecológicas, más frecuentes entre las mujeres (Boyanova et al. 2012). Mégraud et al. describen una asociación significativa entre el uso de

macrólidos y la resistencia a claritromicina (Mégraud & Lehours 2007), al igual que un estudio llevado a cabo en el sur de España en el año 2015 (Navarro-Jarabo et al. 2015). Otros trabajos no describen diferencias en función del sexo, sino de la edad (S. Agudo et al. 2010; Macías-García et al. 2017).

La resistencia encontrada a metronidazol es comparable a otros trabajos Europeos permaneciendo relativamente estable durante el período de estudio (Mégraud et al. 2013). Esta tasa de resistencia varía entre países, principalmente según el uso de este fármaco para tratar enfermedades parasitarias, infecciones por anaerobios o ginecológicas. Su uso para el tratamiento de infecciones ginecológicas se refleja en algunos trabajos como una mayor tasa de resistencia en mujeres (John Albert et al. 2006) aunque no es el caso del presente estudio. A pesar de la elevada resistencia a metronidazol encontrada (40%), hay que tener en cuenta que no es un factor determinante a la hora del fallo de los tratamientos erradicadores. La resistencia *in vitro* a metronidazol no siempre se confirma *in vivo*, debido, entre otras cosas al sinergismo de este fármaco con el bismuto (Malfertheiner et al. 2011). En el caso del metronidazol la edad por debajo de 70 años se relacionó con mayores tasas de resistencia lo que puede deberse a su uso frecuente en el tratamiento de las infecciones por anaerobios y parásitos en pacientes jóvenes.

Con respecto a levofloxacino datos recientes muestran un aumento en las tasas de resistencia en Europa con una variación importante entre países: desde el 4% en Croacia al 28% en Bélgica, pasando por el 14% en España (Cuadrado-Lavín et al. 2012; Navarro-Jarabo et al. 2015). En este estudio la tasa de resistencias alcanzó un preocupante 17%. Además de la alta tasa de resistencia a levofloxacino, se pone de manifiesto su relación con la edad, siendo superior al 25% en mayores de 70 años. Este aumento se podría explicar por el uso de estos fármacos en el tratamiento de infecciones respiratorias, fundamentalmente en pacientes de mediana edad (Mégraud et al. 2013). En el último programa sobre el uso de antibióticos en Europa, España fue uno de los países con mayor consumo de quinolonas, con una dosis diaria por cada 1000 habitantes día entre 2 y 3 (Weist et al. 2012). Un estudio multicéntrico llevado a cabo en Andalucía detecta variabilidad en las tasas de resistencia entre los distintos centros, únicamente explicables con diferencias en el uso de macrólidos y quinolonas entre centros (Navarro-Jarabo et al. 2015). Estos datos plantean la necesidad de realizar más estudios multicéntricos que relacionen las tasas de resistencia con el consumo de antimicrobianos. Aunque la triple terapia

incluyendo levofloxacino se recomienda como tratamiento de segunda línea en la mayoría de las guías, teniendo en cuenta que la tasa de resistencia encontrada es superior al 15%, parece obvia la necesidad de controlar la evolución de la resistencia a este fármaco.

Con respecto a la distribución de las CMI de cada antibiótico, en el caso de la claritromicina las cepas sensibles están muy por debajo del punto de corte, las CMI de las cepas sensibles para levofloxacino están más repartidas por debajo del corte y la distribución de CMI de metronidazol es continua y cercana al punto de corte, tal y como habían reflejado otros estudios (Megraud et al. 2013; Alarcón et al. 2017).

Si la resistencia a cada antimicrobiano individualmente es alta, tampoco se debe obviar la tasa de multiresistencia, aunque en este estudio no fue tan alta como cabría esperar. Se encontraron un 9% de pacientes con cepas con resistencia conjunta a claritromicina y metronidazol, similar a la encontrada en otros trabajos (Molina et al. 2013). Teniendo en cuenta la resistencia frente a ambos antibióticos por separado, no se trata de una tasa de resistencia conjunta muy alta por el momento. Así pues, su uso combinado dentro de la terapia cuádruple propuesta como primera línea de tratamiento empírico en el último consenso español, parece una buena opción, cuando no se realice tratamiento dirigido según antibiograma al menos en nuestro entorno. Tampoco fueron altas las tasas de resistencia de las otras combinaciones de antibióticos: 7% para levofloxacino y metronidazol y 4% para claritromicina junto con levofloxacino. La resistencia conjunta a los tres fármacos no alcanzó el 2%.

La resistencia de *H. pylori* a claritromicina se asocia principalmente con mutaciones puntuales en la región peptidiltransferasa del gen 23S ARNr. Las tres mutaciones que se relacionan con más frecuencia con resistencia a claritromicina son A2143G, A2142G y A2142C (Versalovic et al. 1997). Kim et al. en el año 2002 describen otra mutación en la posición T2182C que relacionan con resistencia a claritromicina, relación confirmada por Khan et al. en 2004 (Kim et al. 2002; Khan et al. 2004). Cambios en distintas posiciones también han sido descritos por otros autores.

Para conocer los posibles cambios genómicos asociados a resistencia a claritromicina se caracterizó un fragmento del dominio V del gen 23S del ARNr entre los nucleótidos 1701 a 2427 en 63 individuos de los cuales 38 eran fenotípicamente resistentes. Al menos una de las mutaciones A2142G/C, A2143G y T2182C se encontró en el 82% de las cepas fenotípicamente

DISCUSIÓN

resistentes a claritromicina. La mutación más frecuente fue la A2143G que se detectó en 27 (87%) de las 31 cepas resistentes en las que se evidenció alguna mutación, lo que corrobora su importancia en la resistencia a claritromicina. La mutación T2182C se observó en 7 cepas pero en 5 de ellas asociada a la mutación mayoritaria A2143G. Por otra parte, una de las cepas fenotípicamente sensibles también tenía la mutación T2182C, lo que plantea la necesidad de estudios con un mayor tamaño muestral para confirmar el papel de esta mutación o desarrollar estudios que impliquen un seguimiento de los pacientes para evaluar su respuesta al tratamiento. Finalmente, también se encontraron las mutaciones A2142G y A2142C (en un caso cada una). En esta tesis el fragmento a secuenciar se diseñó teniendo en cuenta los cambios en las mutaciones descritos por De Francesco et al. en el año 2014, donde las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 sólo se encontraron en el 55% de los aislamientos resistentes a claritromicina y se describen otras mutaciones como responsables de dicha resistencia: A2115G, G2141A y A2144T (De Francesco et al. 2014). Estos resultados no se corroboraron en este estudio. Por otra parte, cambios en las posiciones C2694A y T2717C también se han relacionado con resistencia de bajo nivel a claritromicina (Fontana et al. 2002; Rimbara et al. 2008). Estas posiciones no se incluyen en el fragmento secuenciado en el estudio, lo que plantea la necesidad de ampliar la caracterización de otros fragmentos que puedan explicar ese casi 20% de cepas fenotípicamente resistentes donde no se encuentran cambios relevantes. En cualquier caso, no hay que perder de vista que en la resistencia a claritromicina también están implicados otros mecanismos tales como bombas de expulsión activa o metilaciones en el ARN por lo que el estudio genotípico de mutaciones podría no justificar el 100% de resistencias fenotípicas (De Francesco et al. 2011; Nishizawa et al. 2014).

Además de las mutaciones en las posiciones 2142, 2143 y 2182 se encontraron cambios genotípicos presentes en más del 10% de las cepas y diferentes a la cepa de referencia en 6 posiciones que implican 5 cambios aminoacídicos. Ninguno de ellos se relacionó con las cepas fenotípicamente resistentes a claritromicina. Todas las cepas presentan un polimorfismo que las diferencia de la cepa de referencia del GenBank, un cambio G por A en la posición 2167 que podría indicar una cepa específica del entorno geográfico del estudio.

En 24 cepas se logró estudiar el fragmento del ARNr 23S tanto de la muestra como del cultivo, 16 de ellas fenotípicamente resistentes. En 9 de estas 16 cepas resistentes los resultados de

caracterización coincidieron en las cepas provenientes de la muestra directa y del cultivo. Sin embargo, en 7 casos se encontró población mixta (resistente y sensible) en la muestra directa y sólo la cepa sensible en los cultivos. Parece por tanto aconsejable realizar los estudios de sensibilidad genotípica a partir de la muestra directa y no de la cepa obtenida del cultivo, evitando sesgos innecesarios provocados por los subcultivos en placas sin presión antibiótica, que podrían seleccionar las cepas con mejor rendimiento adaptativo (habitualmente cepas sensibles).

La presencia de poblaciones mixtas o heterorresistencia no es un hecho infrecuente. Un estudio llevado a cabo por De Francesco et al. refiere un 76% de heterorresistencia cuando se trabaja sobre muestra directa, datos compartidos con Mascellino et al. que describen un 71% (De Francesco et al. 2009; Mascellino et al. 2017). En el presente estudio la tasa de heterorresistencia es menor, un 9% a partir de cepa y un 40% a partir de muestra, teniendo siempre en cuenta la limitación del escaso tamaño muestral. Datos similares encuentran Cambau et al. y Monno et al. con un 33 y un 37% de heterorresistencia respectivamente (Cambau et al. 2009; Monno et al. 2012). En cualquier caso la heterorresistencia es un hecho y el objetivo es determinar cuál sería el mejor manejo del paciente basándose en datos fiables y lo más precisos posibles. Poder demostrar una población resistente, por muy minoritaria que sea, evitará posibles fracasos del tratamiento.

Aunque los métodos convencionales de control de la infección y resistencia antibiótica arrojan datos válidos, las nuevas tecnologías proporcionan resultados de manera más rápida, y generalmente, con mayor sensibilidad, permitiendo actuar con más precisión y mejores rendimientos.

El diagnóstico clásico de *H. pylori* combina métodos invasivos y no invasivos para paliar las limitaciones en cuanto a sensibilidad y/o especificidad de cada método por separado (Pourakbari et al. 2013). La combinación de dos técnicas invasivas, el test de la ureasa rápida y el cultivo, se considera el patrón de oro desde el punto de vista microbiológico. El cultivo tiene la gran ventaja de permitir realizar el estudio de sensibilidad así como obtener y conservar las cepas para futuros estudios y comprobaciones, pero tiene el inconveniente de ser lento y laborioso debido a la naturaleza fastidiosa de *H. pylori*, que requiere condiciones específicas para su cultivo y largos tiempos de incubación, y podría no poner de manifiesto el fenómeno de heterorresistencia, como

se comentó anteriormente (Mégraud et al. 2014; Patel et al. 2014). El otro método tradicional invasivo, el test de la ureasa rápida, tiene la ventaja de proporcionar resultados en 24-72 horas o incluso en 2-3 horas (Mégraud & Lehours 2007; Wang et al. 2015) pero su principal limitación es que se necesitan al menos 10^5 bacterias para lograr una buena sensibilidad y ésta varía significativamente de unos estudios a otros (Al-Moayad et al. 2014).

Desde los años 90 se han desarrollado técnicas moleculares para diagnóstico de *H. pylori* sobre muestras de biopsia gástrica con buenos resultados de sensibilidad y especificidad tomando como referencia el cultivo (Hoshina et al. 1990; Clayton et al. 1991; Clayton et al. 1992). Estas técnicas permiten el diagnóstico de pacientes que no han respetado los tiempos sin consumir antibióticos e inhibidores de la bomba de protones previos a la gastroscopia, o pacientes con úlceras sangrantes, en los que se podrían obtener falsos negativos por los métodos tradicionales (Saez et al. 2012) y en aquellas muestras mal recogidas o con poca carga bacteriana que limitaría el éxito del cultivo. En este estudio se ha desarrollado una técnica de amplificación genómica a tiempo real (PCR-tr) que permite la cuantificación normalizada de *H. pylori* sobre muestra de biopsia gástrica cuando se toma de referencia el gen de la β -globina humana (Álvarez-Argüelles et al. 2015) obteniéndose resultados en 2-3 horas con una especificidad del 100% y un límite de detección de 10 copias. La sensibilidad de la técnica desarrollada es prácticamente igual a la obtenida cuando se combinan los dos métodos clásicos de diagnóstico (cultivo y test de la ureasa rápida) y la concordancia de casi el 100%. Sin embargo si la PCR-tr se compara con cada uno de estos métodos por separado la sensibilidad es mayor que la del cultivo y significativamente mayor que la de la ureasa. Solamente en un paciente se detectó *H. pylori* por los métodos clásicos y no por amplificación genómica. Teniendo en cuenta que la identificación se basó en la tinción de Gram y técnicas bioquímicas, no se puede descartar que esta cepa aislada no se tratase de una cepa de *Helicobacter* "no *pylori*". Esta hipótesis no se pudo confirmar al no disponer de la cepa. También hay que tener en cuenta la distribución irregular de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica que puede explicar que el microorganismo se encuentre en uno de los fragmentos procesados pero no en el otro. Aunque la sensibilidad de la PCR-tr sea prácticamente igual que la del cultivo, su gran ventaja es la rapidez, ya que se pueden obtener resultados en horas, mientras que para informar el resultado del cultivo se necesitan más de 7 días en el 80% de los pacientes. Además, con el método ensayado el

resultado se consigue por menos de 1€ por muestra. Este precio podría encarecerse con la utilización de sistemas de extracción automáticos (del orden de 6€), pero siempre por debajo de otros abordajes diagnósticos disponibles en el mercado. El test de la ureasa rápida se podría comparar con la PCR-tr en cuanto a tiempo de respuesta pero como ya se ha comentado su sensibilidad es significativamente menor. Por lo tanto, ante una clara sospecha diagnóstica, al menos las muestras en las que no se detecte la presencia del microorganismo deberían abordarse mediante métodos más sensibles y en este punto la amplificación genómica sería una buena alternativa.

Los resultados de la técnica de PCR-tr desarrollada se pueden relacionar con una curva de referencia del gen de la β -globina humana y expresar la cantidad de bacterias en la muestra como copias de bacteria por cada 10^5 células. Esta normalización permite la comparación entre distintas muestras del mismo o distintos pacientes al hablarse de números relativos a un denominador común. La amplificación del gen de la β -globina permite también comprobar la calidad de la muestra. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas moleculares que permiten el diagnóstico y la cuantificación de *H. pylori* y han relacionado la carga bacteriana con distintas variables (Saez et al. 2012; Belda et al. 2012; Al-Moayad et al. 2014). En este estudio la carga bacteriana fue significativamente menor en aquellos pacientes en que el diagnóstico se realizó sólo por una de las técnicas clásicas, siendo la otra negativa. Además, en los casos donde sólo la PCR-tr demostró la presencia del microorganismo, la carga bacteriana fue de las más bajas encontradas. Es lógico pensar que si el diagnóstico se puede realizar por el mayor número de técnicas, las carencias de sensibilidad de unas y otras se neutralizan por la presencia de gran cantidad de microorganismos, que es lo que comprobamos en este trabajo. En los casos donde la bacteria se puso de manifiesto por más de un método, la carga bacteriana fue más alta, superando los 3,4 log con un intervalo de confianza del 95%. Estos resultados coinciden con los publicados por Shukla et al. que además encuentran diferencias significativas con respecto a los daños histológicos de los pacientes (Shukla et al. 2011). Históricamente se ha relacionado la densidad o carga bacteriana de *H. pylori* según la clasificación histológica de Sydney (Price 1991) con una mejor o peor respuesta al tratamiento (Sato et al. 1991; Sheu et al. 1996). Varios estudios encuentran diferencias significativas utilizando PCR cuantitativa con respecto a la carga bacteriana entre los grados I y III de la clasificación de Sydney (Gazi et al.

2013; Kalach et al. 2015). En este estudio no se encontraron diferencias con respecto a la carga bacteriana en relación con la clínica pero hay que tener en cuenta que una de las limitaciones de este trabajo es la falta de homogeneidad a la hora de recoger las características clínicas de los pacientes debido al largo período de estudio, que hace en ocasiones difícil acceder a los datos de la historia clínica. Cabe esperar que estudios de este tipo, con mayor número de pacientes haciendo hincapié en un buen registro de la clínica del paciente puedan revelar diferencias en la carga bacteriana según los criterios de erradicación o la histología. Estudios de seguimiento de los pacientes testados también podrían poner en valor el uso de la carga bacteriana, como se afirmaba anteriormente.

Así pues, se ha desarrollado una PCR-tr cuantitativa con muy buenos resultados a nivel de sensibilidad y especificidad, barata y de fácil realización pero con dos inconvenientes o limitaciones: por una parte y al igual que en el diagnóstico microbiológico clásico, la muestra utilizada sigue siendo una muestra invasiva y de difícil obtención, y por otra no permite el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, ventaja que sigue aportando el cultivo.

Para intentar solucionar el primer inconveniente y aportar una mejora con respecto al diagnóstico clásico en el abordaje del paciente, se probó esta PCR-tr en una muestra no invasiva y durante un período de 6 meses se recogieron los exudados faríngeos de pacientes que acudieron a hacerse el test de la ureasa en aliento. Algunos estudios reportan buenos resultados en muestras no invasivas como exudados faríngeos o heces (Fellmann et al. 2014; Khadangji et al. 2017). En el presente trabajo 25 pacientes tenían una reacción positiva para la detección de la ureasa en aliento y sin embargo en ninguno de ellos se detectó la bacteria por PCR-tr, Así pues, el exudado faríngeo no resultó una buena muestra para diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante la técnica desarrollada. Habría que plantear el aplicar la técnica en otra muestra no invasiva como las heces, con la que parecen obtenerse mejores resultados (Khadangji et al. 2017).

En cuanto a la segunda limitación de la técnica, se decidió comenzar los ensayos por el estudio genómico de resistencias a claritromicina porque la tasa de resistencia a levofloxacino por ahora es baja y porque a pesar de la alta tasa de resistencias descrita a metronidazol, no es un factor fundamental a la hora del fallo de tratamientos para erradicar *H. pylori*, como ya se

había comentado. Así pues, se diseñó y desarrolló una técnica de detección molecular que permitiera la detección de la mutación A2143G, mutación presente en casi el 90% de las cepas resistentes relacionadas con cambios genómicos. Existen numerosas técnicas moleculares que permiten la detección de mutaciones puntuales asociadas a resistencia a claritromicina, la mayoría de ellas basadas en el análisis de la temperatura de fusión (T_m), lo que dificulta su interpretación (Chisholm & Owen 2008). Otras técnicas son más laboriosas o utilizan tecnología que no está al alcance de todos los laboratorios (Furuta et al. 2007; Burucoa et al. 2008, Nishizawa et al. 2014). También existen técnicas comerciales, con un precio elevado (Cambau et al. 2009). En este estudio la técnica elegida fue la discriminación génica, donde un cambio en un nucleótido permite distinguir entre población salvaje o mutante. La concordancia de la técnica ensayada y la caracterización clásica por secuenciación sobre 53 cepas fue buena y ambas técnicas se complementan, puesto que las dos lograron detectar alguna cepa con mutación que la otra obvió. En cuanto a la relación con los estudios de sensibilidad fenotípica, la discriminación génica logró detectar 27 casos de las 33 cepas fenotípicamente resistentes. Además, con este método se detectaron 2 cepas resistentes en las que no se había conseguido realizar el estudio fenotípico de sensibilidad debido a un crecimiento insuficiente de la cepa. La técnica aquí desarrollada es sencilla, basada en tecnología de uso habitual en cualquier laboratorio en el que se lleven a cabo técnicas de biología molecular, rápida y de bajo coste, con un precio por muestra aproximado de 2€.

En resumen, la prevalencia de *H. pylori*, aunque parece tener una tendencia descendente, aún sigue en niveles altos y la resistencia a los antibióticos no disminuye. Esta resistencia tiene en la mayoría de los casos una base genética. La aplicación de las nuevas tecnologías basadas en análisis genómico permite determinar más rápidamente estas resistencias así como aumentar la capacidad diagnóstica. Desde el punto de vista microbiológico la mejora y el desarrollo de nuevas técnicas que proporcionen el mayor número de datos, así como la búsqueda de nuevas muestras no invasivas que permitan el diagnóstico de forma más sencilla y cómoda son los retos a afrontar en un futuro inmediato.

6. CONCLUSIONES

1. La tasa de infección por *Helicobacter pylori* fue alta, tanto en hombres como en mujeres y en todos los grupos de edad, y disminuyó a lo largo del período de estudio.
2. La enfermedad ulcerosa se relacionó con una mayor presencia de *Helicobacter pylori* que otras patologías.
3. Las tasas de resistencia a los antibióticos testados fueron altas y constantes a lo largo del período de estudio y no se relacionaron con la clínica de los pacientes. Si se observó que el porcentaje de resistencias a claritromicina fue mayor en mujeres, a levofloxacin mayor en jóvenes y a metronidazol en mayores.
4. Las mutaciones asociadas a resistencia a claritromicina fueron la A2142C/G, A2143G y T2182C, donde la A2143G fue la más frecuente. No se encontraron cambios importantes en otras posiciones del fragmento del gen ARNr 23S estudiado.
5. La técnica de detección genómica diseñada para detección de *Helicobacter pylori* permitió el diagnóstico rápido, fiable y económico, incluso en muestras con baja carga bacteriana.
6. La carga bacteriana fue mayor en aquellas muestras donde el microorganismo se evidenció por más de dos técnicas diagnósticas.
7. La muestra de exudado faríngeo no resultó rentable para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.
8. La técnica de discriminación génica diseñada para la detección de resistencia a claritromicina, rápida y económica, tiene elevada concordancia con la sensibilidad fenotípica

BIBLIOGRAFÍA

- Agudo, S. et al., 2010. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), pp.3703–3707. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668128> [Accessed March 29, 2018].
- Al-Moayad, E.E. et al., 2014. Normalized real-time PCR for diagnosis of *H. pylori* infection. *Qatar Medical Journal*, 2014(2), p.19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25745602> [Accessed November 22, 2016].
- Alarcón, T. et al., 2017. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(5), pp.278–282. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X1600080X> [Accessed June 27, 2017].
- Alm, R.A. et al., 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715), pp.176–180. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9923682> [Accessed January 12, 2018].
- Álvarez-Argüelles, M.E. et al., 2015. Quantification of *Human papilloma virus* (HPV) DNA using the Cobas 4800 system in women with and without pathological alterations attributable to the virus. *Journal of Virological Methods*, 222, pp.95–102.
- Belda, S. et al., 2012. Quantification of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by real-time polymerase chain reaction: comparison with traditional diagnostic methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(3), pp.248–252.
- Boyanova, L. et al., 2012. Numerous risk factors for *Helicobacter pylori* antibiotic resistance revealed by extended anamnesis: A Bulgarian study. *Journal of Medical Microbiology*, 61(1), pp.85–93. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873378>.
- Burucoa, C. et al., 2008. Quadruplex Real-Time PCR Assay Using Allele-Specific Scorpion Primers for Detection of Mutations Conferring Clarithromycin Resistance to *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), pp.2320–2326. Available at: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02352-07> [Accessed February 17, 2018].
- Cambau, E. et al., 2009. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*, 47(11), pp.3600–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759218> [Accessed November 22, 2016].
- Cavalier-Smith, T., 2002. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), pp.7–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837318> [Accessed January 10, 2018].
- Cervantes-García, E., 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio*, 63(2), pp.100–109. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ptol/pt-2016/pt-2016162h.pdf> [Accessed January 12, 2018].
- Chen, H.-N. et al., 2016. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. *Gastric Cancer*, 19(1), pp.166–175. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609452> [Accessed January 8, 2018].
- Chey, W.D., Wong, B.C.Y. & Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology, 2007. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(8), pp.1808–1825. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17608775> [Accessed December 10, 2017].
- Chisholm, S.A. & Owen, R.J., 2008. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Diagnostic Microbiologic and Infectious disease*, 61(1), pp. 67–71. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248939> [Accessed February 15, 2017].
- Chomvarin, C. et al., 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1), pp.30–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548220> [Accessed January 12, 2018].
- Cirak, M.Y., Akyön, Y. & Mégraud, F., 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 12 Suppl 1, pp.4–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727453>.

- Clayton, C., Kleanthous, K. & Tabaqchali, S., 1991. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*, 44(6), pp.515–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2066432> [Accessed February 15, 2018].
- Clayton, C.L. et al., 1992. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 29(4), pp.192–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1890169%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC269854>.
- Coelho, L.G., Leon-Barua, R. & Quigley, E.M.M., 2000. Latin-American Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection1. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(10), pp.2688–2691. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051336> [Accessed January 13, 2018].
- Correa, P. & Piazuelo, M.B., 2012. The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*, 13(1), pp.2–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188910> [Accessed January 8, 2018].
- Cosme, A. et al., 2017. Antimicrobial susceptibility testing before first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection in patients with dual or triple antibiotic resistance. *World Journal of Gastroenterology*, 23(18), pp.3367–3373.
- Cosme, A. et al., 2012. Usefulness of antimicrobial susceptibility in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect*, pp.1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512623>.
- Cover, T.L. & Blanke, S.R., 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), pp.320–332. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1095> [Accessed January 12, 2018].
- Cuadrado-Lavín, A. et al., 2012. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Du, L.-J. et al., 2016. *Helicobacter pylori* eradication therapy for functional dyspepsia: Systematic review and meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 22(12), pp.3486–3495. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022230> [Accessed January 9, 2018].
- EUCAST, 2016. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *EUCAST*, pp.35–44.
- Evans, D.J. & Evans, D.G., 2001. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of Sequence Diversity in Relation to Phosphorylation Motifs and Implications for the Role of CagA as a Virulence Factor. *Helicobacter*, 6(3), pp.187–198. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1523-5378.2001.00028.x> [Accessed January 12, 2018].
- Every, A.L., 2013. Key host-pathogen interactions for designing novel interventions against *Helicobacter pylori*. *Trends in microbiology*, 21(5), pp.253–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528348> [Accessed February 19, 2018].
- Fallone, C.A. et al., 2016. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology*, 151(1), p.51–69.e14. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516301081> [Accessed November 22, 2016].
- Falsafi, T. et al., 2007. Culture of *Helicobacter pylori* from stool samples in children. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(3), pp.411–416. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538651> [Accessed February 19, 2018].
- Fellmann, J. et al., 2014. *Helicobacter pylori* detected in pharyngeal and laryngeal pathologies in patients with proven gastric colonization. *Head & Neck*, 36(11), pp.1562–1566. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23996235> [Accessed February 16, 2018].
- Fock, K.M. et al., 2009. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(10), pp.1587–1600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788600> [Accessed January 13, 2018].
- Fontana, C. et al., 2002. New Site of Modification of 23S rRNA Associated with Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates New Site of Modification of 23S rRNA Associated with Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), pp.3765–3769.
- De Francesco, V. et al., 2014. Change of point mutations in *Helicobacter pylori* rRNA associated with clarithromycin resistance in Italy. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 3), pp.453–457.

- De Francesco, V. et al., 2011. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2(3). Available at: <http://www.wjgnet.com/2150-5330/> [Accessed November 7, 2017].
- De Francesco, V. et al., 2009. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: Benefits and limits. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), pp.327–332.
- Franchini, M. et al., 2010. Pathogenesis, laboratory, and clinical characteristics of *Helicobacter pylori*-associated immune thrombocytopenic purpura. *Advances in clinical chemistry*, 52, pp.131–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275342> [Accessed January 9, 2018].
- Fukui, T. et al., 2004. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Laboratory Investigation*, 84(4), pp.485–492. Available at: <http://www.nature.com/articles/3700056> [Accessed January 8, 2018].
- Furuta, T. et al., 2007. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(11), pp.1810–1815.
- Garza-González, E. et al., 2014. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. Available at: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i6/1438.htm> [Accessed December 11, 2017].
- Gasbarrini, A. et al., 2000. Efficacy of a multistep strategy for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 14(1), pp.79–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632649> [Accessed February 10, 2018].
- Gazi, S. et al., 2013. Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification. *Annals of Gastroenterology Ann Gastroenterol*, 26(263), pp.226–232. Available at: www.annalsgastro.gr [Accessed February 16, 2018].
- George, J.N., 2009. Definition, diagnosis and treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 94(6), pp.759–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483153> [Accessed January 9, 2018].
- Gerrits, M.M. et al., 2002. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), pp.2996–3000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183259> [Accessed December 23, 2017].
- Ghotaslou, R., Leylabadlo, H.E. & Asl, Y.M., 2015. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World J Methodol*, 5(3), pp.164–174. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/> [Accessed April 3, 2017].
- Gisbert, J.P. et al., 2013. III Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y hepatología*, 36(5), pp.340–374. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570513000745> [Accessed April 18, 2017].
- Gisbert, J.P. et al., 2016. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y Hepatología*, 39(10), pp.697–721. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570516300589> [Accessed March 19, 2018].
- Gisbert, J.P. et al., 2003. Validation of the 13c-urea breath test for the initial diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and to confirm eradication after treatment. *Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 95(2), pp.121–6, 115–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760719> [Accessed December 11, 2017].
- Gisbert, J.P. & María Pajares, J., 2001. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina en España. Una revisión sistemática. *Medicina Clínica*, 116(3), pp.111–116. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775301717381>.
- Gisbert, J.P. & Calvet, X., 2012. Review article: rifabutin in the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(2), pp.209–221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129228> [Accessed December 24, 2017].
- Gisbert, J.P. & Pajares, J.M., 2004. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20(10), pp.1001–1017. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569102> [Accessed December 11, 2017].

- Gomollon, F. et al., 2000. Third line treatment for *Helicobacter pylori*: a prospective, culture-guided study in peptic ulcer patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(10), pp.1335–1338. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2036.2000.00833.x> [Accessed February 10, 2018].
- Goodwin, C.S. et al., 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/39/4/ij-s-39-4-397.pdf?expires=1515586691&id=id&accname=guest&checksum=0E7E573646007355C59008FF9799B164> [Accessed January 10, 2018].
- Heep, M. et al., 2002. Detection of rifabutin resistance and association of *rpoB* mutations with resistance to four rifamycin derivatives in *Helicobacter pylori*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 21(2), pp.143–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939398> [Accessed December 24, 2017].
- Hong, K.S. et al., 2018. Preventive effect of anti-*VacA* egg yolk immunoglobulin (IgY) on *Helicobacter pylori*-infected mice. *Vaccine*, 36(3), pp.371–380. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29223485> [Accessed February 19, 2018].
- Hooi, J.K.Y. et al., 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153, pp.420–429. Available at: [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(17\)35531-2/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(17)35531-2/pdf) [Accessed January 10, 2018].
- Hoshina, S. et al., 1990. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 13(6), pp.473–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703940> [Accessed February 16, 2018].
- Hunt, R.H. et al., 2011. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 20(3), pp.299–304.
- Ibrahim, A. et al., 2017. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Digestive and Liver Disease*, 49(7), pp.742–749. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28495503> [Accessed February 16, 2018].
- International Agency for Research on Cancer, 2014. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer IARC Library Cataloguing in Publication Data. IARC. Available at: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk8/index.php> [Accessed January 10, 2018].
- Israel, D.A. et al., 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), pp.14625–14630. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724955> [Accessed January 10, 2018].
- Jin, X. & Li, Y., 2007. Systematic Review and Meta-analysis from Chinese Literature: the Association Between *Helicobacter pylori* Eradication and Improvement of Functional Dyspepsia. *Helicobacter*, 12(5), pp.541–546. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760723> [Accessed January 8, 2018].
- John Albert, M. et al., 2006. High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori*, isolated from a multiracial population in Kuwait. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(9), pp.1359–1366. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17059517> [Accessed June 29, 2017].
- Josenhans, C., Labigne, A. & Suerbaum, S., 1995. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *Journal of bacteriology*, 177(11), pp.3010–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768796> [Accessed January 12, 2018].
- Kabir, S., 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *Journal of Medical Microbiology*, 50(12), pp.1021–1029. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11761185> [Accessed February 19, 2018].
- Kalach, N. et al., 2015. Usefulness of gastric biopsy-based real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 61(3), pp.307–312.
- Khadangi, F., Yassi, M. & Kerachian, M.A., 2017. Review: Diagnostic accuracy of PCR-based detection tests for *Helicobacter Pylori* in stool samples. *Helicobacter*, 22(6), p.e12444. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28961384> [Accessed February 16, 2018].

- Khan, R. et al., 2004. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), pp.3567–3569. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328128> [Accessed October 18, 2017].
- Kim, J.M. et al., 2008. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(9), pp.1584–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852516>.
- Kim, K.S. et al., 2002. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 17(5), p.599. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378008> [Accessed December 23, 2017].
- Kobayashi, D. et al., 2002. Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading. *Journal of Medical Microbiology*, 51(4), pp.305–311.
- Kuo, C.-H. et al., 2014. *Helicobacter pylori* and Systemic Disease. *Gastroenterology research and practice*, 2014, p.358494. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24772167> [Accessed January 10, 2018].
- Lahner, E., Persechino, S. & Annibale, B., 2012. Micronutrients (Other than iron) and *Helicobacter pylori* Infection: A Systematic Review. *Helicobacter*, 17(1), pp.1–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221610> [Accessed January 9, 2018].
- Lam, S. & Talley, N., 1998. Report of the 1997 Asia Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13(1), pp.1–12. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.1998.tb00537.x> [Accessed January 13, 2018].
- López-Brea, M. et al., 1985. *Campylobacter* in gastric pathology. *Microbiologia (Madrid, Spain)*, 1(1–2), pp.97–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3916977> [Accessed January 10, 2018].
- López-Góngora, S. et al., 2015. Systematic review and meta-analysis: susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(9), pp.2447–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078393> [Accessed April 18, 2017].
- Macías-García, F. et al., 2017. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients: A prevalence cross-sectional study in Spain. *Helicobacter*, 22(6), p.e12440. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12440> [Accessed February 10, 2018].
- Malfertheiner, P. et al., 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16(2), pp.167–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860399> [Accessed February 10, 2018].
- Malfertheiner, P. et al., 2011. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet*, 377, pp.905–913. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/a21c/144ba5b5d7c3f1fbba5fed79af99c385d487.pdf> [Accessed June 27, 2017].
- Malfertheiner, P. et al., 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61(5), pp.646–664. Available at: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084%5Cnhttp://gut.bmj.com/content/61/5/646.abstract>.
- Malfertheiner, P. et al., 2016. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 0, pp.1–25. Available at: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2016-312288>.
- Malfertheiner, P., Mègraud, F. & C., O., 2005. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *European Gastroenterology Review*. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1572-0241.1998.00684.x>.
- Marais, A. et al., 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. , 63(3), pp.642–674. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103749/pdf/mr000642.pdf> [Accessed January 10, 2018].

- Marshall, B. & Goodwin, C.S., 1987. Revised Nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), p.68. Available at: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/37/1/ijsem-37-1-68.pdf?expires=1515586437&id=id&acname=guest&checksum=E4F96BD887670F5121DABFA862CD4D07> [Accessed January 10, 2018].
- Marshall, B.J. et al., 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *The Medical journal of Australia*, 142(8), pp.436–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3982345> [Accessed January 13, 2018].
- Marshall, B.J. & Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet (London, England)*, 1(8390), pp.1311–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6145023> [Accessed January 10, 2018].
- Mascellino, M.T. et al., 2017. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 11, pp.2209–2220. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814829> [Accessed February 16, 2018].
- Matsuzaki, J. et al., 2010. Homology model of the DNA gyrase enzyme of *Helicobacter pylori*, a target of quinolone-based eradication therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, pp.S7–S10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20586870> [Accessed December 23, 2017].
- Mégraud, F. et al., 2013. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62(1), pp.34–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580412> [Accessed June 19, 2017].
- Mégraud, F., Bessède, E. & Lehours, P., 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19(S1), pp.6–10.
- Mégraud, F. & Lehours, P., 2007. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), pp.280–322. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428887> [Accessed March 19, 2018].
- Mishra, S., 2013. Is *Helicobacter pylori* good or bad? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(3), pp.301–304. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1773-9> [Accessed January 8, 2018].
- Mobley, H.L., 1996. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 10 Suppl 1, pp.57–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730260> [Accessed January 12, 2018].
- Molina, J. et al., 2013. Optimized nonbismuth quadruple therapies cure most patients with *Helicobacter pylori* infection in populations with high rates of antibiotic resistance. *Gastroenterology*, 145, p.121–128.e1. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0016508513004915/1-s2.0-S0016508513004915-main.pdf?_tid=4d064558-1868-11e7-aea5-00000aacb362&acdnat=1491222370_e84edeb962c6225d37637f52e1bb63b5 [Accessed April 3, 2017].
- Monno, R. et al., 2012. *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance detected by Etest and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. *APMIS*, 120(9), pp.712–717. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882260> [Accessed February 18, 2018].
- Morris, A. & Nicholson, G., 1987. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *The American journal of gastroenterology*, 82(3), pp.192–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3826027> [Accessed January 10, 2018].
- Moss, S.F., 2017. The clinical evidence linking *Helicobacter pylori* to gastric cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3(2), pp.183–191. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275685> [Accessed January 8, 2018].
- Muhsen, K. & Cohen, D., 2008. *Helicobacter pylori* Infection and iron stores: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*, 13(5), pp.323–340. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250507> [Accessed January 9, 2018].
- Musumba, C. et al., 2012. The relative contribution of NSAIDs and *Helicobacter pylori* to the aetiology of endoscopically-diagnosed peptic ulcer disease: observations from a tertiary referral hospital in the UK between 2005 and 2010. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 36(1), pp.48–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554233> [Accessed January 8, 2018].
- Navarro-Jarabo, J.M. et al., 2015. Prevalence of primary resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin and levofloxacin in Southern Spain. *Digestion*, 92(2), pp.78–82.

- Nishizawa, T. et al., 2011. *Helicobacter pylori* resistance to rifabutin in the last 7 years. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), pp.5374–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896915> [Accessed December 24, 2017].
- Nishizawa, T. et al., 2014. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428472/pdf/fmolb-01-00019.pdf> [Accessed November 6, 2017].
- Noto, J.M., Peek, R.M. & Jr., 2012. The *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 921, pp.41–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015490> [Accessed January 12, 2018].
- Nyström, J. & Svennerholm, A.-M., 2007. Oral immunization with *HpaA* affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*, 25(14), pp.2591–2598. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239498> [Accessed January 12, 2018].
- Olfat, F.O. et al., 2005. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor *BabA* with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(2), pp.151–156. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866209> [Accessed January 12, 2018].
- Øverby, A. et al., 2017. Prevalence of Gastric *Non-Helicobacter pylori Helicobacters* in Japanese Patients with Gastric Disease. *Digestion*, 95(1), pp.61–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28052279> [Accessed February 19, 2018].
- Palframan, S.L., Kwok, T. & Gabriel, K., 2012. Vacuolating cytotoxin A (*VacA*), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, p.92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919683> [Accessed January 12, 2018].
- Patel, S.K. et al., 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), pp.12847–12859. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278682> [Accessed November 23, 2016].
- Patel, S.K. et al., 2013. *Pseudomonas fluorescens*-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. *World journal of gastroenterology*, 19(7), pp.1056–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466902> [Accessed December 10, 2017].
- Persing, D.H. & Landry, M.L., 1989. In vitro amplification techniques for the detection of nucleic acids: new tools for the diagnostic laboratory. *The Yale journal of biology and medicine*, 62(2), pp.159–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672619> [Accessed February 27, 2018].
- Pourakbari, B. et al., 2013. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(3), pp.795–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516421> [Accessed November 22, 2016].
- Powers-Fletcher, M. V. & Couturier, M.R., 2015. *Non-Helicobacter pylori Helicobacter* Species Associated with Human Disease: a Primer for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(12), pp.93–101. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439915000471> [Accessed February 19, 2018].
- Price, A.B., 1991. The Sydney System: histological division. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 6(3), pp.209–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912431> [Accessed February 16, 2018].
- Rhead, J.L. et al., 2007. A New *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133(3), pp.926–936. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854597> [Accessed January 12, 2018].
- Rimbara, E. et al., 2012. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: Role of mutations at position 87 and 91 of *gyrA* on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in *gyrB*. *Helicobacter*, 17(1), pp.36–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221614> [Accessed December 23, 2017].
- Rimbara, E. et al., 2008. Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9), pp.3465–3466.
- Rimbara, E., Sasatsu, M. & Graham, D.Y., 2013. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 943, pp.279–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104297> [Accessed February 19, 2018].

- Roberts, S.E. et al., 2016. Review article: the prevalence of *Helicobacter pylori* and the incidence of gastric cancer across Europe. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(3), pp.334–345. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26592801> [Accessed January 10, 2018].
- Robinson, K., Kaneko, K. & Andersen, L.P., 2017. *Helicobacter*: Inflammation, immunology and vaccines. *Helicobacter*, 22, p.e12406. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12406> [Accessed February 19, 2018].
- Rupnow, M.F.T. et al., 2009. Cost-Effectiveness of a potential Prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(8), pp.1311–1317. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751153> [Accessed February 19, 2018].
- Saez, J. et al., 2012. Real-time PCR for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with upper gastrointestinal bleeding: Comparison with other classical diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10).
- Sarem, M. & Corti, R., 2016. Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. *Gastroenterología y hepatología*, 39(1), pp.28–35.
- Satoh, K. et al., 1991. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis: quantitative assessment of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. *The American journal of gastroenterology*, 86(3), pp.285–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998309> [Accessed February 16, 2018].
- Schulz, C., Schütte, K. & Malfertheiner, P., 2014. Does *H. pylori* eradication therapy benefit patients with hepatic encephalopathy? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48(6), p.1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583758> [Accessed January 10, 2018].
- Shakouri, A. et al., 2010. Effectiveness of *Helicobacter pylori* eradication in chronic urticaria: evidence-based analysis using the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation system. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(4), pp.362–369. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610979> [Accessed January 10, 2018].
- Sheu, B.S. et al., 1996. Bacterial density of *Helicobacter pylori* predicts the success of triple therapy in bleeding duodenal ulcer. *Gastrointestinal endoscopy*, 44(6), pp.683–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8979058> [Accessed February 16, 2018].
- Shukla, S.K.K. et al., 2011. Quantitation of *Helicobacter pylori ureC* gene and its comparison with different diagnostic techniques and gastric histopathology. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), pp.231–237. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624400> [Accessed June 24, 2017].
- Skirrow, M.B., 1977. *Campylobacter enteritis*: a new disease. *British medical journal*, 2(6078), pp.9–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/871765> [Accessed January 10, 2018].
- Sugano, K. et al., 2015. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 64(9), pp.1353–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187502> [Accessed January 30, 2018].
- Sugimoto, M. et al., 2014. Efficacy of tailored *Helicobacter pylori* eradication treatment based on clarithromycin susceptibility and maintenance of acid secretion. *Helicobacter*, 19(4), pp.312–318.
- Suzuki, H., Nishizawa, T. & Hibi, T., 2010. *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiology*, 5(4), pp.639–648. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353303> [Accessed December 23, 2017].
- Tajbakhsh, S., Samarbaf-Zadeh, A.R. & Moosavian, M., 2008. Comparison of fluorescent in situ hybridization and histological method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 14(9), p.BR183-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758410> [Accessed December 10, 2017].
- Tamayo, E. et al., 2017. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its molecular determinants in Northern Spain, 2013-2015. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, pp.43–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.12.019>.
- Testerman, T.L. & Morris, J., 2014. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), pp.12781–12808.
- Tomb, J.-F. et al., 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), pp.539–547. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252185> [Accessed January 10, 2018].

- Uotani, T., Graham, D.Y. & DeBakey, M.E., 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl Med*, 3(1). Available at: www.atmjournals.org [Accessed December 10, 2017].
- Versalovic, J., 2003. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *American journal of clinical pathology*, 119(3), pp.403–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645343> [Accessed January 8, 2018].
- Versalovic, J. et al., 1997. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 40(2), pp.283–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9301997> [Accessed November 7, 2017].
- Vicente, R. et al., 2002. *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer after two treatment failures: a prospective culture-guided study. *Gastroenterología y hepatología*, 25(7), pp.438–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139836> [Accessed February 10, 2018].
- Wang, Y.-K. et al., 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), p.11221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523098> [Accessed November 22, 2016].
- Warren, J.R. & Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet (London, England)*, 1(8336), pp.1273–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6134060> [Accessed January 10, 2018].
- Weist, K. et al., 2012. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe. *Surveillance Report*. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-consumption-europe-esac-net-2012.pdf> [Accessed June 27, 2017].
- Wenzhen, Y. et al., 2010. Is Antimicrobial susceptibility testing necessary before first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection? Meta-analysis of randomized controlled trials. *International Medicine*, 49, pp.1103–1109. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/49/12/49_12_1103/_pdf [Accessed June 24, 2017].
- Yahav, J. et al., 2006. Susceptibility-guided vs. empiric retreatment of *Helicobacter pylori* infection after treatment failure. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(12), pp.2316–2321. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17078005> [Accessed February 10, 2018].
- Yamaoka, Y., 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(11), pp.629–641. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938460> [Accessed January 12, 2018].
- Yamaoka, Y., Kwon, D.H. & Graham, D.Y., 2000. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), pp.7533–7538. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852959> [Accessed January 12, 2018].
- Zeng, M. et al., 2015. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 386(10002), pp.1457–1464. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26142048> [Accessed February 19, 2018].