

# Factores microbiológicos que afectan a la erradicación de *Helicobacter pylori* en población adulta y pediátrica

Diego Domingo<sup>a</sup>, Teresa Alarcón<sup>a</sup>, Alba Edith Vega<sup>b</sup>, José Ángel García<sup>a</sup>, María Josefa Martínez<sup>c</sup> y Manuel López-Brea<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. <sup>b</sup>Área de Microbiología. Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera. San Luis. Argentina. <sup>c</sup>Servicio de Gastroenterología. Hospital del Niño Jesús. Madrid. España.

**OBJETIVOS.** Estudiar factores microbiológicos como la sensibilidad a antimicrobianos y factores de virulencia de *Helicobacter pylori* relacionados con la erradicación del microorganismo de la mucosa gástrica, tanto en población pediátrica como adulta.

**MÉTODOS.** Se obtuvieron 55 cepas aisladas a partir del cultivo de biopsias de 16 pacientes pediátricos y de 39 adultos. La sensibilidad antibiótica se realizó mediante el método de dilución en agar y el estudio de los factores de virulencia, gen *cagA* y los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El seguimiento tras el tratamiento que se instauró con amoxicilina, claritromicina y omeprazol se realizó mediante la prueba del aliento con urea marcada. Se estudió la relación entre la concentración inhibitoria mínima (CIM) a amoxicilina y claritromicina y la presencia de estos factores de virulencia con la erradicación del microorganismo.

**RESULTADOS.** La erradicación fue del 69% (38/55), 71,7% en adultos y 62,5% en niños. La resistencia a claritromicina y amoxicilina fue 14,5 y 0%, respectivamente. Las tasas de erradicación globales en relación con las variables estudiadas fueron del 75 y 53% en cepas con CIM de amoxicilina  $\leq 0,016$  mg/l y CIM de amoxicilina  $\geq 0,032$  mg/l (intervalo  $\leq 0,008-0,5$ ) ( $p > 0,05$ ), 79 y 12% en cepas con CIM de claritromicina  $< 1$  mg/l y CIM de claritromicina  $\geq 1$  mg/l (intervalo  $\leq 0,008-64$ ) ( $p < 0,05$ ), 79 y 54% en cepas *cagA+* y *cagA-* ( $p > 0,05$ ) y 82 y 62% en cepas *s1* y *s2* ( $p > 0,05$ ), respectivamente.

**CONCLUSIONES.** La infección por cepas con CIM más altas a amoxicilina y claritromicina y por aislamientos *cagA-* y *vacA s2* se relacionaron con tasas más bajas de erradicación de *H. pylori*, tanto en población adulta como infantil en la terapia con amoxicilina, claritromicina y omeprazol.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*. Erradicación. Resistencia. Factores de virulencia.

Microbiological factors that influence the eradication of *Helicobacter pylori* in adults and children

**AIM.** To study microbiological factors of *Helicobacter pylori*, such as antimicrobial susceptibility and virulence, which affect the eradication of the microorganism in gastric mucosa of adult and pediatric patients.

**METHODS.** Fifty-five *H. Pylori* strains were isolated from culture of biopsy specimens from 39 adult and 16 pediatric patients. Antibiotic susceptibility was determined by agar dilution and study of virulence factors (*cagA* gene and alleles *s1* and *s2* of the *vacA* gene) by PCR. Outcome of treatment with amoxicillin (AMX), clarithromycin (CLR) and omeprazole was assessed by the urea breath test. We studied the relation of minimum inhibitory concentration (MIC) of AMX and CLR and presence of virulence factors with eradication of the microorganism.

**RESULTS.** The eradication rate was 69% (38/55), 71.7% in adults and 62.5% in children. Resistance to CLR and AMX was 14.5% and 0%, respectively. Overall eradication rates with respect to the variables studied were: 75% and 53% in strains with AMX MICs of  $\leq 0.016$  mg/L and  $\geq 0.032$  mg/L (range  $\leq 0.008-0.5$ ) ( $p > 0.05$ ), 79% and 12% in strains with claritromicina MICs of  $< 1$  mg/L and  $\geq 1$  mg/L (range  $\leq 0.008-64$ ) ( $p < 0.05$ ), 79% and 54% in *cagA+* and *cagA-* strains ( $p > 0.05$ ) and 82% and 62% in *s1* and *s2* strains ( $p > 0.05$ ), respectively.

**CONCLUSIONS.** *H. pylori* strains with higher amoxicillin and clarithromycin MICs, and *cagA-* and *vacA s2* strains were related with lower rates of eradication in both adult and pediatric populations treated with amoxicillin, clarithromycin and omeprazole.

**Key words:** *Helicobacter pylori*. Eradication. Resistance. Virulence factors.

## Introducción

La erradicación de *Helicobacter pylori* de la cavidad gástrica humana plantea aún en la actualidad diferentes controversias. Por un lado, el papel patógeno del microorganismo no está establecido de una forma manifiesta en todas las situaciones, y se ha considerado la existencia de cepas con diferente grado de virulencia<sup>1</sup>, de esta manera, los distintos protocolos de consenso publicados aconsejan, con diferentes grados de evidencia, el tratamiento de la infección, en relación con el cuadro

Correspondencia: Dr. D. Domingo.  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de La Princesa.  
Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.  
Correo electrónico: ddomingo@helicobacterspain.com

Manuscrito recibido el 19-04-2002; aceptado el 10-06-2002.

patológico al que esté asociado<sup>2</sup>. En segundo lugar, las pautas de tratamiento propuestas difieren en los fármacos utilizados, la combinación de los mismos, la dosis y la duración<sup>3</sup>.

Por último, un aspecto importante que se debe tratar son los diferentes factores relacionados con el microorganismo que pueden afectar a su erradicación, tanto en los adultos como en población pediátrica. Estos factores pueden englobarse en la sensibilidad antimicrobiana y los diferentes marcadores de virulencia de la bacteria. Dentro de las pautas empleadas en el tratamiento de *H. pylori*, metronidazol, claritromicina, amoxicilina y tetraciclina son los agentes más comúnmente utilizados. La resistencia ha sido estudiada ampliamente tanto en adultos como en niños, y se han encontrado variaciones en los índices de resistencia a claritromicina y metronidazol, según los trabajos y en menor medida en amoxicilina y tetraciclina<sup>4,5</sup>, no obstante el conocimiento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de estos últimos, puede explicar el éxito o el fracaso en la erradicación del microorganismo. *H. pylori* posee diversos factores de virulencia como el gen asociado a citotoxicidad (*cagA*)<sup>6</sup> y el gen relacionado con la producción de toxina vacuolizante (*vacA*)<sup>7</sup>. Algunos trabajos han demostrado que la presencia del gen *cagA* y del alelo *s1* del gen *vacA* están relacionados con la producción de procesos patológicos más graves como la úlcera péptica y el cáncer gástrico<sup>8</sup>; sin embargo, otros no encuentran esta relación<sup>9</sup>. En nuestra experiencia, además estas cepas *cagA* positivas, portadoras del alelo *s1* en el gen *vacA*, muestran una mayor sensibilidad antibiótica en los estudios realizados *in vitro*<sup>10</sup>.

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de factores microbiológicos como la sensibilidad a antimicrobianos y diferentes factores de virulencia como la presencia del gen *cagA* y de los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA* de *H. pylori* en la erradicación del microorganismo en la triple pauta con amoxicilina, claritromicina y omeprazol, tanto en población pediátrica como en la adulta.

## Material y métodos

### Pacientes

Se estudiaron un total de 55 pacientes, 16 niños (5 mujeres y 11 varones de 4 a 17 años; media de edad, 10,8 años) y 39 adultos (15 mujeres y 24 varones de 18 a 77 años; edad media, 49,1 años) que acudieron al servicio de gastroenterología por padecer sintomatología gástrica (31 úlcera péptica, 16 gastritis y en 8 la patología era desconocida). El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se realizó mediante la prueba del aliento con urea marcada y mediante endoscopia digestiva. Se instauró triple terapia con amoxicilina, claritromicina y omeprazol para la erradicación del microorganismo. La pauta en adultos fue amoxicilina 1 g/12 h, claritromicina 500 mg/8 h y omeprazol 20 mg/12 h y en niños amoxicilina 50 mg/kg/día en 3 dosis, claritromicina 20 mg/kg/día en 3 dosis y omeprazol 20 mg/día en una dosis, ambas durante 14 días. El estudio de la respuesta al tratamiento se realizó mediante la prueba del aliento con urea marcada, un mes después de la finalización del mismo.

### Aislamiento de los microorganismos

Se aislaron un total de 55 cepas obtenidas a partir del cultivo de biopsias gástricas.

Las muestras se sembraron en dos placas de agar sangre y una de agar selectivo *Pylori* (BioMerieux, Lyon, Francia). Las biopsias se rodaron por toda la superficie de la placa y las mismas se incubaron en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>: una placa de agar sangre y la placa selectiva en incubador de CO<sub>2</sub> al 10% y la otra placa de agar sangre en campana con sobre de microaerofilia, todas a 37 °C. Las placas se reincubaron hasta un máximo de 10 días y se observaban cada 3 días.

Los microorganismos se identificaron mediante la morfología de la colonia, la tinción de Gram y las pruebas positivas de ureasa, catalasa y oxidasa. Se realizaron subcultivos y se llevó a cabo la congelación de los microorganismos a -70 °C para estudios posteriores.

### Pruebas de sensibilidad *in vitro*

Se determinó la CIM a amoxicilina y claritromicina mediante el método de dilución en agar utilizando una variación del recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Para ello, las cepas previamente descongeladas fueron inoculadas en caldo de *Brucella* con 10% de suero bovino fetal e incubadas durante 48 h en ambiente microaerófilo a 37 °C. Utilizando un replicador de Steer, se depositó un inóculo de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/gota sobre las placas de agar Muller-Hinton con 7% de sangre de caballo, que contenían diluciones dobles, seriadas desde 0,008 hasta 128 mg/l de los antibióticos estudiados. Las placas se incubaron en estufa de CO<sub>2</sub> al 10% a 37 °C e interpretadas a los 3 y 5 días de la inoculación. La CIM se definió como la concentración más baja de antibiótico que inhibía el crecimiento visible del microorganismo. Como control se utilizó la cepa *H. pylori* NCTC 11637.

### Detección de factores de virulencia

En 47 aislamientos se realizó el estudio de los factores de virulencia. El ADN se extrajo mediante un método previamente establecido<sup>11</sup>.

Se estudió la presencia del gen *cagA* mediante la detección de un producto amplificado de 297 pares de bases (pb) situado entre las posiciones 1751-2048 de la secuencia previamente publicada<sup>6</sup>. Se siguió el protocolo descrito por Covacci y Rappuoli<sup>12</sup>, realizándose la amplificación en un termociclador Perkin Elmer 2400 (Perkin Elmer, EE.UU.).

De igual forma, los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA* se estudiaron mediante PCR siguiendo un protocolo descrito anteriormente, obteniéndose fragmentos de 259 y 286 pb, respectivamente<sup>7</sup>.

La detección de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, teñidos con bromuro de etidio al 2%. Se utilizó como marcador de peso molecular fragmentos del fago *Φx-174*, previamente digerido con *HaeIII*. Posteriormente los resultados fueron interpretados mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

### Estudio estadístico

Se aplicó la técnica de la chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para la realización del estudio estadístico de los datos.

## Resultados

La erradicación de *H. pylori* se obtuvo en el 69% de los casos (38/55: intervalo de confianza [IC] al 95% 55,2-80,8). Al estudiarlo por poblaciones los índices fueron del 71,7% en los adultos y 62,5% en los niños.

El punto de corte para claritromicina fue 1 mg/l, siguiendo las recomendaciones de las NCCLS<sup>13</sup> y 1 mg/l para amoxicilina como aconsejan los últimos trabajos publicados<sup>14</sup>. La tasa de resistencia a la claritromicina fue 14,5% (IC 95%, 6,49-26,6) con un intervalo de CIM de

$\leq 0,008-64$  mg/l y fue más alta en la población pediátrica (25% frente a 10%) ( $p > 0,05$ ).

Se detectaron 15 cepas con CIM  $\geq 0,032$  mg/l a amoxicilina (27,27%; IC 95%, 16,13-40,96) obteniéndose un intervalo de CIM de  $\leq 0,008-0,5$  mg/l. No se encontró ninguna cepa resistente a este antibiótico.

En el estudio de los genes de virulencia se detectaron 34/55 cepas *cagA+* (72,3%; IC 95%, 47,72-74,59) y 23/55 (41,8%; IC 95%, 28,65-55,89) que poseían el alelo *s1* del gen *vacA*.

La relación entre la erradicación del microorganismo y las CIM a amoxicilina y a claritromicina y los factores de virulencia se reflejan en la tabla 1.

Se observaron tasas más bajas de erradicación cuando la CIM de amoxicilina era mayor de 0,016 mg/l ( $p > 0,05$ ) y cuando CIM de claritromicina era  $> 1$  mg/l ( $p < 0,05$ ). De igual forma se detectaron tasas más bajas de erradicación en cepas que no poseían el gen *cagA* y que mostraban el alelo *s2* del gen *vacA* ( $p > 0,05$ ).

## Discusión

En este trabajo estudiamos diferentes aspectos relacionados con *H. pylori* que pueden influir en la erradicación del mismo de la cavidad gástrica humana en dos grupos de población (adulta y pediátrica) utilizando la pauta claritromicina, amoxicilina y omeprazol.

Se obtuvo una tasa global de erradicación del 69%, más alta en adultos (71%) que en niños (62%) ( $p > 0,05$ ). Esta cifra está en concordancia con otros trabajos publicados por diferentes autores que utilizan esta misma pauta<sup>15,16</sup>, pero es notablemente inferior a los datos publicados por otros autores, entre ellos Wong et al<sup>17</sup> y Neville et al<sup>18</sup>, los cuales encuentran índices de erradicación superiores.

En el análisis de la resistencia a claritromicina y amoxicilina se observó una tasa global de resistencia a la primera del 14,5%, similar a otras publicadas recientemente<sup>14</sup>. En nuestra experiencia la resistencia a este antimicrobiano se ha visto incrementada a lo largo de los años y no se han encontrado cepas resistentes hasta 1993, año en que se obtuvo el 3%<sup>19</sup>. Es importante subrayar que se encontraron diferencias no estadísticamente significativas en la resistencia a claritromicina entre las cepas aisladas de adultos y de niños, siendo más alta en estos últimos y alcanzó el 25%. Una explicación lógica a esta diferencia entre los índices de resistencia a la claritromicina en aislamientos de adultos respecto a los de niños podría ser el mayor consumo del antimicrobiano por la población pediátrica para el tratamiento de infecciones asociadas al tracto respiratorio. En nuestro trabajo no se detectaron aislamientos resistentes a amoxicilina.

Otro aspecto de nuestro trabajo fue el estudio de la presencia de factores de virulencia como el gen *cagA* y los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA*. Se obtuvo el 73% de cepas *cagA+* y el 49% de cepas con el alelo *s1*, cepas supuestamente más virulentas. En nuestra experiencia encontramos un porcentaje más alto de estas cepas en la población adulta, y hemos llegado a encontrar cifras del 89% de cepas *cagA+*, sin hallar diferencias entre aislamientos obtenidos a partir de úlceras o gastritis ( $p > 0,05$ )<sup>20</sup>.

TABLA 1. Tasas de erradicación global en relación con las CIM a la amoxicilina y a la claritromicina y los factores de virulencia en las dos poblaciones estudiadas

Factor	Erradicación adultos (%)	Erradicación niños (%)	Erradicación global (%)
CIM amoxicilina $\leq 0,016$	25/34 (73)*	5/6 (83)*	30/40 (75)*
CIM amoxicilina $\geq 0,032$	3/5 (60)	5/10 (50)	8/15 (53)
CIM claritromicina $< 1$	27/35 (77)**	10/12 (83)**	37/47 (78)**
CIM claritromicina $\geq 1$	1/4 (25)	0/4 (0)	1/8 (12)
<i>cagA+</i>	24/31 (77)*	3/3 (100)*	27/34 (79)*
<i>cagA-</i>	2/3 (66)	5/10 (50)	7/13 (54)
<i>vacA s1</i>	17/21 (81)*	2/2 (100)*	19/23 (82)*
<i>vacA s2</i>	9/13 (69)	6/11 (54)	15/24 (62)

\* $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,05$ ; CIM: concentración inhibitoria mínima.

El objetivo global de nuestro trabajo era estudiar la repercusión de los diferentes factores discutidos anteriormente sobre la erradicación de *H. pylori*. Es obvio señalar que en una enfermedad infecciosa uno de los puntos clave para determinar la buena resolución de la misma es la sensibilidad o resistencia del microorganismo a los agentes antimicrobianos utilizados, amén de otros caracteres de la propia bacteria (tropismo, factores de colonización y virulencia, etc.), pero no sería correcto desdeñar (y así han hecho varios autores) otros factores ajenos al microorganismo y más relacionados con el huésped como el sexo, la edad, el consumo de alcohol y tabaco, la utilización de otros fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos o incluso la actividad enzimática sobre los medicamentos que forman las diferentes pautas, variables que sin duda han mostrado tener cierta importancia en la respuesta al tratamiento de procesos patológicos no infecciosos<sup>21</sup>.

Centrados en nuestros datos se observa que la erradicación de *H. pylori* se ve afectada de manera considerable por la CIM a los antibióticos (amoxicilina y claritromicina). Este hecho es más evidente en el caso de claritromicina: si se estudian las tasas de erradicación en cepas con CIM  $> 1$  mg/l (resistentes) se observa que son del 25% en los adultos y del 0% en los niños, en comparación con el 77 y 100% en individuos con cepas sensibles en ambas poblaciones, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. Estos datos corroboran los resultados obtenidos por otros autores que han estudiado el impacto de la resistencia a claritromicina en esta triple pauta, llegando incluso a cifras de erradicación del 79% en cepas sensibles frente al 12% en cepas resistentes<sup>22</sup>. En el estudio de la erradicación del microorganismo en dependencia con la CIM a amoxicilina (no encontramos cepas resistentes) se observa que ocurre algo semejante, si bien es cierto que la diferencia parece menos marcada que en el caso de claritromicina. También se ha descrito, aunque no era el objetivo de este trabajo, la repercusión de la resistencia a metronidazol en las pautas donde se utiliza este antimicrobiano. Los resultados apuntan a un descenso en las tasas de erradicación en cepas resistentes; no obstante, la repercusión es menor que en el caso de las cepas resistentes a claritromicina cuando se utiliza terapia que incluye a este antibiótico<sup>23</sup>.

Una conclusión colateral a estos resultados es la trascendencia de la realización de estudios de sensibilidad

*in vitro* a las cepas de *H. pylori*. Aunque puesta en duda en determinadas ocasiones argumentando que el tratamiento está definido claramente y objetando que estas pruebas sólo deberían realizarse en caso de fracaso terapéutico, es útil no sólo para el conocimiento de la epidemiología de la resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos, sino también para la instauración del tratamiento adecuado y el control del desarrollo de futuras resistencias<sup>24</sup>.

Por último, se estudió la relación entre dos factores de virulencia y la erradicación del microorganismo. Se observó que las tasas de erradicación eran más altas en las cepas consideradas más virulentas. Esto ha sido estudiado más ampliamente en el caso del gen *cagA*. La relación entre la erradicación y la presencia del gen *cagA* se puede explicar desde distintos puntos de vista. En primer lugar las cepas *cagA+* (en general las cepas que poseen la isla de patogenicidad *cag*) inducen la secreción de interleucina 8, una citocina proinflamatoria, lo que se traduce en un aumento del flujo sanguíneo y una mejor difusión de los antibióticos a esa zona. En segundo lugar se puede explicar debido a que se ha apuntado que las cepas *cagA+* crecen más rápidas que las *cagA-*<sup>25</sup> y como los antibióticos son activos durante la división celular, serán más activos en las bacterias en fase de crecimiento rápido que en aquellas que están en fase estacionaria. Otra posible hipótesis sería el hecho de que las cepas *cagA+* se sitúan en zonas más cercanas a la mucosa gástrica donde la llegada del antibiótico es más fácil que en las *cagA-*, situadas más superficialmente<sup>26</sup>. En cualquier caso, la trascendencia del gen *cagA* en la erradicación puede explicarse por el efecto del mismo sobre la mucosa gástrica; en efecto Broutet et al<sup>27</sup> observan tasas más bajas de erradicación con la triple terapia de amoxicilina, claritromicina y pantoprazol en individuos portadores de una cepa *cagA-* en comparación con aquellos infectados con aislamientos *cagA+*, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Estos autores admiten la posibilidad de utilizar este parámetro como un factor predictivo de éxito en la erradicación de *H. pylori*, e, incluso, apuntan la necesidad de tratamientos más duraderos en pacientes infectados con cepas *cagA-*.

En conclusión, existen diferentes factores relacionados con *H. pylori* como la sensibilidad a los antimicrobianos y diferentes factores de virulencia como el gen *cagA*, marcador de la isla de patogenicidad, que están relacionados con la erradicación del microorganismo de la cavidad gástrica humana.

## Bibliografía

- Pérez-Pérez GI. Helicobacter buenos y malos. En: López-Brea M, editor. *Helicobacter pylori*. Retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento, 1.<sup>a</sup> ed. Barcelona: Prous Science, 1999; p. 31-40.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 consensus report. Aliment Pharmacol Ther 2002;16: 167-80.
- Glupczynski Y, Burette A. Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: Problems and pitfalls. Am J Gastroenterol 1990;85:1545-51.
- Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 1999;12:19-26.
- Lopez-Brea M, Martinez MJ, Domingo D, Alarcon T. A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. J Antimicrob Chemother 2001;48:295-7.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-KDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci (USA) 1993;90:5791-5.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blazer MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:17771-7.
- Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, Faundez G, Acuna R. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori VacA* and *CagA* gastric disease in Chile. J Med Microbiol 2002;51: 300-4.
- Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome. J Gastroenterol 2000;35:947-8.
- Domingo D, Alarcón T, Prieto N, López-Brea M. Relación entre sensibilidad antibiótica y factores de virulencia en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. Rev Esp Quimioter 1999;12:340-5.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. En: Ausubel R, Brent RE, Kingston DD, Moore JG, Seidman JG, Smith JA, et al, editors. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1987; p. 2.4.1-2.4.5.
- Covacci A, Rappuoli R. PCR amplification of *H. pylori* gene sequences. En: Lee A, Megraud F, editors. *Helicobacter pylori*: Techniques for clinical diagnosis and basic research. London: WB Saunders, 1996; p. 94-111.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eleventh Informational Supplement. NCCLS document M100-S11 (ISBN 1-56238-426-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 2001;19087-898.
- Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Bream M, Andersen LP. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:820-3.
- Gottrand F, Kalach N, Spyckerelle C, Guimber D, Mougenot JF, Tounian P, et al. Omeprazole combined with amoxicillin and clarithromycin in the eradication of *Helicobacter pylori* in children with gastritis: A prospective randomized double-blind trial. J Pediatr 2001;139:622-3.
- Kawakami E, Ogata SK, Portorreal AC, Magni AM, Pardo ML, Patricio FR. Triple therapy with clarithromycin, amoxicillin and omeprazole for *Helicobacter pylori* eradication in children and adolescents. Arq Gastroenterol 2001;38:203-6.
- Wong BC, Chang FY, Abid S, Abbas Z, Lin BR, Van Rensburg C, et al. Triple therapy with clarithromycin, omeprazole and amoxicillin for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients in Asia and Africa. Aliment Pharmacol Ther 2000;11:1529-35.
- Neville PM, Barrowclough S, Crocombe W, Axon AT, Wrangstadh M, Moayyedi P. Randomized study of the efficacy of omeprazole and clarithromycin with either amoxicillin or metronidazole in the eradication of *Helicobacter pylori* in screened primary care patients. Dig Liver Dis 2001;33:392.
- Lopez-Brea M, Domingo D, Sanchez I, Alarcon T. Evolution of the resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. J Antimicrob Chemother 1997;40:279-81.
- Domingo D, Alarcon T, Prieto N, Sanchez I, Lopez-Brea M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Clin Microbiol 1999;37:2113-4.
- Georgopoulos SD, Ladas SD, Karatapanis S, Mentis A, Spiliadi C, Artikis V, et al. Factors that may affect treatment outcome of triple *Helicobacter pylori* eradication therapy with omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin. Dig Dis Sci 2000;45:63-7.
- Tankovic J, Lamarque D, Lascols C, Soussy CJ, Delchier JC. Impact of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. Aliment Pharmacol Ther 2001;15: 707-13.
- Poon SK, Chang CS, Su J, Lai CH, Yang CC, Chen GH, et al. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. Aliment Pharmacol Ther 2002;16: 291-6.
- Street ME, Caruana P, Caffarelli C, Magliani W, Manfredi M, Fornaroli F, et al. Antibiotic resistance and antibiotic sensitivity based treatment in *Helicobacter pylori* infection: Advantages and outcome. Arch Dis Child 2001;84:419-22.
- Van Doorn LJ, Quint W, Schneberger P, Tytgat GNJ, deBoer WA. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. Lancet 1997;350:71-2.
- Karita M, Blaser MJ. Aci-tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between *cagA+* and *cagA-* strains. J Infect Dis 1998;178:213-9.
- Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, Mascarel A, Samoyeau R, Salamon R, et al. *cagA* status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapy therapies in patients with nonulcer dyspepsia. J Clin Microbiol 2001;39:1319-22.