

Relación entre detección de anticuerpos anti-CagA, sensibilidad antibiótica y úlcera péptica en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*

Carlos Toro^a, Javier García-Samaniego^b, Teresa Alarcón^c y Margarita Baquero^d

^aServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III. ^bServicio de Digestivo. Hospital Carlos III. ^cServicio de Microbiología. Hospital de la Princesa. ^dServicio de Microbiología. Hospital Carlos III. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. El propósito de este estudio fue determinar si la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de virulencia CagA y VacA de *Helicobacter pylori* se asociaba con una mayor sensibilidad a los antibióticos, y su relevancia clínica en los pacientes con dispepsia.

MÉTODOS. Se estudiaron 98 pacientes adultos con infección por *H. pylori* que acudieron a realizarse una endoscopia gástrica por sus síntomas dispepsicos. La determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA se realizó mediante *Western-blot* (Helicoblot 2.0). Se estudió la concentración mínima inhibitoria a amoxicilina, metronidazol, claritromicina y tetraciclina mediante E-test.

RESULTADOS. Fueron diagnosticados de dispepsia ulcerosa 39 pacientes y 59 de dispepsia no ulcerosa. Presentaron anticuerpos anti-CagA 63 pacientes y 52 anti-VacA que en ambos casos se asociaron significativamente con la presencia de dispepsia ulcerosa ($p = 0,034$ y $p = 0,029$, respectivamente). Se detectaron un 38,8% de cepas resistentes a metronidazol y un 10,3% a claritromicina. No se observaron resistencias a amoxicilina ni a tetraciclina. La sensibilidad a claritromicina fue más frecuente en pacientes con dispepsia ulcerosa frente a los sujetos con dispepsia no ulcerosa ($p = 0,046$). Los pacientes con anticuerpos anti-CagA presentaron las cepas más sensibles a los antibióticos, siendo para la claritromicina la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

CONCLUSIÓN. La detección de anticuerpos anti-CagA se asoció con una mayor sensibilidad a los antibióticos en pacientes con dispepsia ulcerosa y no ulcerosa, por lo que su detección podría ser un marcador de buen pronóstico de éxito terapéutico.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*. Resistencia. CagA. VacA. Claritromicina.

Association among anti-CagA antibody detection, antibiotic susceptibility, and peptic ulcer in patients with *Helicobacter pylori* infection

INTRODUCTION. The aim of this study was to determine the relationship among antibodies against virulence factors (CagA and VacA), clinical status and primary resistance in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* infection.

METHODS. Ninety-eight adult patients with *Helicobacter pylori* infection who underwent gastric endoscopy for dyspepsia were studied. Specific serum IgG antibodies against CagA and VacA proteins were detected by Western-blot (Helicoblot 2.0). Minimum inhibitory concentrations of metronidazole, amoxicillin, tetracycline and clarithromycin were determined with the E-test.

RESULTS. Thirty-nine patients presented peptic ulcer disease and 59 had non-ulcer dyspepsia. CagA protein was detected in 63 patients, and VacA protein in 52 subjects, and both were significantly associated with peptic ulcers ($p = 0.034$ and $p = 0.029$, respectively). Susceptibility results showed 38.8% of strains resistant to metronidazole and 10.3% resistant to clarithromycin. No resistance to amoxicillin or tetracycline was found. Susceptibility to clarithromycin was more frequent in ulcer patients than in non-ulcer dyspepsia patients ($p = 0.046$). CagA protein was more frequent in patients with clarithromycin-sensitive strains ($p < 0.001$).

CONCLUSION. Antibodies against CagA protein were associated with higher antibiotic susceptibility in patients with ulcers or non-ulcer dyspepsia. Thus, anti-CagA antibody detection could be a useful marker of favorable prognosis with antibiotic treatment.

Key words: *Helicobacter pylori*. Resistance. CagA. VacA. Clarithromycin.

Introducción

Helicobacter pylori es quizás la causa más frecuente de infección crónica. Del 20 al 90% de la población adulta está colonizada por la bacteria¹. Actualmente es considerado como el principal causante de úlcera péptica y también se ha asociado al desarrollo de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT²⁻⁵. La infección por *H. pylori* es por lo general

Correspondencia: Dr. C. Toro.
Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III.
Sinesio Delgado, 10. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: carlostotorueda@hotmail.com

Manuscrito recibido el 29-04-2002; aceptado el 17-09-2002.

asintomática y el desarrollo de enfermedad péptica se ha asociado a la colonización por cepas especialmente patogénicas. Se han descrito varios genes de virulencia, siendo las cepas portadoras del gen *cagA* y las que presentan el alelo s1 del gen *vacA*, las descritas como de mayor poder patógeno⁶⁻⁸.

Recientemente se ha asociado la detección de estos factores de patogenicidad con una mayor sensibilidad a los antibióticos⁹⁻¹¹, y se ha sugerido que el genotipo podría ser el responsable de la mayor frecuencia de erradicación observada entre los pacientes ulcerosos frente a los que presentan dispepsia no ulcerosa. Así, hay autores que consideran que el estudio de estos genes de virulencia podría ser un marcador pronóstico para determinar el éxito de la terapia erradicadora¹⁰.

Sin embargo, la detección de los genes *cagA* y *vacA* requiere el empleo de métodos moleculares, no siempre al alcance de todos los laboratorios. La utilización de técnicas serológicas, que detectan anticuerpos específicos frente a los productos de estos genes, podría ser una alternativa para su uso sistemático en la práctica clínica. No obstante, aunque las proteínas CagA y VacA son inmunogénicas, hay autores que han comunicado que pueden existir discrepancias entre su detección y la presencia de sus respectivos genes¹²⁻¹⁴.

Hasta ahora no se ha realizado ningún estudio para conocer si la determinación de anticuerpos frente a las proteínas CagA y VacA pudiera ser también un marcador pronóstico de la sensibilidad antibiótica en *H. pylori*. El propósito de nuestro estudio fue por lo tanto analizar esta asociación entre los pacientes con enfermedad ulcerosa y dispepsia no ulcerosa.

Métodos

De febrero de 1998 a febrero de 1999 se estudiaron 98 cepas de *H. pylori* obtenidas de muestras de biopsia antral pertenecientes a 98 pacientes adultos con síntomas dispépticos (42 mujeres y 56 varones; edad media, 48,4 años; límites, 21-78 años), que acudieron a nuestro hospital para someterse a una endoscopia gástrica. Los pacientes no habían recibido con anterioridad tratamiento erradicador ni antibióticos en los 3 meses previos al estudio.

Atendiendo a los hallazgos endoscópicos la dispepsia de los pacientes fue clasificada como de origen ulceroso o no ulceroso¹⁵. Dentro de la dispepsia ulcerosa se incluyeron los sujetos con duodenitis erosiva¹⁶. Todos los pacientes con enfermedades orgánicas (colelitiasis, pancreatitis, etc.), funcionales o con antecedentes de consumo de antiinflamatorios no esteroides (AINE) que podían haber constituido un sesgo para la dispepsia no ulcerosa no fueron incluidos en el estudio.

Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

De cada paciente se obtuvieron muestras de suero el día del procedimiento endoscópico. El suero fue distribuido en aliquotas que fueron congeladas a -80 °C hasta su utilización. La detección e identificación de anticuerpos IgG frente a las proteínas CagA y VacA de *H. pylori* se realizó mediante *Western blot* comercial (Helicoblot 2.0, Genelabs Diagnostics, Singapur).

Cultivo

Las biopsias de antró obtenidas se enviaron al laboratorio de microbiología en recipientes de plástico estériles que contenían 2 ml de solución salina, y fueron procesadas en un tiempo inferior a 30 min. El cultivo se realizó en dos medios no selectivos (agar Columbia con un 5% de sangre de cordero, y agar chocolate *Polyvitex*, bioMérieux,

Francia), y en un medio selectivo (*Pylori Agar*, bioMérieux, Francia) a 35 °C durante 7 días. Los microorganismos se identificaron según la morfología de la colonia, la tinción de Gram y la producción de oxidasa, catalasa y ureasa. Las cepas se conservaron en BHI (*brain heart infusion*) con un 15% de glicerina a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Determinación de la actividad *in vitro*

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se llevó a cabo mediante E-test (AB Biodisk, Suiza). De cada cepa (después de 3 días de crecimiento en agar Columbia) se realizó una suspensión bacteriana en 3 ml de agua estéril correspondiente al n.º 3 de la escala de McFarland. Tras introducir un escobillón estéril en la suspensión se realizó el inóculo estriando la torunda sobre placas de agar Columbia suplementado con un 5% de sangre de cordero. Tras colocar las tiras de E-test se incubaron las placas en una atmósfera de microaerofilia (*GENbox microaer*, bioMérieux, Francia) a 35 °C sin preincubación anaeróbica durante 3 a 5 días. La lectura se realizó según las recomendaciones del fabricante.

Los antibióticos investigados en las 98 cepas procedentes de los pacientes fueron metronidazol, amoxicilina, claritromicina y tetraciclina, salvo en un caso que sólo pudo realizarse la sensibilidad a metronidazol y amoxicilina. Todos fueron estudiados en un rango de concentraciones de 0,0016 a 256 mg/l.

Criterios de resistencia y sensibilidad

No hay recomendaciones oficiales respecto a los puntos de corte a utilizar, salvo para el caso de la claritromicina frente a la cual las cepas con una CIM ≥ 1 mg/l se consideraron resistentes, CIM ≤ 0,25 mg/l sensibles, y entre 0,25 y 1 mg/l intermedias¹⁷. Por este motivo, a la hora de definir los puntos de corte nos hemos basado, para el metronidazol, en los definidos a partir de los últimos ensayos multicéntricos (CIM ≤ 8mg/l sensibles y CIM > 8 mg/l resistentes)^{18,19}, y en el resto de antibióticos hemos utilizado las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para otros microorganismos¹⁷.

Estadística

A efectos estadísticos las cepas clasificadas como intermedias se consideraron resistentes. El estudio estadístico se realizó mediante el test de chi cuadrado (χ^2) y cuando los valores fueron inferiores a 5 se empleó el test de Fisher de 2 colas. Los cálculos se realizaron mediante el programa Epi info 6 (CDC, Atlanta, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvo un valor de p < 0,05.

Resultados

De los 98 pacientes estudiados, 39 fueron diagnosticados de dispepsia ulcerosa (úlcera gástrica, 6; úlcera duodenal, 20; úlcera gástrica y duodenal, 2; duodenitis erosiva, 11). Los 59 pacientes restantes se diagnosticaron de dispepsia no ulcerosa.

En 63 pacientes se detectaron anticuerpos anti-CagA, que fueron más frecuentes en los sujetos con dispepsia ulcerosa (76,9%), que en los diagnosticados de dispepsia no ulcerosa (55,9%), siendo la diferencia significativa (p = 0,034). Presentaron anticuerpos frente a la proteína VacA 52 pacientes, que como en el caso de la proteína CagA, fue significativamente más frecuente en sujetos con dispepsia ulcerosa frente a la no ulcerosa (66,7% frente a 44,1%; p = 0,029) (tabla 1). En los pacientes con anticuerpos anti-VacA se encontró significativamente mayor frecuencia de anticuerpos frente a la proteína CagA (40/52; p = 0,006).

TABLA 1. Relación entre la detección de anticuerpos específicos anti-*Helicobacter pylori* y la sensibilidad a metronidazol y claritromicina entre los pacientes con dispepsia ulcerosa y no ulcerosa

	Número con dispepsia ulcerosa (%)	Número con dispepsia no ulcerosa (%)	Total (%)
Anticuerpos específicos			
Anti-CagA positivos	30 (76,9)*	33 (55,9)	63 (64,2)
Anti-VacA positivos	26 (66,7)**	26 (44,1)	52 (53,1)
Sensibilidad a metronidazol			
Sensible	27 (69,2)	33 (55,9)	60 (61,2)
Resistente	12 (30,8)	26 (44,1)	38 (38,8)
Sensibilidad a claritromicina			
Sensible	38 (97,4)***	49 (84,5)	87 (89,7)
Resistente	1 (2,6)	9 (15,5)	10 (10,3)

*p = 0,034; **p = 0,029; ***p = 0,046.

TABLA 2. Relación entre la presencia de anticuerpos específicos anti-*Helicobacter pylori* y la sensibilidad a metronidazol y claritromicina

Antibióticos	Número de anticuerpos frente a <i>H. pylori</i> (%)			
	Anti-CagA positivos	Anti-CagA negativos	Anti-VacA positivos	Anti-VacA negativos
Metronidazol				
Sensible	41 (65,1)	19 (54,3)	34 (65,4)	26 (56,5)
Resistente	22 (34,9)	16 (45,7)	18 (34,6)	20 (43,5)
Clarithromicina				
Sensible	62 (98,4)*	25 (73,5)	48 (92,3)	39 (86,7)
Resistente	1 (1,6)	9 (26,5)	4 (7,7)	6 (13,3)

*p = 0,0002.

La prevalencia de resistencia primaria de metronidazol fue del 38,8% (38/98) y para la claritromicina del 10,3% (10/97) (tabla 1). No se encontraron cepas resistentes ni a amoxicilina ni a tetraciclina.

Los pacientes con dispepsia ulcerosa presentaron con más frecuencia cepas sensibles a los antibióticos que los sujetos con dispepsia no ulcerosa, llegando la diferencia a ser significativa en el caso de la claritromicina (97,4% frente a 84,5%; p = 0,046) (tabla 1).

Al estudiar la relación entre la detección de anticuerpos y la sensibilidad antibiótica, encontramos que los pacientes con anticuerpos anti-CagA mostraron porcentajes más altos de cepas sensibles tanto a metronidazol (65,1% frente a 54,3%) como a claritromicina (98,4% frente a 73,5%), llegando a ser para este último la diferencia estadísticamente significativa (p = 0,0002) (tabla 2). Esto es lógico dada la asociación observada entre la dispepsia ulcerosa y la detección de anticuerpos anti-CagA⁶. Sin embargo, esta asociación también se mantuvo entre los pacientes con dispepsia no ulcerosa al estratificar según la presencia de anticuerpos anti-CagA con respecto a la claritromicina (p = 0,003) (tabla 3).

En cuanto a la determinación de anticuerpos anti-VacA, también se observó que los pacientes que presentaban estos anticuerpos tenían mayor porcentaje de cepas sensibles a metronidazol (65,4% frente a 56,5%) y claritromicina (92,3% frente a 86,7%), pero en ninguno de los casos la diferencia fue significativa (tabla 2).

Discusión

Recientemente se ha descrito la asociación entre la detección de los genes de virulencia *cagA* y *vacA* s1 y la

TABLA 3. Relación entre el *status* clínico, los anticuerpos anti-CagA y la sensibilidad a claritromicina (n = 97)

Estatus clínico	Número	Anticuerpos anti-CagA	Clarithromicina	
			Sensible	Resistente
Dispepsia ulcerosa	39	Positivo: 30 Negativo: 9	30 8	0 1
Dispepsia no ulcerosa	58	Positivo: 33 Negativo: 25	32* 17	1 8

*p = 0,003.

sensibilidad antibiótica a *H. pylori*⁹. En este trabajo, la determinación de la sensibilidad antibiótica se realizó mediante el E-test. Aunque el NCCLS recomienda para la práctica del antibiograma de *H. pylori* la dilución en agar, el E-test presenta una excelente correlación con los resultados obtenidos mediante aquella técnica²⁰, salvo para el caso del metronidazol donde pueden existir discrepancias²¹, y es más fácil de implementar en la rutina de los laboratorios de microbiología. Sin embargo, tiene el inconveniente de que los ensayos de difusión para *H. pylori* todavía no están estandarizados y no existe unanimidad en cuanto al medio de cultivo o el inóculo a emplear. En nuestro estudio, el E-test se realizó sobre placas de agar Columbia, medio ampliamente utilizado por otros autores^{20,21}, y a partir de un inóculo equivalente al n.º 3 de la escala de McFarland que recientemente se ha descrito como el más idóneo²².

La determinación de los factores de patogenicidad se realizó mediante serología y no por técnicas de diagnóstico

genético. Aunque las proteínas CagA y VacA son inmunogénicas y, por tanto, su detección se asociaría a la expresión de estos genes, se ha comunicado que la presencia de estos anticuerpos no siempre se relaciona con el estatus genético y puede carecer de relevancia clínica^{13,23}. Así, con respecto a la detección de anticuerpos anti-CagA el principal inconveniente descrito ha sido la comunicación de falsos positivos, en particular, en sujetos sin infección por *H. pylori*^{13,24}. Nuestro estudio fue llevado a cabo sobre pacientes infectados por *H. pylori*, por lo que dicho factor fue irrelevante. También se ha comunicado la existencia de falsos positivos anti-CagA en pacientes infectados por *H. pylori* con cepas no portadoras del gen *cagA*. Sin embargo, la mayoría de las cepas *cagA* positivas producen la proteína CagA²⁵, por lo que probablemente estén presentes y no sean detectadas. Esto puede ser debido a problemas metodológicos, como la utilización de cebadores que no detectan todas las variantes del gen²⁶, y sobre todo a errores en el muestreo, ya que las biopsias analizadas sólo representan una mínima porción de toda la mucosa gástrica. De hecho, diversos estudios han demostrado que hasta las dos terceras partes de los pacientes portan en su estómago a la vez cepas *cagA* positivas y *cagA* negativas²⁷⁻²⁹.

Otro factor que se debe considerar es la utilización de técnicas serológicas para detectar anticuerpos específicos frente a *H. pylori* que se correlacionen con el estatus genético²³. En este trabajo hemos empleado un *Western-blot* comercial (*Helicoblot 2.0*) que recientemente ha demostrado tener una excelente correlación entre la detección de anticuerpos anti-CagA y la presencia del gen *cagA*¹⁴. Por todo lo anteriormente comentado, creemos que en nuestro estudio la determinación de anticuerpos anti-CagA reflejó la expresión de este gen. Es más, la detección de dicha proteína fue un marcador predictivo de la presencia de úlcera y por lo tanto del estatus clínico de los pacientes ($p = 0,034$).

Con respecto al gen *vacA*, se han caracterizado cuatro familias de alelos de la secuencia señal (s1a, s1b, s1c y s2) y dos familias de alelos en la región media (m1, m2) que producen distintas isoformas de la proteína VacA. Las cepas que contienen el alelo *s1* son las que presentan mayor poder patógeno y las que producen citotoxicidad en los cultivos celulares. Se ha sugerido que las distintas isoformas de VacA tienen diferentes propiedades antígenicas, siendo las procedentes de las cepas *vacA* s1 las que producirían una isoproteína VacA que sería la principal responsable de la generación de anticuerpos³⁰. De hecho, aunque el gen *vacA* se encuentra en todas las cepas, la detección de anticuerpos anti-VacA mediante *Western-blot* sólo se observa en algunos pacientes, existiendo una buena correlación entre el hallazgo de anti-VacA y el ser portador de cepas *vacA* s1 relacionadas con el hallazgo de enfermedad ulcerosa^{8,14}. Así, en este trabajo observamos que la proteína VacA se asoció significativamente con la presencia de úlcera ($p = 0,029$). Además, como es conocido, la mayoría de las cepas *vacA* s1 son también *cagA* positivas⁸, y en nuestro estudio observamos que la detección de anticuerpos anti-VacA y anti-CagA estaba significativamente relacionada ($p = 0,006$). Esto por tanto, también apoya que el hallazgo de anticuerpos anti-VacA y Anti-CagA probablemente

refleje el estado de portador de cepas *vacA* s1 y *cagA*, respectivamente.

En nuestro estudio se halló asociación entre la presencia de factores de patogenicidad y la sensibilidad antibiótica. Así las cepas más virulentas (*CagA* positivas) eran las más sensibles a los antibióticos, alcanzando para la claritromicina significación estadística ($p < 0,001$). La detección de anticuerpos anti-CagA fue más frecuente en pacientes con dispepsia ulcerosa, por lo que estos sujetos tendrían una mayor posibilidad de éxito terapéutico frente a los sujetos con dispepsia no ulcerosa. Esta idea ya había sido sugerida por algún autor¹⁹ y recientemente Van Doorn et al¹⁰ han descrito que los pacientes con úlcera asociada a cepas *cagA* positivas y *vacA* s1 positivas mostraban una mayor proporción de erradicación que aquellos que sufrían dispepsia no ulcerosa. Es más, en nuestro estudio incluso los pacientes con dispepsia no ulcerosa que poseían anticuerpos anti-CagA seguían presentando cepas más sensibles y, por lo tanto, tendrían una mayor frecuencia de erradicación tras el tratamiento, como últimamente se ha comunicado¹¹.

Esta mayor resistencia antibiótica de las cepas menos patogénicas podría deberse a que la colonización por estas bacterias se acompañan de una menor inflamación y el antibiótico llegaría a concentraciones más reducidas, permitiendo de ese modo la posible selección de cepas resistentes. Además, las cepas *cagA* positivas presentan una mayor índice de división celular³¹. Dado que los antibióticos suelen ser más activos cuando la bacteria está en fase de crecimiento que cuando está en la fase estacionaria, las cepas *cagA* positivas serían más sensibles a los antibióticos. Hay que destacar que en este estudio los pacientes incluidos no habían recibido con anterioridad tratamiento erradicador, por lo que la resistencia detectada no obedecería a fracasos previos en la terapia frente a *H. pylori*.

En conclusión, la detección de anticuerpos anti-CagA en pacientes con infección por *H. pylori* además de ser un factor predictivo de la presencia de úlcera péptica⁶ sería un posible marcador de buen pronóstico de éxito terapéutico, tanto en pacientes con dispepsia ulcerosa como no ulcerosa.

Agradecimientos

A los Dres. Jorge Carbó y Antonio Íñiguez por su colaboración clínica, y a María José Zabalegui, Concepción Cañas y Sara Lozano por su excelente ayuda técnica.

Bibliografía

1. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ Jr, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. Gastroenterology 1991; 100:1495-501.
2. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther 1995;9(Suppl 29):59-69.
3. Boixeda C, Gisbert JP, Cantón R, Alvarez Baleriola I, Bermejo F, Aller R, et al. *Helicobacter pylori*, úlcera gástrica y antiinflamatorios no esteroideos. Med Clin (Barc) 1996;106:209-12.
4. Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric MALT lymphoma. N Engl J Med 1994;330:1267-71.
5. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345:784-9.

6. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration and gastric pathology. *Lancet* 1991;338:332-5.
7. Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleanthous H, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55:2111-5.
8. Blaser MJ. Heterogeneity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(Suppl 1):S3-6.
9. 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 Quimioterap* 1999;12:340-5.
10. Van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WGV, De Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut* 2000;46:321-6.
11. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, De Mascarel A, Samoyeau R, Salamon R, et al. cagA status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 2001;39:1819-22.
12. Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MK, Pérez-Pérez GI, et al. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1496-500.
13. Paoluzi OA, Rossi P, Montesano C, Bernardi S, Carnieri E, Marchione OP, et al. Discrepancy between polymerase chain reaction assay and western blot analysis in the assessment of CagA status in dyspeptic patients. *Helicobacter* 2001;6:130-5.
14. Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, Van der Munckhof H, Herbrink P, Scherpenisse J, et al. Assessment of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes and host serological response. *J Clin Microbiol* 2001;39:1399-44.
15. Maratka Z. Gastroscopia. En: Terminología, definición y criterios diagnósticos en endoscopia digestiva. Ed. Española. Normed-Verlarg 1986.
16. Cheli R, Giacosa A, Bovero E. Clinical significance of duodenal erosions. *Endoscopy* 1984;16:105-8.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S11, Vol 21, N° 1, Wayne, Pennsylvania 2001.
18. Lind T, Mégraud F, Unge P, Bayerdorffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. The MACH2 study: Role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999;116:248-53.
19. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdorffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: The MACH2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2747-52.
20. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E-test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2072-5.
21. Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12:19-26.
22. Grignon B, Tankovic J, Mégraud F, Glupczynski Y, Husson MO, Conroy MC, et al. Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microp Drug Resist* 2002;8:61-6.
23. Krausse R, Garten L, Harder T, Ullmann U, Birkner T, Doniec M, et al. Clinical relevance of CagA-specific antibodies related to CagA status of *Helicobacter pylori* isolates using immunofluorescence test and PCR. *Infection* 2001;29:154-8.
24. Yamaoka Y, Kodama T, Graham D, Kashima K. Comparison of four serological test to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1998;36:3433-4.
25. Miehlke S, Go MF, Kim JC, Graham DY, Figura N. Serologic detection of *Helicobacter pylori* infection with cagA-positive strains in duodenal ulcer, gastric cancer, and asymptomatic gastritis. *J Gastroenterol* 1998;33(Suppl 10):18-21.
26. Rota CA, Pereira-Lima JC, Blaya C, Nardi NB. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of cagA gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J Clin Microbiol* 2001;39:606-12.
27. Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE, Thompson N, Shames B, et al. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1995;33:918-23.
28. Van der Ende A, Raws EAJ, Feller M, Mulder CJ, Tytgat GN, Dankert J. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history a peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1996;111:638-47.
29. Figura N, Vindigni C, Covacci A, Presenti L, Burroni D, Vernillo R, et al. CagA positive and negative *Helicobacter pylori* strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance of histological damage. *Gut* 1998;42:772-8.
30. Pérez-Pérez GI, Peek RM, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Detection of anti-VacA antibody responses in serum and gastric juice samples using type s1/m1 and s2/m2 *Helicobacter pylori* VacA antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:489-93.
31. Censi S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghia P, Borodovsky M, et al. CAG, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:14648-53.