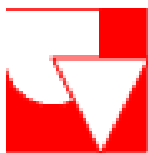


**“ SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* DE *Helicobacter pylori* Y EFICACIA TERAPEUTICA
DEL ESQUEMA DE TRATAMIENTO TRIPLE EN PACIENTES CON GASTRITIS
CRONICA PROCEDENTES DE ZONA DE BAJO RIESGO PARA CANCER
GASTRICO ”**

MERCEDES FIGUEROA MACCA. BSc



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE POSTGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS

CALI 2011

**“ SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* DE *Helicobacter pylori* Y EFICACIA TERAPEUTICA
DEL ESQUEMA DE TRATAMIENTO TRIPLE EN PACIENTES CON GASTRITIS
CRONICA PROCEDENTES DE ZONA DE BAJO RIESGO DE CANCER GASTRICO”**

MERCEDES FIGUEROA MACCA. BSc

Trabajo de investigación para optar título de:

Maestría en Ciencias Básicas Médicas

Director: **Armando Cortés Buelvas. MD, Patólogo Clínico**

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE POSTGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS

CALI 2011

NOTA DE APROBACION

El trabajo de grado titulado: " **SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Helicobacter pylori* Y EFICACIA TERAPEUTICA DEL ESQUEMA DE TRATAMIENTO TRIPLE EN PACIENTES CON GASTRITIS CRONICA PROCEDENTES DE ZONA DE BAJO RIESGO PARA CANCER GASTRICO** "; presentado por la estudiante **Mercedes Figueroa Macca**, para optar título de Maestría en Ciencias Básicas Médicas, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Dr. Armando Daniel Cortés Buelvas. MD. Patólogo Clínico
Director de Trabajo de investigación

Dr. Luis Eduardo Bravo Ocaña. MD, MSc. Patólogo Clínico
Co-Director de Trabajo de investigación

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Fecha: Cali, Febrero 2011

DEDICATORIA

“ La verdadera grandeza del ser humano no está en lograr el éxito, sino en el Dar ”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al comité de postgrado de la Escuela de Ciencias Básicas Médicas, de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, por concederme el ingreso a programa académico de postgrados en Ciencias Básicas Médicas, especialmente a la Dra. Anilsa Bonelo, quién me inspiró a iniciar mis estudios de postgrado.

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la culminación de este proyecto principalmente al Dr. Armando Daniel Cortes Buelvas por su confianza, paciencia, experiencia y persistencia al dirigir este trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Luís Eduardo Bravo Ocaña básicamente por ser referencia en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco a todos los profesores de la Universidad del Valle quienes contribuyeron a mi formación en este proceso académico.

A mis compañeros de estudio quienes aportaron sus comentarios y críticas oportunas, durante el proceso experimental y análisis de este trabajo.

Al Grupo Registro Poblacional de Cáncer de Cali, por su gran respaldo en la formación y desarrollo de este proyecto, y a todo el personal del Registro Poblacional de Cáncer de Cali por sus aportes oportunos.

Agradezco la paciencia, comentarios y apoyo incondicional de mi esposo Freddy Briceño, quien me acompañó durante todo el proceso de estos estudios.

Agradezco la presencia de mis padres, mis hermanos, mis sobrinos y mis amigos por el ánimo que me dieron para culminar este trabajo de investigación, no solo como reto académico, sino como proyecto personal.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCION	13
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA INFECCION POR <i>H. PYLORI</i>	15
3.2. MICROBIOLOGIA DE <i>H. PYLORI</i>	17
3.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i> Y FACTORES DE VIRULENCIA	21
3.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCION POR <i>H. PYLORI</i>	26
3.5. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	36
3.6. ERRADICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	42
3.7. RECURRENCIA, REINFECCIÓN Y RECIDIVA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	47
3.8. EFICACIA TERAPEUTICA DE LOS TRATAMIENTOS ANTIMICROBIANOS POR <i>H. PYLORI</i>	49
3.9. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS POR <i>H. PYLORI</i>	54
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	67
5. JUSTIFICACIÓN	70
6. OBJETIVOS	72
6.1. OBJETIVO GENERAL	72
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
7. MATERIALES Y MÉTODOS	73
7.1. TIPO DE ESTUDIO	73
7.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	73
7.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	74
7.4. Recolección y prepración de muestras	74
7.5. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	76
7.5.1. Transporte y congelación de biopsias gástricas	76
7.5.2. Procedimientos de Histopatología	77
7.6. Procedimientos Microbiológicos	77
7.6.1. Aislamiento de <i>H. pylori</i>	78
7.6.2. Pruebas de identificacion	80
7.6.3. Preparación de soluciones de trabajo de antibióticos Amx y Cla	82
7.6.4. Preparación de medios M.H.S	85
7.6.5. Preparación y siembra del inóculo bacteriano	86
7.6.6. <i>Criterios de Resistencia de aislados, puntos de Corte e interpretación CIM87</i>	87
7.6. SUMINISTRO DE TRATAMIENTO TRIPLE OCA	89
7.7. PRUEBAS EN ALIENTO (UBT)	90
7.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	91
6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92

8. RESULTADOS.....	93
8.1. RESULTADOS SOCIODEMOGRÁFICOS	93
8.2. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS	93
8.3.HALLAZGOS DE MICROBIOLOGÍA	94
8.3.1.Evaluación de aislamientos de H. pylori	95
8.3.2 . Susceptibilidad de aislamientos de H. pylori a amoxicilina y claritromicina	96
8.4 RESULTADOS DE PRUEBA EN ALIENTO	96
9. DISCUSION	98
10. CONCLUSIONES	107
11. BIBLIOGRAFÍA	109
LISTA DE ANEXOS	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> en Colombia.....	129
Tabla 2. Categorías diagnósticas según ciudad de procedencia en hospitales de Colombia.....	130
Tabla 3. Comparación de métodos diagnósticos de microbiología.....	131
Tabla 4. Factores que afectan la eficacia terapéutica de los tratamientos de erradicación de la infección de <i>H. pylori</i>	132
Tabla 5. Esquemas de tratamiento anti <i>H. pylori</i>	133
Tabla 6. Esquema de tratamiento anti <i>H. pylori</i> de tercera línea.....	134
Tabla 7 Prevalencia mundial de resistencia antimicrobiana.....	135
Tabla 8. Genes involucrados en mutaciones puntuales relacionados con resistencia antimicrobiana en <i>Helicobacter pylori</i>	136
Tabla 9 Promedios de Prevalencia de resistencia mundial de <i>H. pylori</i>	137
Tabla 10 Concentraciones de los antibióticos amoxicilina y claritromicina usadas en el método de dilución en agar.	138
Tabla 11 Condiciones recomendada para el método de dilución en agar.....	139
Tabla 12 Prevalencia de resistencia de <i>H. pylori</i> a Claritromicina en el Mundo.....	140
Tabla 13 Tabla de interpretación de la concordancia.	141
Tabla 14 Relación entre características demográficas, histopatología, control con UBT y aislamiento de <i>H. pylori</i> por cultivo.	142
Tabla 15. Relación entre factores de exposición y histopatología, control UBT seis semanas, cultivo y resistencia antimicrobiana.....	143

Tabla 16 Prevalencia de <i>H. pylori</i> según diagnóstico histológico y género en pacientes de Tumaco	144
Tabla 17 Aislamiento de <i>H. pylori</i> obtenido en cultivo a partir de biopsias gástricas provenientes de pacientes con gastritis crónica de Tumaco.	145
Tabla 18 Calidad de los aislados de <i>H. pylori</i> obtenidos en cultivos a partir de biopsias gástricas provenientes de Tumaco.	146
Tabla. 19 Frecuencia de crecimiento por días de <i>H. pylori</i> a partir de biopsias Gástricas de pacientes provenientes de Tumaco.	147
Tabla 20. Frecuencia de contaminación observada en cultivos durante aislamiento <i>H. pylori</i> a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco.....	148
Tabla 21 Prevalencia de <i>H. pylori</i> según método diagnóstico.....	149
Tabla 22 Prevalencia de <i>H. pylori</i> según método diagnóstico, número y fragmento gástrico.....	150
Tabla 23 Frecuencia relativa y acumulada de resistencia de aislados de <i>H. pylori</i> a amoxicilina y claritromicina obtenidos a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco.....	151
Tabla 24 Frecuencia de resistencia de aislados de <i>H. pylori</i> a amoxicilina y Claritromicina.....	152
Tabla 25 Relación entre datos demográficos y resistencia de <i>H. pylori</i> a amoxicilina y claritromicina	153
Tabla 26 Relación entre datos demográficos y prueba de UBT obtenidas en pacientes post tratamiento triple administrado según Consenso de Maastricht III.	154
Tabla 27 Cálculo de concordancia entre resultados de resistencia de <i>H. pylori</i> a Amx <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	155
Tabla 28 Concordancia entre resultados obtenidos <i>in vitro</i> de resistencia de <i>H. pylori</i> e <i>in vivo</i> con prueba en Aliento UBT.	156
Tabla 29 Eficacia terapéutica del esquema OCA 2 en el mundo.....	157

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1. Composición de la Superfamilia VI ARNr	18
Figura No 2 Mutaciones en el dominio V de 23S <i>rRNA</i> de <i>H. pylori</i> relacionado con resistencia a claritromicina.....	61
Figura No 3. Mecanismo de resistencia amoxicilina en <i>H. pylori</i>	63
Figura No 4. Topografía de la procedencia de las biopsias gástricas tomadas mediante endoscopia a pacientes con gastritis crónica procedente de Tumaco.	76
Figura No 5 Método de Dilución en agar de Amoxicilina y claritromicina para evaluar susceptibilidad de <i>H. pylori</i>	89

RESÚMEN

Título del trabajo de investigación: " Susceptibilidad *in vitro* de *Helicobacter pylori* y eficacia terapéutica del esquema de tratamiento triple en pacientes con gastritis crónica procedentes de zona de bajo riesgo a cáncer gástrico".

Introducción: La infección por *H. pylori* prevalece en más de la mitad de la población mundial. En Colombia existen zonas de alta prevalencia de la infección como Tumaco (90%); En zonas con alta prevalencia de la infección, es prioritario evaluar la susceptibilidad actual *in-vitro* de *H. pylori* a los antimicrobianos usados en los protocolos de erradicación, con el fin de no sólo resolver la infección, sino de prevenir diferentes lesiones precursoras de cáncer asociadas a su persistencia.

Palabras clave: Gastritis, *H. pylori*, amoxicilina, claritromicina, eficacia, Maastricht.

Objetivos: A partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica provenientes de zona de bajo riesgo a cáncer gástrico (Tumaco) se les logró: determinar la respuesta antimicrobiana de *Helicobacter pylori* aislado a partir de biopsias gástricas y evaluar la eficacia terapéutica del esquema triple Omeprazol, claritromicina y amoxicilina sugerido por Maastricht 2006. **Metodología:** Se determinó la prevalencia de la infección y la susceptibilidad antibiótica a partir de 203 pacientes con gastritis crónica procedentes de Tumaco, a quienes se les tomó mediante endoscopia digestiva superior 7 biopsias gástricas, las cuales fueron analizadas mediante pruebas histopatológicas (escala Dixon), microbiológicas (aislamiento por cultivo en agar sangre suplementado con antibióticos) y de resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos amoxicilina y claritromicina mediante el método de dilución en agar. La erradicación de la infección se evaluó mediante la prueba en aliento UBT con [¹³C]-Urea, por espectroscopia de luz infrarroja (Iris-doc), después de haber suministrado el tratamiento triple (Omeprazole+Cla+Amx por 14 días) a los pacientes que resultaron mediante histopatología positivos para *H. pylori*. **Resultados:** el promedio de edad fué 40.43 años; 70.94% fueron mujeres. La prevalencia de la infección mediante histopatología (Escala

Dixon) fué del 88.7% (cuerpo 98.3%, antro curvatura menor 94.4% y curvatura mayor 92.2%), por microbiología (Cultivo en agar Columbia) del 84.7% (48.51%, 43.35% y 53.26%: antro, curvatura menor; antro curvatura mayor y cuerpo respectivamente); entre ambos métodos fué del 94%. La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos (dilución en agar) amoxicilina y claritromicina y a ambos antibióticos fué 21.2%, 21.2 y 12.3 respectivamente. El éxito del esquema triple (Omeprazole+Cla+Amx por 14 días) recomendado por el Consenso Maastricht III del 2006 fue del 79.8%. Estos resultados verifican que en esta población existe alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, y alta prevalencia de resistencia a claritromicina y amoxicilina. También se encontraron cepas multirresistentes a ambos antibióticos. Este trabajo contradice estudios preliminares en el mundo que aseguran que la resistencia *in vitro* claritromicina mayor del 18% predice el fracaso terapéutico.

INTRODUCCIÓN

La infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial¹. *H. pylori* es considerado como uno de los patógenos más importante del ser humano (López-Brea 2001). La ruta de transmisión es generalmente gastro-oral y fecal-oral, aunque posiblemente la bacteria puede también transmitirse a través de la exposición a comida o agua contaminada. La infección se adquiere usualmente durante la niñez y puede persistir durante toda la vida si no es erradicada. La mayoría de las infecciones (80%) transcurren como asintomáticas, mientras que entre 10-15% de los pacientes persiste, causando enfermedades gástricas, como gastritis atrófica, úlcera péptica, lesiones pre neoplásicas y neoplásicas como el adenocarcinoma gástrico² ó linfoma asociado al tejido linfático de mucosa gástrica (MALT).

El cáncer gástrico es multifactorial, está asociado a alteraciones celulares y microambientales de la mucosa gástrica, como resultado de la persistencia de procesos inflamatorios y daños mutagénicos de la mucosa gástrica causados principalmente por proteínas citotóxicas propias de *H. pylori* virulentos³, además de predisposición genética del hospedero^{4,5}, disminución de las funciones antioxidantes de la mucosa⁶ pérdida del tejido glandular progresivo, aumento de la proliferación celular, que de manera crónica pueden ocasionar lesiones preneoplásicas progresivas⁶. Una de las estrategias actuales para combatir la infección es administrar tratamiento de erradicación según los protocolos de Maastricht III, debido a que modifica el curso natural de la enfermedad ulcerosa, lesiones pre neoplásicas y neoplásicas (Malfertheiner et al 2007)⁶⁹.

De acuerdo, a las recomendaciones del III Consenso de Maastricht de 2006⁶⁹, el tratamiento de primera línea consta de una triple terapia basada en un inhibidor de la bomba de protones (IBP) con los antibióticos claritromicina y metronidazol siempre que la prevalencia de la resistencia a metronidazol sea menor del 40%, caso contrario, sustituir metronidazol por amoxicilina si la prevalencia de resistencia a claritromicina no supera el rango de 15-20%. Estos esquemas han logrado tasas de erradicación hasta un 97% y 88% respectivamente, sin embargo los niveles de resistencia al metronidazol

(20-95%, según el país de origen, obligan implementar otras opciones como amoxicilina o tetraciclina. Este consenso recomienda suministrar los anteriores tratamientos por 14 días según la siguiente posología: claritromicina 500mg 2 veces/día (2v/d), metronidazol 500mg 2 v/d, amoxicilina 1000mg 2 v/d y omeprazol 20mg 2 v/d⁶⁹.

Los esquemas de tratamiento más recomendados incluyen inhibidores de bomba de protones y dos antimicrobianos (Omeprazole+Cla+Amx), ó sales de bismuto con amoxicilina y metronidazol (Amx y Mtz).

En una población con alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, es prioritario evaluar la susceptibilidad *in-vitro* de la bacteria a los antimicrobianos para determinar los patrones de resistencia y resolver la infección. En Colombia existen zonas de alta prevalencia de la infección como Tumaco (90%); donde se desarrollan actualmente diferentes trabajos de investigación, con el fin de erradicar esta bacteria, no solo para resolver la infección, sino para prevenir diferentes lesiones pre neoplásicas y neoplásicas asociadas a su persistencia. Este trabajo de investigación permitió confirmar en la población de Tumaco, la alta prevalencia de infección por *H. pylori*, evaluar la resistencia a amoxicilina y claritromicina, y además detectar la eficacia terapéutica del esquema triple (Omeprazole+Cla+Amx) recomendado por el último Consenso Maastricht III del 2006 (OCA). Además permitió comprobar que la resistencia *in vitro* a Amx y Cla no predice el fracaso terapéutico del tratamiento triple OCA en la población de Tumaco.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA INFECCION POR *H pylori*

La infección por *H. pylori* es de distribución mundial; afecta a más del 50% de la humanidad¹; se adquiere durante la infancia, y prevalece por toda la vida si no es erradicada, es más frecuente en países en desarrollo, con condiciones deficientes de sanidad, en donde prevalece entre el 70 - 80 % en infantes, mientras que en adultos prevalence entre 80 - 90%; en contraste con países desarrollados donde la prevalencia varía entre 0.5 % a 1 % en infantes y en adultos entre 20 - 50%; es la principal causa de gastritis crónica, úlceras gastroduodenales³ y está asociada al desarrollo de cáncer gástrico; ya que incrementa entre 2 a 6 veces el riesgo a desarrollar cáncer gástrico y linfoma tipo MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)^{3,4}. Esta infección está asociada al estado final del adenocarcinoma gástrico tipo intestinal especialmente cuando la infección se adquiere en la niñez^{1, 5, 6} (Dowsett 1999). En los países desarrollados la prevalencia de úlcera duodenal supera 90 %, y de la úlcera gástrica es del 80 %^{7,8}. Esta prevalencia disminuye mucho post erradicación del *H. pylori*^{9,10}. Esta asociación entre la infección y las lesiones precursoras de cáncer y cáncer gástrico, permitió que en 1994 la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC)¹² y la OMS clasificaran al *H. pylori* como carcinógeno tipo I.

3.1.1 Prevalencia de *H. pylori* en el Mundo

América latina alcanza una media del 60% en población sintomática de infección por *H pylori*, con variación entre 30 y 90%^{3, 9, 10}.

Los factores de riesgo pueden variar no solo en países sino entre poblaciones; el factor de riesgo de vivir en estrato socioeconómico bajo, ha facilitado diseñar estudios epidemiológicos para determinar prevalencias principalmente y diferenciar el nivel de desarrollo no solo de cada país, sino de continentes^{3,9,10}. Se estima una prevalencia en

niños a nivel mundial del 30 %, con cifras de seroconversión de 24 % entre los 3 y 5 años, y del 45 % entre los 16 a 20 años^{15, 16, 17}. En menor escala influyen, la edad, etnia y el género. En EEUU las diferencias entre poblaciones es mayor, se observa que en blancos la prevalencia de la infección es < 10 %, en caucásicos, africanos, indígenas autóctonos y latinos es del 50 %, principalmente en ancianos. En inmigrantes la prevalencia de la infección sobre pasa el 60 % (Pajares *et al.* 2007)¹⁶²

Es evidente que entre múltiples estudios de sero-prevalencia realizados en el mundo, México reporta un incremento progresivo de la prevalencia de la infección, partiendo en menores de un año con 20%, cifra que asciende 5% progresivamente hasta los 10 años de edad, hasta alcanzar un 80 % entre 18 a 20 años de edad (Torres *et al.* 1998)¹⁵. Otros estudios reportan cifras controversiales sobre la prevalencia de *H. pylori* en infantes. Varía entre 8.9 % a 72.8% en países desarrollados y en desarrollo respectivamente²⁰¹ (Queiroz *et al.* 2001). Como lo registran España y Austria (15.8% y 28,3%)¹⁸; en contraste con países latinoamericanos como México, Brasil, Ecuador, Cuba (47.6%, 48.8%, 63.3% 67.7%)^{17,19}, Colombia (36.7%), y en el Medio Oriente Israel, Turquía e Irán (49.7%, 57% y 82%). Estudios de prevalencia en preadolescentes entre 11 y 14 años, registra hasta un 40.6 % , en adolescentes entre 15 a 17 años de 48.6 %, y en adultos jóvenes del 59.8 % entre 18 a 24 años de edad; Otro estudio hecho en infantes de Puebla, México, de diferentes estratos socioeconómicos reporta prevalencia de *H. pylori* de 24.46 % , 18.08% y 2.12% en los niños de estrato bajos, medio y alto respectivamente, indicando que en la sero-prevalencia influye la edad y el estrato socioeconómico^{18, 19, 20,21}.

3.1.2. Prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia.

Según Bravo *et al.*, 2003, la prevalencia de la infección por *H. pylori* es muy alta en todo el país, principalmente en ciudades como Pasto, Túquerres, Tumaco, Bogotá, Tunja y Manizales (99.1% y 85.5%). **Tabla No.1.** En general es evidente que en los grupos con bajo nivel socioeconómico y en los países "en desarrollo" la prevalencia global aumenta hasta 80%. En el caso de Colombia, existen reportes altos de seroprevalencia (96.3%),

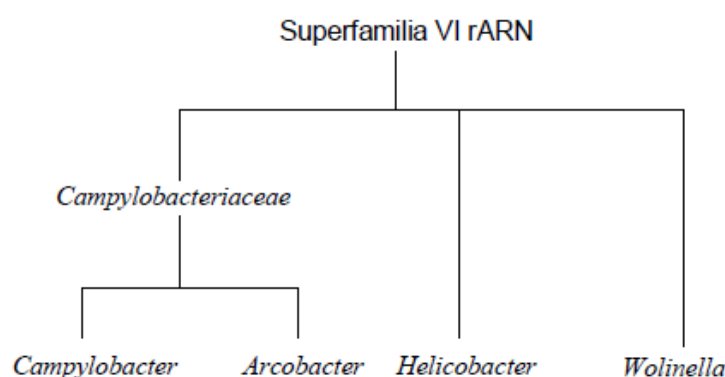
principalmente desde la juventud (96%), en el grupo de 18-24 años. La seroprevalencia es mayor a medida que se aumenta de edad, lo cual indica un alto índice y riesgo de adquirir la infección por *H. pylori* durante la edad temprana en todas las regiones geográficas de Colombia, sin depender de la variedad étnica.^{22, 23,24} aunque en ciertas poblaciones de un mismo país existan variaciones significativas, debidas por diferencias étnicas y nivel socioeconómico, en especial durante la infancia^{22, 23, 25}. Es evidente que en zonas de alta mortalidad por cáncer gástrico, la seroconversión o infección es más temprana, indicando que en Colombia existe un gran riesgo ecológico para adquirir tempranamente la infección por *H. pylori*. En nuestro País, en general las poblaciones montañosas, las tasas de cáncer gástrico son altas, en contraste con la costa pacífica y atlántica donde la prevalencia de ésta neoplasia es muy baja; de manera similar en el departamento de Nariño, se documenta prevalencia de la infección por *H. pylori* hasta del 90%, tanto en Túquerres (con altitud >2800 mts s.n.m), como en Tumaco localizado en la costa pacífica. La incidencia de cáncer gástrico para poblaciones de las altitudes de Nariño es de 150 por 100.000 habitantes², en contraste con la incidencia de 2.6 por 100.000 para personas que viven en Cartagena²⁵ (**tabla No 2**). En un estudio de casos y controles en Nariño reporta un riesgo relativo de cáncer gástrico de 2.1 para sujetos que viven por encima de los 2.000 m sobre el nivel del mar, comparado 0.47 para sujetos que viven entre 1000 y 2000 mts. *Bravo y cols 2003* identifican al departamento de Nariño como una de las regiones colombianas con mayor prevalencia de cáncer gástrico²⁵.

3.2 MICROBIOLOGIA DE *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria que pertenece a la superfamilia VI rARN²⁶ Gram negativa, curva, espiriforme, de bordes redondeados, móvil, no fermentadora, no oxidante, catalasa y oxidasa positivas, caracterizada por hidrolizar rápidamente la urea mediante la enzima ureasa²⁷. Posee un tamaño entre 0.5 a 1 µm de ancho y 2.5 a 4 µm de largo, con 4- 8 flagelos polares de 30 a 25 nm, cubiertos por una vaina con estructura lipídica similar a la de la membrana externa, que los protege de la degradación o despolimerización del ácido gástrico. Estos se insertan en el cuerpo bacteriano

mediante un disco de 90 nm. En su genoma existen cuarenta proteínas implicadas en la regulación, secreción y ensamblaje de la arquitectura flagelar²⁸ (Suerbaum et al, 1995). Como Gram negativo posee una membrana interna o plasmática y otra externa; su composición interna se caracteriza por un complejo constituido por proteínas, elementos fibrilares nucleares y ribosomas, que se entremezclan entre sí, pudiendo mostrar en ocasiones bacteriófagos²⁹. Su membrana externa está compuesta por peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPS), (antígeno O) con baja actividad inmunogénica. Además posee un sistema de secreción tipo IV, conformado por proteínas Vir B, que permiten inyectar material génico y proteico a las células hospederas²⁹.

Figura No. 1. Composición de la Superfamilia VI ARNr (Vandamme et a. 1991)



H. pylori puede presentar tres formas, una forma espiral, una curva y otra cocoide; todas pueden encontrarse en el estómago y duodeno; generalmente la forma espiral, en S simple o doble, se observa en biopsias gástricas. La forma curva y menos flagelada se observa generalmente en cultivos³⁰ las formas cocoides no se adhieren al epitelio, no induce la formación de citoquinas y generalmente son formas de resistencia capaz de soportar las condiciones adversas del medio ambiente³¹, metabólicamente activas pero inviables para ser cultivadas de nuevo *in vitro*³² en condiciones adversas como anaerobiosis bajas, temperaturas altas o incubación prolongada. *H. pylori* posee una capacidad limitada de biosíntesis, por lo tanto usa múltiples sistemas de transporte como fuente de iones y aminoácidos esenciales para subsistir; según Kelly et al, 2001, utiliza lactoferrina como fuente de hierro, la hidrólisis de ATP para sus sistemas primarios de transporte, y transporte iónico o secundario para transportar diferentes

solutos (aminoácidos, fumaratos, malato y oxoglutarato); *H. pylori* utiliza sólo la glucosa como sustrato de hidratos de carbono y de fosforilación. Además obtiene energía a partir de la degradación de la serina, alanina, aspártico y prolina y de la glicolisis-gluconeogénesis, para poder sintetizar peptidoglicano, fosfolípidos, aminoácidos esenciales, ácidos grasos y cofactores derivados del acetil-CoA o de los intermediarios de la ruta de la glicolisis. Como fuente de nitrógeno *H. pylori* usa vías de síntesis y degradación de purinas y pirimidinas incluyendo urea, amonio, alanina, serina y glutamina. La asimilación del amonio se produce por la vía del enzima glutamato sintetasa. Los aminoácidos básicos - Arginina y lisina- están doblemente presentes en *H. pylori* con respecto a *H. influenzae* y a *E. coli*, permitiendo su fácil adaptación al medio gástrico ácido y a la capacidad de generar un potencial positivo intracitoplasmático. También contribuye de manera importante a la sobrevivencia de *H. pylori* en la acidez gástrica la presencia de la enzima ureasa, un factor de virulencia que permite alcalinizar el microambiente al hidrolizar la urea en amonio y carbonato, iniciando daño tisular gástrico, donde el incremento del ión OH⁻, activación del islote de patogenicidad PAI³³ inducción de secreción de IL-8 (Activación del gen *picB*, por las células epiteliales gástricas, el estallido respiratorio de los neutrófilos, su movilidad y persistencia en la mucosa gástrica, contribuyen a la colonización de *H. pylori* ³⁴. Los factores de virulencia están presente en el 60% de las cepas colonizantes de *H. pylori* y aproximadamente el 40% presentan plásmidos (entre 1,5 a 23,3 kb) que no contienen factores de virulencia conocidos³⁵.

H. pylori crece lentamente en medio de agar con sangre de cordero al 8-10%, en ambiente microaerofílico (5-6 % de O₂, 8-10% CO₂, 80-85% de N₂), con hidrógeno y como fuente de energía usa la metanogénesis. Crece en medios de cultivo selectivos y enriquecidos con nutrientes como (Campy Bap, medio para cultivo de Brucella, de Skirrow, entre otros), como: Peptona, triptona, extractos de levadura, glucosa, cloruro de sodio, bisulfito de sodio, sangre de cordero o caballo y/o suero fetal bovino, a un pH entre 6.6 a 8.4 y a temperaturas entre 33 a 40.5 °C. Para su crecimiento requiere por lo menos seis días de incubación, Sus colonias son pequeñas, transparentes y brillantes, similares a las colonias de *Campylobacter*; se identifica mediante pruebas de catalasa, coloración de Gram, citocromoxidasa, reacción de ureasa rápida que desdobla urea en

pocos minutos. Esta prueba es definitiva, ya que no existe otro aislamiento bacteriano de la mucosa gástrica, similar al *H. pylori* productor de ureasa²⁷.

El tamaño del genoma de *H. pylori* varía entre 1.6 a 1.73 Mb, como se observa en la cepa toxigénica de *H. pylori* 26695 (*vacA* +) que posee un genoma circular de 1.667.867 pares de bases y 1.590 genes (Cada uno con 945 pb). Posee un contenido promedio de 39% de G+C, y generalmente presenta gran diversidad en los genes que codifican a las proteínas de ureasa, flagelina, CagA y VacA³⁶ y adhesinas como BabA, SabA, AlpA, AlpB, Hopo, HpA para colonizar la mucosa gástrica, e iniciar señalización intracelular, induciendo infiltrado de neutrófilos y monocitos³⁷ y la secreción de Interleucina 8 IL-8. Además activa transcriptos como *ap-1*, la cascada de cinasas y la expresión de proto-oncogenes: La OipA favorece la adherencia e inflamación local estimulando la secreción de IL-8.

3.2.1 Características bioquímicas de *H. pylori*:

Entre las principales enzimas que permiten identificar a *H. pylori* se identifican:

3.2.1.2. Ureasa²⁷:

Es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar la úrea produciendo amonio y carbonato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico para alcalinizar el microambiente bacteriano. Este mecanismo bioquímico permite que *H. pylori* colonice la mucosa gástrica, al sobrevivir al medio adverso del ácido gástrico. Esta enzima se localiza en el citosol y en la membrana del *H. pylori*, representando alrededor de un 5% del total de las proteínas celulares de la bacteria. Además activa fuertemente la fagocitosis por los mononucleares³⁸.

3.2.1.2 Catalasa:

Es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno y la convierte en agua liberando oxígeno. Esta enzima juega un rol importante en la resistencia bacteriana a la fagocitosis de los polimorfonucleares.

Existen otras enzimas implicadas en patogénesis detalladas más adelante, como Super Óxido Dismutasa SOD que inhibe la fagocitosis, las fosfolipasas A y C, mucinasas y

adhesinas que contribuyen a la colonización por *H. pylori* en la el antro ó cuerpo gástricos⁴⁰.

3.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori* Y FACTORES DE VIRULENCIA

Los estudios sobre *H. pylori* realizados por Marshall y Warren se remontan al año 1982, cuando se aisló con éxito *H. pylori* a partir de mucosa gástrica obtenida de pacientes con gastritis. Estos autores observaron que unas bacterias helicoidales colonizaban la parte inferior del estómago (el antro pilórico) en el 50% de los pacientes y que la inflamación estaba siempre asociada a la presencia de *H. pylori*, proponiendo en efecto, que esta bacteria estaba implicada en la patogenia de esta enfermedad⁴². Es desde entonces que esta infección ha sido estudiada por múltiples investigadores; permitiendo establecer su forma de transmisión, diagnóstico, tratamiento y avances moleculares que ha logrado conocer más sus mecanismos etiopatogénico.

3.3.1. Transmisión de la infección por *H. pylori*.

La vía de transmisión de la infección por *H. pylori* es muy controversial. Usualmente se adquiere durante la niñez y puede persistir durante toda la vida en el hospedero.

El riesgo de infección aumenta con la edad y el hacinamiento. La vía de transmisión más aceptada es la fecal-oral, además de la oral-oral y gastro-oral⁴³

3.3.1.1. Fecal-oral: El consumo de aguas contaminadas con heces como fuente de contagio de *H. pylori*, es muy controversial, aunque estudios con técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, concluyan que *H. pylori* es más resistente al cloro que las bacterias coliformes comunes, y permanece viable en el agua por varios días, o en formas viables no cultivables, favorece su transmisión⁴⁴. Esta forma de transmisión es sugerida principalmente en niños, quienes tienen con mayor frecuencia contacto con heces⁴⁴.

3.3.1.2. Oral- oral: A través de la placa dental La transmisión de *H. pylori*, es aún controversial, debido a que higienistas orales y odontólogos quienes posee el riesgo ocupacional, no muestran mayores índices de infección⁴⁴.

3.3.1.3 Gastro-oral: El aislamiento del *H. pylori* en jugo gástrico y vómitos de personas infectadas, confirman esta fuente de transmisión. La transmisión iatrogénica a través de sondas oro gástricas, endoscopías y accesorios, son poco comunes⁴⁵.

No hay posibilidad de transmisión a través del acto sexual o por vectores mecánicos transmisores^{45, 53}. Los seres humanos parecen ser el principal reservorio de la bacteria. Actualmente no existe evidencia de transmisión zoonótica de esta infección; sin embargo *H. pylori* ha sido aislado de animales como primates, gatos domésticos, ovejas, donde la bacteria ha sido aislada en la leche, saliva y jugo gástrico^{46,47}. Ocasionalmente los humanos pueden ser infectados por otra especie, como *H. heilmannii*, encontrada en perros, gatos, cerdos y primates, asociada a gastritis leve en la mayoría de los casos, aunque ha sido asociada con el desarrollo de linfomas tipo MALT⁴⁶

3.3.2. Patogénesis de la infección por *H. pylori*

En el mundo se conoce que la infección por *H. pylori* causa gastritis en más de la mitad de la población y es el agente etiológico del 95 % de las úlceras duodenales, 70-80 % de las úlceras gástricas y está relacionada con un 60-70 % de los casos de cáncer gástrico, una de las neoplasias más frecuentes en el mundo^{48, 49}, clasificándolo en 1994 la OMS como un cancerígeno tipo I¹¹. A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, la mayoría (80%) de las infecciones transcurren como asintomáticas, mientras que entre el 15 al 20% de los pacientes, desarrollan enfermedades gastroduodenales, como la gastritis crónica no atrófica (o gastritis antral difusa, sin pérdida glandular) ó progresan hacia úlcera péptica, ó hacia gastritis atrófica (generalmente multifocal con metaplasia intestinal), ó a displasias, carcinoma gástrico ó linfoma tipo MALT⁵⁰. La frecuencia de estas complicaciones es variable¹, depende de

diferentes factores tanto inmunes, ambientales, nutricionales y/o de virulencia del *H. pylori*^{2, 6}. Alrededor del 75% de pacientes con cáncer gástrico principalmente en antro, padecen de infección por *H. pylori* considerando esta infección como el principal factor medio ambiental en estas patologías⁵¹. Otros factores clásicos contribuyentes a la aparición de úlceras pépticas han sido estudiadas, como el estrés que facilita la evolución de la infección por *H. pylori* hacia una úlcera gástrica a causa de hiperclorhidria gástrica, reducción de respuesta inmune gástrica, y colonización del duodeno por *H. pylori* mediante la neutralización del efecto inhibitorio de la bilis mediante múltiples factores de sobrevivencia de la bacteria aún no claros⁵¹.

Las manifestaciones clínicas de la infección por *H. pylori*, dados por cepas virulentas VacA + /CagA + es el resultado de la acción sinérgica de diversos mecanismos (Blaser, 1991)^{48, 52,54} sucedidos entre la interacción entre la bacteria y el hospedero que han permitido lesiones en la mucosa gástrica.

3.3.2.1. Especies de *Helicobacter* relacionadas con patogénesis

Existen más de 28 especies de *Helicobacter* implicados en la patogénesis de las enfermedades gastrointestinales y entero-hepáticas. Las especies cuyos estudios taxonómicos aún no han concluido, se han descrito como *Helicobacter sp*^{54,55,56}. En función del nicho ecológico, el género se clasifica en dos grupos principales:

3.3.2.1.1. Especies de localización gástrica:

Se han descrito 10 especies de *Helicobacter* en estómagos de hombres o animales.

Diversas especies de se han identificado en el tracto intestinal y/o en el hígado de hombres, otros mamíferos y pájaros^{54,55}

Estas especies tienen similitudes de ultra-estructura y fisiología con las especies gástricas, pero no colonizan la mucosa gástrica. Algunas de estas especies pueden

considerarse como componentes de la microbiota residente o normal de algunos animales ^{56,57}. La primera especie descubierta *H. pylori* es responsable actualmente de gastritis en la mitad de la población mundial, asociada con 70-80 % de las úlceras gástricas, con un 95 % de úlceras duodenales, 60-70 % de los casos de cáncer gástrico y con el linfoma gástrico tipo MALT. Actualmente se han descubierto otras especies como el *H. acinonychis*, *H. bizzozeroni*, *H. Boris*, *H. feliz*, *H. heilmannii*, *H. mustelae*, *H. nemestrinae*, *H. salomoni* y *H. soncus* ⁵⁸

3.3.3. Factores que contribuyen a la colonización de *H. pylori* en mucosa gástrica.

Existen diferentes mecanismos que interactúan sinérgicamente para propiciar un microambiente de sobrevivencia de la bacteria tales como:

- **Alteración de la fisiología gástrica:** La infección por *H. pylori* induce la secreción de gastrina en las células G, y evita la secreción de somatostatina, péptido inhibidor de la secreción ácida.
- **Inhibición de la migración y proliferación de las células epiteliales** (Moss et al., 1996) y de la respuesta de las células productoras de moco.
- **Presencia aumentada de aminoácidos básicos** (arginina – lisina) en la estructura de *H. pylori*.
- **Acción de múltiples enzimas: Ureasa:** Neutraliza la acidez gástrica que degrada la urea alcalinizando el microambiente gástrico y activando fuertemente la fagocitosis por mononucleares⁵⁸. Cuadro No. 1:

- **Catalasa y Super Óxido Dismutasa SOD:** Inhibición de la fagocitosis por los polimorfonucleares ⁵⁹.
- **ATPasa:** Bloqueo del efecto bactericida de los inhibidores de la bomba de protones anti *H. pylori*⁶⁰.
- **Adhesinas:** Involucradas en la fijación del microorganismo a las células epiteliales del estómago, resistiendo el peristaltismo⁵⁸

- **Otras enzimas:** como fosfolipasas A y C y mucinasas contribuyen a la alteración de la mucosa gástrica⁶⁴
- **Inducción de secreción de citocinas inflamatorias** como la IL-8⁶².
- **Reclutamiento y activación de neutrófilos**⁶²
- **Aumento de la producción de radicales libres de oxígeno:** La inducción del óxido nítrico sintetasa y elevados niveles de óxido nítrico se han asociado con la activación inmunitaria y lesión tisular.
- **La apoptosis:** El *H. pylori* induce la muerte celular programada de las células de epitelio gástrico.
- **Movilidad:** Los flagelos de *H. pylori* codificados por los genes *flaA* y *flaB*⁶⁰ favorecen el mantenimiento de la bacteria en la capa de moco gástrico. Se ha demostrado que cepas carentes de flagelos son incapaces de colonizar modelos animales^{62, 63}.
- **Evasión a la respuesta inmune:** El *H. pylori* muestra resistencia a la fagocitosis, quizás por aumento de amonio y a la expresión del antígeno Lewis por *H. pylori*, mediante mecanismos de mimetismo molecular que permiten camuflar a la bacteria⁶⁵.
- **Formas cocoides:** confieren resistencia en condiciones ambientales hostiles. Generalmente aparecen en cultivos con prolongados días de incubación.
- **La diversidad genética:** es una de las características de *H. pylori*, en comparación con otras bacterias Gram negativas, debido a que es altamente competente para captar ADN, permitiéndole recombinaciones genéticas entre cepas, dando lugar a poblaciones con estructura genética recombinante y genes organizados en forma de mosaico^{62, 66, 67}. Esta cualidad permite la colonización en la mucosa gástrica indefinidamente en el hospedero, como resultado de su extensa diversidad genética adquirida, por borrar, reacomodar y generar mutaciones de secuencias de ADN; facilitando la adaptación a nuevos hospederos infectados, la persistencia y el incremento de la prevalencia de infección a nivel mundial; la variabilidad del genoma o las llamadas variaciones

genéticas mayores del *H. pylori*, que infectan a diferentes individuos no relacionados, y a la menor diversidad clonal de *H. pylori* en un mismo individuo, están relacionados con su línea familiar^{62, 68}, representando un factor importante en la transmisión horizontal de la infección por *H. pylori*.

Cuadro No. 1 Proteínas de *H. pylori* que contribuyen a su patogenicidad^{52,61, 63,64}

Factor	Función	Distribución
Ureasa	Tamponización del medio	Todas
Flagelos	Movilidad	Todas
NAP	Activación de neutrófilos	Todas
BabA	Adhesina para Le ^b	Tipo I
LPS	Baja toxicidad	Todas
Ag Lewis ^{x,y}	Mimetismo molecular	Algunas
IceA	Adhesión	Algunas
VacA	Citotoxicidad	Todas
cag PAI	Complejo	Tipo I
CagA	Citotoxicidad PAI	Tipo I

3.4 DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR *H. pylori*

Las indicaciones para el diagnóstico y tratamiento del *H. pylori*, son aún controversiales, pues no hay un método ideal para su detección⁶⁹, ya que depende del contexto clínico del paciente, la necesidad de realizar o no la endoscopia gástrica, las fortalezas y debilidades de cada método, y finalmente el costo⁷⁰.

La demostración de que *H. pylori* está asociado a gastritis antral, a úlcera péptica cáncer gástrico y a linfoma gástrico tipo MALT, ha producido eclosión de los métodos diagnósticos, pero a pesar de muchas ventajas, ninguno es el ideal⁷⁰.

Los métodos para diagnosticar la infección por *H. pylori* puede establecerse por métodos directos, cuando se detecta la presencia del microorganismo en muestras obtenidas por endoscopia (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares) (Cohen

et al., 1997)⁷¹, ó mediante métodos indirectos, cuando se estudia alguna propiedad del mismo mediante pruebas como prueba de ureasa, prueba en aliento con urea [¹³C]-Urea) ó la detección de anticuerpos para determina la respuesta inmune específica (Atherton, 1997)^{70, 71,72}

El Consenso Maastricht III del 2006⁶⁹ recomienda realizar las pruebas diagnósticas que confirmen la infección por *H. pylori* a los siguientes pacientes:

1. Con síntomas de dispepsia funcional y con indicación de tratamiento anti *H. pylori*^{70, 71}.
2. Con úlcera péptica activa, linfoma gástrico asociado a tejido linfoide de mucosa (MALT), o historia anterior documentada de úlcera péptica.
3. En menores de 55 años con dispepsia no investigada, con sangrado digestivo, anemia, saciedad temprana, disfagia progresiva, odinofagia, vómitos recurrentes, historia familiar de cáncer gástrico e historia previa de cáncer de esófago o gástrico.
4. Con anemia ferropénica idiopática
5. Con púrpura trombocitopénica idiopática que vayan a iniciar tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos por largo tiempo.
6. En pacientes con historia familiar de cáncer gástrico.

Los métodos diagnósticos pueden clasificarse en no invasivos e invasivos, tal y como se especifican a continuación:

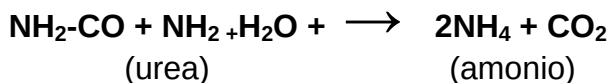
3.4.1. Métodos no invasivos:

Estos métodos son válidos cuando no está indicada la endoscopia gástrica. Son los siguientes:

3.4.1.1. Método de [¹³C]-urea o prueba del aliento:

Este método no invasivo ha demostrado ser el más exacto usando tanto C14 como C13 (Aguilar y cols., 2008) ⁷². Al usar ¹⁴C radiactivo, el paciente recibe una radiación muy baja y bastante aceptable (0.03- 0.3 mSv/MBq), pudiéndose repetir el test las veces que sea necesario. Igualmente el uso alternativo con C13 no radiactivo, no tiene riesgo. Es considerado el método elección no solo para confirmar erradicación de infección por *H. pylori*, sino para su diagnóstico. Detecta la actividad de la enzima ureasa, en el aliento basal y en el aliento post 20 ó 30 minutos de la administración oral de [¹³C]-urea^{70, 71}. El aumento de la [¹³C]-urea en el aliento se expresa como una diferencia absoluta por el cociente [¹³C]-urea/[¹²C]-urea. La medición del [¹³C] se realiza por espectrometría de masas, calculando el cociente de los isótopos, o por espectrofotometría de infrarrojos. Esta técnica es desarrollada por *Graham y Klein* en 1987, documenta la presencia de la infección momentánea y tiene una respuesta rápida a los efectos de tratamiento y a las re infecciones que suelen producirse. La enzima ureasa normalmente no está en el aparato digestivo alto, por ello al suministrar urea marcada con [13C] a un paciente y medir la excreción del isótopo por el aire espirado, 30 min después de su ingestión, puede diagnosticar la infección por esta bacteria. El principio de la prueba de aliento se basa en la producción de ureasa asociada a la infección con *H. pylori*, la solución administrada oralmente de urea [13C] es descompuesta a 12 CO₂ y N4⁺ de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ureasa *H.p*



El ¹³CO₂ es absorbido en la sangre y luego eliminado por los pulmones en la respiración en el aliento. La lectura de la muestra basal de aliento obtenida antes de la administración de la solución de urea es comparada con la obtenida a los 15 ó 30 minutos después de la ingestión de la urea [13C] en solución.

A diferencia de otros métodos, un resultado positivo confirma la infección⁷⁰. Los falsos-positivos se deben a la hidrólisis de la urea por bacterias de la cavidad oral, o falsos-

negativos en el caso que el examen sea después de una semana del uso de bismuto, o antimicrobianos o después de una cirugía gástrica. Una modificación de este método ha sido propuesta por el Laboratorio de Radioisótopos de la Universidad de Buenos Aires, en el cual se suministra conjuntamente una solución [^{14}C]- urea y un coloide azufrado ó sulfuro de tecnecio $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que no se absorbe en el aparato digestivo. Este coloide permite la visualización de la solución de urea dentro del aparato digestivo mediante la utilización de una cámara gamma, lo cual permite localizar exactamente el sitio donde se está produciendo el $^{14}\text{CO}_2$ como consecuencia de la hidrólisis de la urea por el *H. pylori*. Esta combinación de la prueba del aliento con [^{14}C]-Urea y la visualización del desplazamiento intragástrico de la solución de Urea- ^{14}C permitió elevar la sensibilidad del método al 98.2 % y la especificidad al 99 %⁷¹. El tratamiento con antibióticos, compuestos de bismuto y terapia inhibidora de la secreción ácida gástrica disminuye la eficacia de la prueba de detección de urea espirada, detección de antígenos en heces, y todos los métodos invasivos. Los resultados negativos de estas pruebas deben ser confirmados por métodos adicionales (Ramírez y cols 2009)⁴⁴.

3.4.1.2. Método serológico: sugerido en pacientes sintomáticos, o con riesgo alto de adquirir la infección por *H. pylori*, que viven en zonas de alto riesgo de infección. Mediante las pruebas serológicas se pueden detectar títulos de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) en suero de pacientes infectados mediante varias pruebas:

3.4.1.2.1. ELISA o Ensayo inmunoenzimático: Esta prueba fue desarrollada en 1988 por Evans, basada en las proteínas de alto peso molecular asociadas al *H. pylori*.^{48, 37, 66, 73,74}. Esta prueba tiene ventajas de costo en estudios epidemiológicos, pero se limita por que los títulos de anticuerpos se pueden mantener hasta seis meses en un paciente después de la erradicación de la infección por *H. pylori*, sin diferenciar si existe o no una infección activa, a pesar de tener una sensibilidad y especificidad del 93,55% y 99% respectivamente. Tabla No. 3

3.4.1.3 Inmunofluorescencia:

Detecta IgG e IgA en mucosa gástrica, mediante inmunohistoquímica. Posee sensibilidad del 92% y especificidad del 85 %. Esta técnica se limita por ser costosa y dispendiosa⁴⁴.

3.4.1.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Randomly amplified

Polymorphic DNA (RAPD):

Es claro que existe gran diversidad genómica en los aislados de *H. pylori* obtenido a partir de biopsias gástricas^{75,76} y que las técnicas moleculares constituyen una herramienta útil para determinar la diversidad genómica de esta bacteria, como los métodos de PCR y RAPD, que han permitido evaluar estudios de transmisión y diversidad y de diferenciación de cepas de *H. pylori* relacionadas con recurrencia y reinfección y fracaso de la terapia antibiótica. Adicionalmente permite un mejor conocimiento de las formas de transmisión y la epidemiología de la infección. El RAPD es un procedimiento basado en la técnica de PCR, que permite amplificar regiones anónimas de ADN usando oligonucleótidos simples^{77, 78}. Es un método eficiente, confiable y sensible para diferenciar aislados de *H. pylori*. La complejidad de la prueba y su elevado costo, no la hacen recomendable de manera rutinaria^{79, 80,81}

3.4.2. Métodos invasivos:

Requieren una endoscopia mediante la cual se toman biopsias de mucosa gástrica para realizar pruebas histopatológicas y cultivo; principalmente si se sospecha resistencia bacteriana ante falla al tratamiento. Es prioritario mencionar que la sensibilidad antibiótica *in vitro* no siempre se correlaciona con la sensibilidad *in vivo*, representando uno de los blancos importantes para estudio de resistencia bacteriana, y un limitante para la erradicación de la infección por *H. pylori*⁴⁴.

3.4.2.1. Prueba rápida de ureasa de mucosa gástrica:

Actualmente la prueba de ureasa en biopsia gástrica antral y de cuerpo, junto con los exámenes histopatológico, son los más recomendados por los médicos⁸¹. La enzima ureasa es detectada en biopsia de antro y cuerpo gástrico. Esta prueba ampliamente difundida, confiable, pero costosa. Consiste en detectar la presencia de la enzima

ureasa en biopsia de mucosa gástrica, mediante una solución de urea que cambia de color amarillo a fucsia ante la acción de ureasa, que hidroliza la úrea liberando amonio y alcalinizando el pH. Actualmente se dispone de agar urea de Christensen, a bajo costo, con sensibilidad del 98,92% y especificidad entre 95% - 100%⁸¹. De estas pruebas la más usada es CLO test (prueba Campylobacter like organism).

3.4.2.2. Histopatología:

La sensibilidad y eficacia de éste método es comparable a la de la prueba de ureasa en biopsia, y puede mejorarse mediante el uso de coloraciones especiales como Giemsa, Warthin - Starry, Wayson e inmunohistoquímica. La biopsia gástrica debe ser tomada por gastroenterólogo bien experimentado. Posee sensibilidad del 93-98% y especificidad del 95-98 %⁸². En pacientes en los que está contraindicada la biopsia, se le sugiere el cepillado de tejido con citología, obteniéndose cifras de sensibilidad alrededor de 98% y especificidad de 96%.

3.4.2.3. Cultivo: El *H. pylori* es una bacteria de crecimiento lento, considerada entre las bacteria fastidiosas por su difícil aislamiento, debido a que requiere ambiente microaerófilico (5 a 6 % de O₂, 8 a 10% CO₂, 80-85% N₂) y es de crecimiento lento.

El crecimiento *in vitro* puede ser afectado por varios factores⁸³ como:

1. El número de biopsias
2. Uso previo de algunos medicamentos, usados por pacientes en tratamientos de dispepsia, como el omeprazol, algunos antimicrobianos, bismuto o benzocaínas.
3. Contaminación durante la toma de la biopsia gástrica, no solo microbiológica, sino química como presencia de glutaraldeído, presentes en las pinzas usadas durante la toma de la biopsia, pueda afectar la viabilidad del *H. pylori*.

4. El medio de cultivo.
5. Temperatura durante el transporte de las biopsias gástricas
6. Método de cultivo. Concentración de oxígeno no óptimas o escasas permiten la pérdida de resistencia a las cepas que han crecido bajo buenas condiciones aeróbicas.
7. El pH: El potencial de hidrógeno presente en microambiente de la bacteria es primordial para su crecimiento frente a un antibiótico. La sensibilidad de *H. pylori* a los macrólidos y al metronidazol bajo pH de 5.9 es mucho menor que a pH 7.2 o 7.9, a diferencia de la tetraciclina que no afecta su susceptibilidad frente a los antimicrobianos al variar el pH. (Pajares y cols.,2006)

Para un óptimo crecimiento de *H. pylori* deben incubarse a una atmosfera microaerofílica (5 a 6 % de O₂, 8 a 10% CO₂, 80-85% N₂), y durante su siembra no exponer la muestra mucho tiempo al medio aerofílico. El cultivo es el método diagnóstico más específico; aunque muchos autores refieren poca sensibilidad de este método, otros autores demuestran que es una prueba muy sensible (85 - 95%) y específica (96- 100%) para detectar la infección por *H. pylori*, principalmente en muestras procedentes de pacientes con cáncer gástrico. Este método permite el aislamiento y análisis de susceptibilidad de *H. pylori* a los antimicrobianos^{44, 78}

3.4.3 Otras técnicas:

3.4.3.1 Detección de antígenos en heces: Se usan anticuerpos policlonales para antígenos propios de *H. pylori* en las heces de los pacientes infectados mediante la técnica de inmunoensayo enzimático o ELISA. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentran entre 96% a 92% respectivamente. La sensibilidad disminuye a 69% si la muestra de heces permanece a temperatura ambiente por 2 a 3 días^{84, 88, 89,90, 71,72}

3.4.3.2. Test de bicarbonato con carbono 13 marcado: El [¹³C] mide en el suero la concentración de bicarbonato marcado con carbono 13, antes y después de 60 minutos

de ingerir una porción de alimentos con urea marcada con [^{13}C]. Los niveles de sensibilidad y especificidad se encuentran alrededor de 91% y 86% respectivamente; y muestran una correlación buena con la densidad bacteriana y la severidad de la gastritis en el estudio histológico de la mucosa gástrica^{71, 72}.

Determinación *in vitro* de la resistencia bacteriana

Recomendaciones del CLSI en el 2008 para el Método de Dilución en Agar:

- **Inóculo:**

Este debe prepararse en una suspensión con solución salina al 0.89% ó en caldo de Brucella suplementado con suero fetal bovino al 2%, equivalente al Mac Farland 2 (1×10^7 a 1×10^8 UFC/ ml). Generalmente se inocula la suspensión bacteriana con un replicador de Steers (1 a 3 ul ó individualmente ó con micropipeta ó asas calibradas en el medio base Mueller Hinton con 5% de sangre de cordero envejecida.

- **Incubación:** Debe ser en atmósfera microaerofílica, a 37°C por 48 a 72 horas (Piccolomini *et al.* 1997).
- **Cepa control sugerida:** Se recomienda usar cepa ATCC 43504, considerando los puntos de corte para amoxicilina y claritromicina las CIM < 0,015 mg/l como sensible y >0,12 mg/L como resistentes. Para metronidazol CIM <64 mg/L como sensible a Metronidazol y >264 mg/L como resistentes.

Para las determinar la susceptibilidad *in vitro* se utilizan varios métodos como:

- Dilución en Agar
- E-tets ó epsilómetro.
- Microdilución en agar
- Difusión en disco

En estos métodos se usan medios como Mueller – Hinton, agar infusión cerebro-corazón o agar Wilkins Chalgren, y agar Skirrow, agar. Estos métodos son costosos, de larga duración y de difícil realización debido a que existen pocos profesionales

entrenados para realizarlo. Existen diferentes métodos de susceptibilidad a los antimicrobianos como las técnicas difusión o dilución. La elección de uno u otro método depende de varios factores como sencillez y rapidez de las técnicas a utilizar, y por la disponibilidad de recursos de cada laboratorio.

Hasta el año 2003, no se habían estandarizado pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en el género *Campylobacter* y *Helicobacter*. Actualmente el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI), ha establecido rangos de control de calidad para antimicrobianos frente a la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 utilizando como método de referencia al método dilución en agar, técnica que permite medir cuantitativamente la actividad *in vitro* del antibiótico frente a un inóculo bacteriano ajustado⁸⁵.

Método Dilución en Agar:

En esta técnica se incorpora el antimicrobiano en diluciones dobles en cada caja de Petri con medio Mueller – Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero defibrinada durante su preparación. Los inóculos una vez preparados son aplicados rápidamente sobre el agar e incubados inmediatamente como se cita anteriormente. Las ventajas de este método son su reproducibilidad y el crecimiento bacteriano satisfactorio. Entre las desventajas se incluyen los altos costos y la preparación laboriosa de los medios, debido a que para poder obtener valores reproducibles *intra* e *interlaboratorios*, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado⁸⁶

El valor de CIM obtenido por este método no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración del antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente concentración inmediatamente inferior donde se observa desarrollo del mismo. Por ejemplo una CIM de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de más o menos (+/- 1) una dilución.

Método de E- Test o Prueba de epsilómetro:

Este método permite combinar los métodos de difusión en disco y de dilución en agar. Es el método más sencillo de los existentes. Consiste en colocar tiras reactivas con concentraciones del antimicrobiano en estudio, sobre agar de M. Hinton con 5% de sangre de cordero previamente sembrado con inóculo ajustado de *H. pylori* en caldo de Brucella suplementado al 2% con suero fetal bovino al patrón Mc Farland 3. La lectura de la elíptica formada por la inhibición del crecimiento de *H. pylori* se realiza a las 72 horas de incubación a 37°C en ambiente microaerófilico, para determinar la CIM.

El crecimiento exponencial de *H. pylori* es inhibido por la concentración creciente del antimicrobiano presente en la tira reactiva. La intersección entre el borde de la inhibición y la tira del soporte se produce en la concentración del antibiótico que no puede inhibir el crecimiento del *H. pylori* ⁸⁶. Es importante aclarar que las colonias de *H. pylori* deben tomarse de un subcultivo no mayor de 72 horas, para evitar el uso de colonias viejas con mutaciones generadas por ambiente hostil.

En Europa la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC), usa el agar Muller Hinton ó el medio Wilkings- Chalgren suplementado al 10 % con sangre de caballo, y para este método. Además la BSAC recomienda que el inóculo bacteriano debe ser resuspendido e incubado previamente en agua destilada estéril durante 48 a 72 horas a 37 °C en ambiente microaerófilico, al cabo del tiempo en que ajusta al Mc Farland 3, para ser sembrado posteriormente en el agar escogido, e incubado a 35 °C y condiciones anaeróbicas descritas anteriormente ⁸⁷

La correlación de ésta técnica con el método de dilución en agar (método Estándar) realizada en diferentes países del mundo han reflejado buena sensibilidad y especificidad de este método, ubicándolo como una alternativa óptima para determinar la susceptibilidad *in vitro* de *H. pylori*.

3.5. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

Numerosos estudios a nivel mundial han reportado que pacientes con enfermedad úlcero-péptica, a los que se les ha erradicado *H. pylori* con un tratamiento con antibióticos, mejoran notablemente, favoreciendo cicatrización de la úlcera. Además en pacientes con MALToma, la erradicación de la bacteria conduce a una regresión completa del linfoma.

3.5.1. Factores relacionados con el tratamiento anti-*Helicobacter pylori*

Los esquemas de tratamiento de erradicación de *H. pylori* dependen básicamente de las características de la infección por *H. pylori*, la susceptibilidad antimicrobiana y de la población donde vive o proviene el paciente. **Tabla No 4:**

- Esquema de combinación^{71, 72} dosis y duración del tratamiento.
- Cumplimiento del tratamiento (Dosis y duración): Se estiman factores subjetivos del paciente, como tolerancia de los medicamentos, efectos adversos, entendimiento del tratamiento. El paciente debe cumplir por lo menos el 90% del tratamiento. Si se cumple por lo menos el 60% del tratamiento, el *H. pylori* se erradica en un 90%. Si se cumple menos del 60%, la tasa de erradicación disminuye a un 69%⁹¹
- Los inhibidores de bomba de protones I.B.P, aumentan la eficacia de los antimicrobianos cla y amx, debido a que al aumentar el pH en la mucosa gástrica *H. pylori*, comienza su etapa replicativa y activa, indispensables para la actividad de estos antimicrobianos.
- Polimorfismo del gen de isoenzima metabolizante de los IBP, *cyp2 c19*. Este factor de riesgo para falla de tratamiento es actualmente muy discutida y controversial⁸⁸.

- Propiedades farmacológicas de los medicamentos usados: Los tratamientos 1ª línea, sugeridos por el consenso de Maastricht 2006: Cla, Mtz e IBP erradica hasta un 97%.

3.5.2. Factores relacionados con el hospedero:

- Pronta reinfección de los pacientes tratados con éxito.
- Características de las lesiones gástricas.
- Respuesta inmune celular: La respuesta Th2, y niveles bajos de IL-4. Se relacionan con resistencia de *H. pylori*. Las cepas susceptibles están relacionadas con respuesta inmune Th1.
- Falla en la adherencia del tratamiento y /o uso de antirretrovirales por parte del paciente, debido a que son inhibidores de proteasa (indinavir y similares).
- Gradiente de pH entre el lumen gástrico (pH 2.0) y mucosa gástrica (pH 7.0): La actividad de la amx y cla a pH bajos (pH 2.0) baja hasta diez veces con respecto a pH alcalinos (pH 7.0) ^{92, 93}
- Baja difusión del antibiótico al foco de colonización de *H. pylori* por presencia de moco gástrico.
- Existencia de un nicho protector del *H. pylori* en la mucosa gastrica a manera de "Barrera": Los antimicrobianos no logran concentraciones suficientes para erradicar l *H. pylori*.
- Presencia del glucocalix de *H. pylori* evita o forma barrera al antimicrobiano.
- Los antibióticos no difunden del exterior y los tópicos no alcanzan espacios intercelulares.
- Existencia de 20% de cepas de *H. pylori* en fase estacionaria (en forma sésil o adheridas a la mucosa gástrica).
- Gradiente de pH acido en la mucosa gástrica. Este *in vitro* es validado generalmente a pH neutros (Megraud y cols., 1999) ²¹⁰.

A pesar de los mecanismos que *H pylori* desarrolla para evadir la respuesta inmune, ésta se activa desde la primo infección, como respuesta inmune adquirida específica,

dada por citocinas epiteliales, infiltración en mucosa gástrica por neutrófilos, macrófagos y linfocitos (principalmente por *H. pylori* CagA+), activación de linfocitos T, respuestas principalmente tipo Th1 (helper 1) y Th2 (helper 2) representada en la alta producción de anticuerpos. La respuesta Th2 se torna mayor cuando existe en el hospedero factores individuales como coinfecciones (Helmintiasis y paludismo), clase de cepas de *H. pylori* y/o factores genéticos o fisiológicos, que al actuar en sinergia permiten que el hospedero no desarrolle síntomas gástricos (Ballesteros et al., 2000)⁹⁴, como puede observarse en pacientes inmunosuprimidos tratados con ciclosporina que no desarrollan úlcera péptica; ó en poblaciones africanas que a pesar de la alta prevalencia de infección por *H. pylori* (≥ 90 %), predomina la respuesta adaptativa Th2 constituye el llamado enigma africano^{95,96}.

3.5.3. Esquemas de tratamiento anti *H. pylori*

El tratamiento de erradicación de *H. pylori* recomienda el esquema triple (IBP + 2 antibióticos) o la terapia cuádruple (IBP + 2 antibióticos + bismuto), si se dispone de bismuto. La terapia cuádruple es más barata que la terapia triple y es igualmente buena, y ambas confieren tasas muy altas de erradicación. La duración del tratamiento sigue siendo controversial, pero no hay grandes diferencias entre los resultados de los tratamientos de 14, 10 y 7 días, mientras que en los costos las diferencias son mayores.¹¹⁵ Es vital aclarar que aún no hay un esquema de tratamiento óptimo que erradique la infección por *H. pylori*, pero en el último consenso de Maastricht 2006, establece esquemas de tratamiento⁹¹, Tabla No 5.

Actualmente el tratamiento de erradicación se utiliza en todos los pacientes con úlcera gastroduodenal asociada a *H. pylori* para disminuir la tasa de recurrencias y restablecer la integridad de la mucosa gastroduodenal. Para resolver la infección de *H. pylori* el consenso de Maastricht del 2006 ha sugerido que el tratamiento debe ser eficaz, de bajo costo, con mínimos efectos adversos, de fácil administración ó simple, bien tolerada, fácil de cumplir, con una eficacia ó tasa de erradicación de al menos un 80%⁶, combinando agentes con acción sistémica y local, basada en un inhibidor de bomba de protones asociado a dos antibióticos: claritromicina, amoxicilina ó un nitroimidazol

(metronidazol o tinidazol). Además el Grupo Europeo para el Estudio de *H. pylori* (European *H. pylori* Study Group, EHPSG) reunido en este Consenso, refiere que aún no se ha logrado el esquema de tratamiento ideal, debido a que las terapias actuales presentan índices de fracaso de hasta 20- 30% relacionados con el incumplimiento de los tratamientos y resistencia antimicrobiana. La adherencia de los pacientes a las terapias depende de la complejidad de los esquemas y la frecuencia de efectos adversos. La duración óptima del tratamiento es aún controversial. La mayoría de consensos recomiendan una duración no menor de 7 días ni mayor de 14 días^{96,97} ó esquemas de primera línea como tratamiento ideal contra la infección por *H. pylori*. Maastricht-III refiere además que este tratamiento durante 14 días confiere una ventaja de 12%, y cifras hasta del 97% de eficacia sobre la terapia de erradicación durante 7 días.

Es importante citar que los IBP (pantoprazol, omeprazol y lansoprazol) alivian los síntomas y curan las lesiones endoscópicas. El omeprazol es más eficaz que los antihistamínicos H2 (ranitidina) según ensayos clínicos a largo plazo, donde se ha demostrado que disminuye el dolor más rápido, que previene las recaídas, mejora las tasas de erradicación, a pesar de sus efectos colaterales como diarrea, epigastralgia, náuseas, cefalea y exantemas que pueden interferir de alguna u otra forma su adherencia.

Las líneas de tratamientos recomendadas se citan a continuación:

3.5.3. 1 – De primera línea: por 7, 10 o 14 días:

IBP, amoxicilina y claritromicina c/12 hs

IBP, metronidazol y claritromicina c/12 hs

IBP, metronidazol, tetraciclina, bismuto c/6 hs

Metronidazol, tetraciclina, bismuto c/6 hs

3.5.3. 2 – De segunda línea o de retratamiento por 14 días:

IBP, amoxicilina, metronidazol c/12 hs

IBP, metronidazol, tetraciclina, bismuto c/12 hs

IBP, amoxicilina, levofloxacina c/12 hs

IBP, amoxicilina, rifabutina 150-500 mgc/12 hs

IBP, eritromicina 500 mg c/8 hs o amoxicilina 1 gr. c/8 hs

3.5.3. 3 – Esquema cuádruple por 14 días: 18 comprimidos por día

Cada 6 hs: Bismuto 240 x 2, tetraciclina 500 x 1, metronidazol 500 x 1

Cada 12 hs: IBP.

Entre las terapias de primera línea, y debido a la alta prevalencia de resistencia a metronidazol, se recomiendan el siguiente esquema triple que consta de:

1. Un Inhibidor de la bomba de protones (IBP): Omeprazol ó lanzoprazol.
2. Dos antibióticos: Claritromicina, amoxicilina
3. Duración: 14 días.

3.5.3. 4. Otros esquemas terapéuticos anti *H pylori*

Recientes evidencias en Francia, Italia y en Perú han evaluado la administración de un esquema triple secuencial, que incluye **(tabla 6)**:

1. IBP, amoxicilina 1 gramo: C/12 hs, por cinco días
2. IBP, claritromicina 500 mg, tinidazol 500mg: C/12 hs, por cinco días.

Otros esquemas de antibióticos pueden usarse en casos de resistencia a estas últimas opciones ¹³, como terapias de segunda y tercera línea, donde se usan antibióticos, como las quinolonas o macrólidos, por ejemplo la levofloxacina o azitromicina usadas con buenos resultados alcanzados entre un 63 - 94 % de erradicación del *H. pylori* respectivamente ⁸⁸. El tratamiento erradicador se utiliza en todos los pacientes con úlcera gastro duodenal asociada a *Helicobacter pylori* y su finalidad consiste en erradicar la infección, disminuir la tasa de recurrencias y restablecer la integridad de la mucosa^{98, 99, 100,101}.

Entre las terapias de tercera línea o de rescate se Maastricht III sugiere el esquema que incluye IBP, amoxicilina tinidazol, tetraciclina ó levofloxacina cada 12 horas, recomendadas cuando fracasa la terapia de primera elección.

Como tratamiento de rescate se recomienda el siguiente esquema durante 7 días:

- a) IBP (omeprazol 20 mg, lasozoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg)/cada 12 hs; citrato de bismuto 120mg/cda 6 hs; tetraciclina 500 mg mg//cada 8 hs.
- b) La combinación de ranitidina-citrato de bismuto con los antibióticos antes mencionados representa una alternativa válida como terapia de rescate aunque se ha comprobado que tienen un menor porcentaje de erradicación.

Además la levofloxacina empleada en estos esquemas ha logrado una erradicación entre un 63% al 94%, y una excelente adherencia^{102, 103, 104, 105}. Este tratamiento está indicado cuando el paciente presenta resistencia a claritromicina entre un 15 al 20%, bien sea resistencia simple o doble a claritromicina y metronidazol. Este esquema en promedio logra una eficacia terapéutica del 89%, indicado en casos de resistencia a claritromicina, y además posee buena adherencia por los pacientes, pocos efectos adversos, y costos similares a la terapia triple convencional. Este esquema aún no ha sido comparado con el esquema cuádruple con bismuto¹⁰² (Vaira *et al.*, 2007). Para mayor efectividad del tratamiento se sugiere un tratamiento por 14 días, aunque existen muchas controversias en cuál es el tiempo óptimo. La erradicación exitosa baja la probabilidad de recurrencia de la infección del *H. pylori* del 90 al 5 % por año. Es recomendado el uso de metronidazol sólo en pacientes alérgicos a penicilina. En un meta-análisis reciente, la eficacia del esquema con levofloxacina, amoxicilina e IBP por 10 días fue superior al régimen de terapia cuádruple con bismuto por 7 días como terapia de rescate (87% versus 60%). Al parecer existiría una acción sinérgica entre la levofloxacina y los inhibidores de la bomba de protones.

Adicionalmente, estudios *in vivo* han comprobado que este antibiótico mantiene su actividad bactericida en aquellas cepas resistentes a la claritromicina y el metronidazol. Algunos efectos adversos infrecuentes de este antibiótico son hipersensibilidad, hipotensión, anemia hemolítica reversible⁹⁷. Los efectos adversos a uso de Mtz generalmente son leves pero desagradables, como sabor metálico en la boca, diarrea, náuseas y malestar gástrico, afectando negativamente la adherencia al tratamiento y generando un mayor porcentaje de resistencia bacteriana y disminución en la eficacia del tratamiento. Los síntomas secundarios más comunes con el metronidazol son: sabor metálico en la boca, dispepsia. La tetraciclina se asocia a malestar gástrico y foto

sensibilidad; y no debe usarse en niños menores de 8 años porque puede causar decoloración de los dientes. Finalmente los compuestos de bismuto se asocian a náuseas, malestar gástrico y oscurecimiento de la lengua y heces.

3.6. ERRADICACION DE LA INFECCION POR *H. pylori*

H. pylori es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica humana, un medio ambiente extraordinariamente hostil. La bacteria coloniza la capa mucosa y, en caso de no ser erradicada, establece infecciones crónicas que frecuentemente perduran toda la vida, a pesar de las respuestas inflamatoria e inmune desarrolladas por el huésped. La infección por *H. pylori* causa cambios estructurales y funcionales en la mucosa gastroduodenal¹⁰³. Todas las personas infectadas desarrollan una inflamación gástrica crónica que generalmente es asintomática, mientras que en algunas personas provoca úlcera péptica.

Una vez que el *H. pylori* es detectado en pacientes con una úlcera péptica, el procedimiento normal es erradicarlo y permitir que sane la úlcera, para evitar la colonización en la mucosa e infección por toda la vida.

Generalmente personas infectadas desarrollan una inflamación gástrica crónica que generalmente es asintomática, mientras que en algunas personas provoca úlcera péptica. En otros pacientes se puede observar la aparición de úlcera duodenal en parte mediada por la disregulación de la liberación de gastrina y la subsecuente hipersecreción de HCl. Aunque menos de 10% de las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan ulceraciones durante la infección, la bacteria sería responsable de más de 95% de las úlceras idiopáticas. La infección por *H. pylori* también es un factor de riesgo frente al adenocarcinoma. Aun en las regiones donde el cáncer gástrico es hiperendémico, menos de 5% de las personas infectadas desarrollan adenocarcinoma distal. Sin embargo, el análisis de riesgo atribuible sugiere que *H. pylori* es responsable de 60-80% de estos tumores. Ocasionalmente, la reacción del hospedero a la colonización por *H. pylori* va seguida de una hiperplasia folicular linfoide o de la aparición de linfoma tipo MALT, tejido linfoide asociado a la mucosa^{107, 108}.

La terapia de erradicación tradicional de primera línea es una semana de terapia triple consistente en los antibióticos amoxicilina y claritromicina, y un inhibidor de bomba de protones como el omeprazol. El gastroenterólogo Thomas Borody de Sydney, Australia, inventó la primera terapia triple en 1987. Al paso de los años, se han desarrollado variaciones de la triple terapia, tales como el uso de diferentes inhibidores de la bomba de protones, como el pantoprazol o cambiando la amoxicilina por metronidazol para las personas que son alérgicas a la penicilina. Tales terapias han revolucionado el tratamiento de la úlcera péptica y las han curado.

La resistencia a antibióticos ha ido en ascenso, como resultado de la falla del tratamiento inicial y requiere esquemas adicionales de terapias con antibióticos o estrategias alternativas tales como una terapia cuádruple. Los compuestos de bismuto también son efectivos en combinación con el esquema tradicional. Para tratar cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina, se ha recomendado el uso de levoflaxacina. Ante la ausencia de un tratamiento anti *H. pylori* eficaz, la bacteria persistirá de por vida. La proporción de infecciones agudas que persisten no es conocida, pero varios estudios en poblaciones para observar la historia natural de la infección han mostrado eliminación espontánea aparente. Una estrategia válida de quimioprevención del cáncer gástrico, es disponer de medicamentos eficaces.

Según el *National Institute of Health* de los Estados Unidos, como el Consenso de *Maastricht 2006* en Europa y el Consenso Canadiense, los pacientes infectados con *H. pylori* que presentan úlcera duodenal, úlcera gástrica, MALToma y resección gástrica, deben recibir tratamiento de erradicación. Sin embargo, aún se debate sobre que paciente infectado con *H. pylori* debe tratarse particularmente en países donde la prevalencia es alta, considerando el alto costo del tratamiento. La erradicación de *H. pylori* modifica el curso natural de la enfermedad ulcerosa, al disminuir las recidivas, las complicaciones y mejora la calidad de vida del paciente.

La erradicación de *H. pylori* no ha sido eficaz, debido al incremento de la prevalencia de resistencia adquirida a los antibióticos; asociada a los fracasos terapéuticos, principalmente con el uso de metronidazol y claritromicina (Mtz y cla). Se ha descrito una tasa de erradicación del 18 a 60 % en cepas resistentes a cla y un 88% en las

sensibles^{93, 108, 109}. Mientras otros investigadores han demostrado que las tasas de erradicación no se afectan por la presencia de resistencia del *H. pylori* a la claritromicina⁹³. Por otro lado la resistencia al metronidazol disminuye a menor escala la eficacia hasta en un 25%.

La resistencia de *H. pylori* a Mtz y cla está relacionada con falla en la erradicación hasta en un 25% y 18% respectivamente. Cuando se asocian resistencias a ambos antibióticos Mtz y cla la falla en la erradicación puede alcanzar hasta el 100%. Por lo anterior, no se recomienda esta combinación antimicrobiana con un inhibidor de bomba de protones (IBP) en primera instancia para la erradicación. En este caso lo recomendado es usar ranitidina-citrato de bismuto (RCB), para mantener elevada la tasa erradicadora a pesar de la existencia de resistencias¹¹⁰. Se han propuesto numerosos tratamientos erradicadores de *H. pylori* de la mucosa gástrica, usando antibióticos más sales de bismuto o inhibidores de bombas de protones como omeprazol y lansoprazol. La meta es lograr la erradicación de la bacteria por lo menos en un 70 al 90% de los pacientes tratados, lo que se ha logrado con algunos de estos esquemas terapéuticos propuestos¹¹¹. Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina (Amx), tetraciclina (Tc), metronidazol (Mtz) y claritromicina (Cla).

En los esquemas de tratamiento anti *H. pylori* basados en triple terapia, se determinan fallas en la resolución de la infección con distintas proporciones de fracaso terapéutico¹¹²

La poca eficacia de las monoterapias con cla del 38% (IC-95%: 32-41%) y de las terapias dobles del 62% (IC- 95%; 58-64) al 66% (IC-95%; 62-71 %) como IBP + amoxicilina ó claritromicina, permitió mejorar los esquemas terapéuticos tanto en Europa como en Latinoamérica, donde la triple terapia, basada en Amx + Cla + IBP, por 14 días^{109, 110, 111, 112} ha logrado erradicar la infección por *H. pylori* entre un 90 al 97%. Este esquema es el más usado en el mundo, por su fácil cumplimiento, pocos efectos colaterales y según el último consenso Maastricht III 2006⁶⁹; otros estudios realizados en Europa y medio oriente (Irán), revelan que el uso de esquemas triples por siete días con omeprazol + amoxicilina + metronidazol no logra erradicación suficientemente satisfactoria, con tasas de erradicación de 80% y 60 %

respectivamente ¹¹³. Otros estudios han reportado entre el 75% y el 100%⁸⁷ (López – Brea *et al.*, 2001) de erradicación de la bacteria, usando terapia triple con IBP + Cla + Amx en pacientes con cepas sensibles a Cla, en contraste con un 25% de erradicación en población resistente a Cla. Lo anterior apoya la importancia del uso apropiado de los antibióticos y la detección de los patrones de resistencia de los antimicrobianos.

Es claro que la erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica humana ha sido un reto para la comunidad científica, debido a que el rol de este patógeno parece cambiar su grado de virulencia, quizás por influencia epigenética aún no clara, como la presión en la bacteria dada por antimicrobianos, permitiendo relacionar el tratamiento de la infección con el cuadro patológico. El *H. pylori* es susceptible *in vitro* a numerosos antibióticos, aunque muchos de ellos no son útiles *in vivo*, debido a diferentes factores ^{114, 115, 116, 117, 118}.

En los países desarrollados la eficacia del tratamiento de erradicación varía entre el 85-90%. Sin embargo, las causas de los fracasos terapéuticos no quedan claros ¹¹⁹.

Por otra parte, el origen de la biopsia (antro o cuerpo) para determinar la resistencia antimicrobiana puede inducir a error y subestimar la prevalencia de la resistencia a antibióticos, debido a la presencia de más de una cepa en un mismo paciente, tanto *H. pylori* sensibles y como resistentes a los antibióticos (López –Brea *y cols.*, 2001) ^{87, 120, 121}. No hay dudas que el mal uso de estas drogas ha contribuido al incremento en la resistencia.

La Cla y Mtz son los antibióticos más frecuentemente usados en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Esta bacteria ha desarrollado resistencia a estos antibióticos, lo que ha provocado una disminución en la velocidad de su erradicación.

La resistencia primaria a Mtz en *H. pylori* se ha registrado en muchos países, señalándose que ésta varía entre 10% en los países industrializados y 70% en los países en desarrollo. Existe un constante incremento en la resistencia a este antibiótico, fenómeno que se atribuye a la repetida administración de Mtz en el tratamiento de infecciones no asociadas a *H. pylori*, a través de protocolos de

tratamiento que resultan parcialmente inhibitorios y que permiten la selección de cepas resistentes de *H. pylori*^{121, 122, 123, 124}. La resistencia a Mtz es una variable importante en el tratamiento de las infecciones por *H. pylori* y su ocurrencia reduce significativamente la eficiencia en los tratamientos de erradicación de 30 a 50% países desarrollados^{124, 125, 126, 127}.

El porcentaje de erradicación de la infección por *H. pylori*, se ve afectado por la aparición de diversas mutaciones puntuales en los genes rRNA ribosomal 23S, *pbp1A* y *rdxA* o *flaV*, relacionadas con resistencia antimicrobiana a claritromicina, amoxicilina y metronidazol respectivamente^{128, 129, 130, 131, 132, 133} representadas en el incremento de las concentraciones mínimas inhibitorias CMI de estos antibióticos propuestos en el tratamiento anti- *H. pylori*. Es esencial tener conocimiento sobre los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos propuestos en estos regímenes terapéuticos para asegurar su éxito. El Ministerio de Protección Social y el Ministerio de Salud, han recomendado investigar la presencia del *H. pylori*, en todos los pacientes con úlceras pépticas, y tratarlas con tratamiento erradicador, o tratamiento con antibiótico asociado a medicamentos antisecretorios^{131, 132}.

El tratamiento erradicador también es recomendado en pacientes con historia de úlcera crónica con 2 ó 3 recidivas anuales y/o antecedentes de hemorragia digestiva, siendo una alternativa terapéutica previa a la cirugía, en los pacientes refractarios a otro tipo de tratamiento médico^{133, 134}.

En nuestro país, en el departamento de Nariño desde hace más de 15 años, se hace seguimiento a una cohorte para evaluar el impacto a largo plazo de la erradicación de la infección por *H. pylori* en pacientes con lesiones precursoras de cáncer gástrico. Se ha demostrado una reducción significativa en la progresión de las lesiones pre-neoplásicas administrando tratamiento anti-*H. pylori*, con esquemas de tratamiento basados en triple terapia, con sales de bismuto y Amx y Mtz, ó triple terapia con inhibidores de bomba de protones más dos antimicrobianos (Omeprazole+Cla+Amx). Este esquema ha permitido resolución de la infección entre 75% y 80% respectivamente. Estos hallazgos reafirman que la quimioprevención es una estrategia

válida para evitar lesiones pre neoplásicas. A pesar que *H. pylori* es sensible a numerosos antimicrobianos^{80,81}, no hay estudios que asocien de manera óptima la susceptibilidad antibiótica con la erradicación de la infección por *H. pylori*, debido a que realización de cultivos y antibiogramas antes de iniciar un tratamiento, no es un procedimiento costo efectivo, ni de rutina.¹²⁸ Según varios estudios, los correctos tratamientos de erradicación, dan beneficios en costos de la medicación, en la disminución de ausentismos laborales, en hospitalizaciones, y sobre todo en la mejoría de la calidad de vida de los enfermos ulcerosos actuales^{27, 129,130, 131, 132, 133}

Por estas razones los esquema de erradicación se basan principalmente en recomendaciones internacionales diseñadas de acuerdo con características generales de la infección y con parámetros de sensibilidad antibiótica del *H. pylori*, según patrones locales de resistencia, una herramienta valiosa para sugerir los esquemas más apropiados y completos en cada población en particular (OMS 2000)¹³⁴.

3.7. Recurrencia, reinfección y recidiva de la infección por *H pylori*

Es necesario precisar los conceptos de recurrencia, recidiva o reinfección y recrudesencia: recurrencia se refiere a la nueva aparición de la infección por la misma cepa después de haber sido trata; mientras que recidiva o reinfección se refiere a la aparición de una nueva infección por otra cepa de *H pylori*.

La erradicación de *H. pylori* cura la úlcera activa y, a largo plazo, da lugar a una drástica reducción de la reaparición de la misma y sus complicaciones¹³⁵ La recurrencia de la infección puede darse de dos maneras: Recrudesencia, definida como la detección de una cepa similar a la aislada previamente a la erradicación, mientras la verdadera reinfección, corresponde a una nueva infección por una cepa distinta de *H. pylori*¹³⁶ (Gómez et al. 2004).

Para diferencias estos dos conceptos han sido necesarias técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de polimorfismos genéticos (RFLP)¹³⁷ que han permitido detectar las cepas de en cada caso nuevo.

Se han propuesto distintos factores coadyuvantes de la recurrencia de la infección, como:

- Falta de inmunidad natural para la reinfección ¹³⁷
- Bajo nivel socioeconómico ¹³⁸
- Presencia de *H. pylori* en la placa dental ¹³⁹
- Reservorio de la infección en el ámbito familiar ¹⁴⁰.

Otro aspecto motivo de controversia son las implicaciones clínicas de la reinfección por *H. pylori*.

Después de la reinfección por *H. pylori* pueden ocurrir diversas circunstancias:

- Reaparición de la infección con o sin síntomas y sin lesiones.
- Recidiva ulcerosa con reaparición de la clínica y complicaciones (fundamentalmente con sangrado).
- Recidiva de linfoma MALT gástrico, tras haber regresado histológicamente después de la erradicación de la bacteria ^{137, 141}.

La recurrencia ulcerosa en pacientes re infectados varía entre el 3 y el 60%, con un promedio de 20% ¹⁴². La mayoría de los estudios demuestran, que la erradicación es más efectiva que el tratamiento con anti secretores de mantenimiento para prevenir las recidivas y complicaciones ulcerosas ¹⁴³. Todos estos aspectos plantean dudas sobre el manejo de los sujetos re infectados, cuestionando si se debe o no seguir con una comprobación periódica del estado de infección por *H. pylori* y un nuevo tratamiento de erradicación, sobre todo, en casos de linfoma MALT o hemorragia ulcerosa ¹⁴⁴. Para la detección de la reinfección la ayuda de elección es la prueba de aliento UBT muy útil, por su nula invasividad y capacidad para identificar la infección en cualquier parte de la cavidad gástrica; la UBT es sugerida anualmente en pacientes que recibe tratamiento de erradicación y asintomáticos, menores de 50 años, durante los tres

primeros años, para detectar una posible reinfección, y prevenir las recrudescencias ó aparición de complicaciones. En cambio, en los pacientes sintomáticos que reciben tratamiento de erradicación la pauta a seguir es realizar endoscopia digestiva. La tasa de reinfección en países en desarrollo varía entre el 2.4% al 25%¹⁴⁵, mientras que en países desarrollados es inferior al 1%¹⁴⁶.

La evidencia más contundente del rol patogénico de *H. pylori* en el desarrollo de la enfermedad ácido péptica, es que la erradicación de la bacteria altera la historia natural de la enfermedad. Cuando la bacteria persiste, la recidiva ulcerosa al año es mayor del 50%, mientras que disminuye al 10% en caso en que ésta sea erradicada.^{10,12} Esta reducción en la tasa de recurrencia, se mantiene por lo menos en los siete años subsiguientes a la erradicación¹³. Sin embargo, esta recomendación no se hace extensiva a pacientes con dispepsia no ulcerosa portadores de la infección por *H. pylori*. Una combinación de dos antibióticos con un inhibidor de la bomba de protones (IBP), es considerada como elección de primera línea para la cura de la infección por *H. pylori*, al aumentar la absorción de bismuto, claritromicina y amoxicilina, y particularmente el transporte activo y concentración de la Cla en la mucosa. Por estas razones se debe duplicar la de IBP para lograr una mayor elevación del pH gástrico y de la eficacia, principalmente si los antibióticos usados son amoxicilina y claritromicina. Es claro que el efecto *in vivo* de los antimicrobianos en *H. pylori* es eficaz en ambientes alcalinos, debido a que en el *H. pylori* la síntesis proteica se activa solo en pH entre 6 y 8 durante las fases replicativas o de crecimiento, y no entre pH entre 4.0 a 6.0. Por estas razones las bacterias que están en la fase no replicativa son más resistentes a los antibióticos.

Este efecto es neutralizado por acción de la enzima ureasa y por los inhibidores de bomba de protones, que además de elevar el pH, facilitan la fase replicativa del *H. pylori*, la difusión y concentración del antibiótico en la mucosa gástrica y por ende la acción intrínseca o eficacia terapéutica^{145, 146,147}. El esquema terapéutico, consigue tasas de erradicación comparables a las terapias tradicionales con bismuto con menos efectos colaterales y mejor tolerancia^{87, 147, 148}

3.8. Eficacia terapéutica de los tratamientos anti- *H pylori*

Al considerar la efectividad de estos regímenes de triple terapia, dos factores fundamentales deben tenerse en cuenta:

- La duración del tratamiento.
- La resistencia a los antibióticos.

3.8.1. Duración del tratamiento: Es controversial. Varios estudios confirman que una semana es suficiente para regímenes basados en un IBP y dos antibióticos. La prolongación del esquema a diez o catorce días, es la recomendación habitual de los autores norteamericanos. La resolución de la infección lograda con los esquemas OCA 1 y OCA 2 superan el 85%, recomendado por los consensos internacionales^{69, 150,151}, con éxitos terapéuticos de 92.3% (IC 95%; 79.1-98.38) por intención de tratamiento y de 94.6% (IC 95%; 81.81-99.34) por protocolo para una semana de tratamiento (OCA 1). Al prolongar el tratamiento por dos semanas (OCA 2), el éxito terapéutico fue de 89.7% (IC 95%; 75.78-97.13) y de 94.3% (IC 95%; 80.84-99.30) por intención de tratamiento y por protocolo respectivamente¹⁸¹. Por el contrario, la frecuencia de efectos adversos fue menor en el grupo tratado solamente durante una semana y con mejor tolerancia, sumado al menor costo del tratamiento y mejores tasas de erradicación comparables a las terapias tradicionales con bismuto 12-16A pesar del menor índice de erradicación de la triple terapia con OCM (82.8% por intención de tratamiento, y de 87% por protocolo) no se han demostraron diferencias estadísticamente significativas en relación con los esquemas OCA 1 y OCA 2, pero esta última combinación antibiótica fue la que presentó más efectos adversos.

Para evaluar la eficacia terapéutica mediante la UBT es necesario realizar estudios de prevalencia de susceptibilidad *in vitro* de los antibióticos propuestos en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, la detección de resistencia de *H. pylori* mediante la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), sus estudios genotípicos y su comparación *in vivo*.

3.8.2. Resistencia bacteriana: Ha significado un verdadero problema en la práctica clínica. Existen altas variaciones en la prevalencia de resistencia a claritromicina y metronidazol, y en menor medida en amoxicilina y tetraciclina^{152, 153} no obstante el conocimiento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de estos antibióticos puede predecir o explicar *in vitro* el éxito o fracaso en la erradicación del microorganismo^{134, 152} (OMS 2000; Branca et al 2004).

Es relevante mencionar que la resistencia antimicrobiana puede ser el único factor responsable del fracaso erradicador. Los ensayos clínicos que consideran el genotipo CYP2C19¹¹⁰ revelan que las tasas de erradicación no son relevantes en función de este polimorfismo genético, al demostrar que se inhibe la potencia de la inhibición ácida en pacientes con metabolismo hepático rápido de los IBP afectándose la eficacia terapéutica de los antibióticos, hasta en un 15%.

Igualmente algunas cepas de *H. pylori* cuentan con maquinaria genética latente, capaz de expresar genes que codifican proteínas formadoras de bombas de eflujo de antibióticos u OMEP (proteínas de eflujo), como *hef A*, *hef D* y *hef G*¹⁵³ las cuales incrementan la prevalencia de resistencia de *H. pylori*.

Aunque la resistencia a Mtz es mayor que la de otros antimicrobianos, sus mecanismos de resistencia aún no se han esclarecido, pese a investigaciones moleculares que han permitido detectar mutaciones puntuales en los genes *rdx* y *frx*, que originan productos con actividad de nitroreductasa para el Mtz, que al reducir el grupo nitro, genera una hidroxilamina altamente mutagénica, evitando la eficacia terapéutica de Mtz en el *H. pylori*¹⁵⁴.

La prevalencia de resistencia a metronidazol (Mtz) en el mundo es alta, como se observa en la **tabla No 7**, donde se detalla su prevalencia de resistencias, como 90% en Asia, 50% en Estados Unidos de América y Europa Occidental, 70-100% en África y 42 -97,6% en Suramérica¹⁵⁴.

Los fracasos terapéuticos están relacionados directamente con la resistencia antimicrobiana *in vitro*, como se detalla a continuación, según Garza y col^{88, 110}:

- Cepas resistentes a Cla en 18%, predice una erradicación de un 60%
- Cepas resistentes a Mtz, disminuyen la eficacia de erradicación en un 25%
- Cepas resistentes a Cla y Mtz, asociadas con IBP; Se estima un fallo erradicador hasta del 100%. Si se cambia el IBP en este esquema de tratamiento con un RCB, ranitidina citrato bismuto, la tasa erradicadora no se modifica.
- En contraste la resistencia de *H. pylori* a Cla, de menor prevalencia y de mayor relevancia clínica, reporta entre 2.2 % al 63.1% en Suramérica¹⁵⁶ (Gómez *et al.*, 2007), Colombia 63.1%, Perú 50%, 40.4% en Costa Rica, México y Argentina 24%, Brasil 7%, Corea 5,9%, Malasia 0%, Croacia 21%, Iran 9.4 a 23 %^{157, 158, 159, 160}, España y Portugal 22%, Polonia 20% y en Italia 91%¹⁵².

El incremento de esta doble resistencia a Cla y Mtz, justifica la importancia de caracterizar en cada región los patrones de resistencia antimicrobiana¹⁵².

Al hacer referencia a la resistencia a amoxicilina en países desarrollados, diferentes estudios revelan prevalencias muy bajas entre 0 al 1% en Francia^{152, 161, 162} altas entre 31-45% en Italia. En países en desarrollo se ha demostrado incremento de la resistencia a Amx^{131, 132, 133}, con prevalencias en Brasil entre 29 - 39%¹⁶³, en Iran entre un 7 - 41%^{157, 158, 159, 160} y Costa Rica del 5.3 – 51.2%¹⁶⁴. En Colombia tres estudios han descrito prevalencia de resistencia a amoxicilina de 0%¹⁶⁵, 7%¹⁶⁶ y 9.5%¹⁶⁷.

Evidencias en Colombia hay un estudio hecho con 115 aislados de *H. pylori*, mediante el método de difusión por discos, resistencia al metronidazol en 97,6%, a tetraciclina 85,7%, a claritromicina del 63,1% y a amoxicilina 9,5%¹⁶⁵

El incremento de resistencia de *H. pylori* a Amx, se ha atribuido al uso indiscriminado de esta penicilina para tratar múltiples infecciones, que permiten la evolución de los diferentes mecanismos microbianos de resistencia, interfiriendo cada vez más las tasas de erradicación de la infección por *H. pylori*.

La prevalencia de resistencia multidrogas de *H. pylori* a Amx – Cla, es cerca del 1% ¹⁶⁸(S. Toracchio et al, 2003), dato superado en esta investigación que permitió determinar cifras mayores, presentados posteriormente en los resultados de este trabajo de investigación.

Al enmarcarnos en la prevalencia de resistencia de *H. pylori* a otros antimicrobianos como tetraciclina y furazolidona, estos registran menor resistencia, con cifras entre 0 al 4.7 %^{163, 157, 158, 159, 160,152} y 7% respectivamente. En Europa, la prevalencia de resistencia registrada en Portugal es hasta un 21%, en Holanda 4,7%, y en Francia entre 3 a 4%¹⁶².

Ante la falla en la erradicación de *H. pylori*, se ha propuesto el uso de las quinolonas como levofloxacina, como alternativa más eficaz contra la infección por *H. pylori*, en esquemas cuádruples en combinación con IBP y otros antibiótico, como se explica en el cuadro recomendado por el último consenso de Maastricht 2006.

El uso antimicrobianos sintéticos como los nitrofuranos, específicamente la furazolidona, ha permitido la erradicación de la infección por *H. pylori* en un 90.5% implementado en esquemas de tratamientos cuádruples. A pesar de la alta eficacia, la limitación para su uso es el alto costo¹⁶⁸.

Con respecto a los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a la tetraciclina, se deben generalmente a mutaciones puntuales del gen 16S *rRNA*, evitando la transcripción de proteínas estructurales de la bacteria (Jiang et al., 1996, y Versalovic et al., 1996).^{27, 169}.

3.9. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos por *H. pylori*.

La resistencia bacteriana se ha clasificado de acuerdo a su forma de adquisición o mecanismo de resistencia enmarcada de la siguiente manera:

- **Natural o primaria:** Definida como la falla intrínseca del antibiótico para erradicar la infección, generalmente por un efecto de barrera, que impide la penetración del compuesto antibacteriano.
- **Adquirida: Generalmente** debida a mutaciones genéticas o por presencia de plásmidos.
- **Farmacológica:** Se refiere a cepas de *H. pylori* susceptibles a un antibiótico *in vitro* pero resistentes *in vivo*, por dificultad del antimicrobiano de llegar al foco de la infección aun en concentraciones ideales.

Entre los mecanismos de resistencia frente a diferentes antimicrobianos se citan los siguientes:

- **Transferencia horizontal de genes:**

Adquisición de genes procedentes de plásmidos o de transposones mediante transferencia horizontal de genes. Sin embargo, la transferencia horizontal por si no explica el origen de los genes de resistencia, solo su difusión entre las bacterias¹⁰⁶ (Arnold L M, et al., 2008)

- **Mutaciones de genes bacterianos:**

Reducen funciones de las proteínas de transporte o porinas, afinidades de enlace de las proteínas, actividades de las enzimas, fuerza motriz protónica, o de los sistemas de control y regulación. Estas mutaciones se pueden considerar como «beneficiosas» si se tiene en cuenta la supervivencia de las bacterias, al no proporcionar un mecanismo genético para una «descendencia común con modificación». Estas mutaciones generalmente están asociadas a algún coste biológico con pérdida de sistemas o funciones celulares preexistentes, aunque existan mutaciones inversas, que hacen recuperar la mayor parte de actividad celular¹⁴⁷. Tabla No. 8.

Estas mutaciones frecuentemente pueden desarrollar resistencia antimicrobiana alterando diferentes mecanismos bioquímicos, tales como:

1. Eflujo activo del antibiótico por la bacteria.
2. Alteración molecular de canales de membrana o porinas.

- **Alteración molecular del receptor blanco:**

Generada por mutaciones puntuales en el gen *pbp1-A*, las cuales inhiben la unión del antibiótico al producto génico PBP1A¹³⁰ (Okamoto T et al, 2002).

- **Inactivación del compuesto antimicrobiano:**

Por inactivación de nitro-reductasas u oxidación del antibiótico, evitando la forma activa del antimicrobiano, p.ej: Mtz (Vallejos et al., 2003)¹⁷⁰.

- **Biopelículas:** Definidas como congregación de bacterias que crecen

unidas a una superficie, envueltas en una matriz de exopolisacáridos que las protege de la acción de los antimicrobianos. *H. pylori* puede sobrevivir como biopelículas, su adherencia al cristal, acero inoxidable, hierro o arcilla representa un nuevo hábitat que le puede permitir sobrevivir en condiciones adversas en el medio ambiente y una vez que entra en contacto con la mucosa gástrica proliferar como bacteria libre¹⁷¹

Según El Instituto Nacional de Salud de E.U, más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biopelículas, atribuyéndoseles a estas la causa de la mayoría de las infecciones nosocomiales. Las bacterias que viven en estas biocongregaciones son entre 150 a 3.000 veces más resistentes a los antimicrobianos, que las no adheridas. La infección por biopelículas se manifiesta por recurrencia de síntomas de los pacientes que están recibiendo tratamientos con antibióticos. Por todas estas razones es necesario desarrollar nuevos medicamentos que contrarrestar las infecciones en las cuales el biofilm o biopelícula está involucrado¹⁷²

El *H. pylori* se agrupa también en biopelículas para sobrevivir en microambientes hostiles, aumentando su adherencia al cristal, al acero inoxidable, hierro o arcilla representando un nuevo hábitat de supervivencia de *H. pylori* en condiciones adversas, donde la escasa presencia de mucina en estos bioagregados los fortalece; por el contrario su incremento permite su forma libre, principalmente cuando el *H. pylori* tiene contacto con la mucosa gástrica donde prolifera eficazmente.

El aumento de la resistencia de las biopelículas de *H. pylori* a los antimicrobianos involucra varios mecanismos que permiten su persistencia en procesos infecciosos, tales como:

- Inactivación de los antibióticos por polímeros extracelulares o modificación enzimática
- Disminución de la tasa de crecimiento por limitación de nutrientes.
- Disminución de mucina en el *H. pylori* incrementan la formación de estos bioagregados.
- Cambios fenotípicos por adquisición de genes de resistencia dentro del Biopelículas.
- Inactivación de genes ("quorum-sensing", *luxS*, y *cagE*) aumentan la formación de estos bioagregados¹⁷².

3.9.2 Mecanismos de Resistencia Claritromicina.

La claritromicina es un macrólido, derivado semisintético de la eritromicina, de 14 carbonos y es el antibiótico más potente contra *H. pylori*, siendo mejor absorbido en la mucosa gástrica, más estable a pH ácido, resistente frente a los ácidos y se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Además, su eficacia no se afecta por la ingesta alimentos, siendo muy eficaz contra la infección ¹⁷⁴; Por otro lado, su metabolito hidroxilo generado *in vivo*, presenta mayor eficacia, por el efecto sinérgico que tiene con la sustancia madre, a diferencia de *in vitro* donde la Cla no posee este mecanismo sinérgico. Su mecanismo de acción está dado al unirse directamente al rARN ribosomal 23S rARN de la subunidad mayor 50S del ribosoma del *H. pylori* inhibiendo en efecto su síntesis de proteínas, ocasionando la muerte bacteriana. Figura No. 2

La resistencia a Cla ha podido comprenderse a través de sus mecanismos de acción, aunque aún existe mucha controversia al respecto ¹⁷⁰.

La Cla a nivel celular se une al RNA ribosomal, inhibiendo la polimerización de proteínas de *H. pylori*, la cual no se afecta si aparecen mutaciones en el gen 23S del rRNA, al evitar la unión de Cla al ribosoma originando un mecanismo de resistencia.

Estas mutaciones puntuales de la región peptidil transferasa, en el dominio V^{175, 176} del gen 23S del rRNA son frecuentemente debidas a sustitución de adenina por guanina en las posiciones (A2142G) y (A2143G), y a menor escala en las posiciones como la A2182G, A2115G y A2144G. Estas mutaciones en efecto disminuyen la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma¹⁷⁷ (Björkholm et al., 2001), permitiendo la síntesis de proteínas en *H. pylori* y sus continuas fases replicativas. Estas mutaciones varían de acuerdo a la población y ubicación geográfica, por ejemplo en la población turca, se han detectado mutaciones puntuales en la posición A2144G sin relación con los genotipos Ice A de la bacteria.

Según Jiang *et al* 1996¹⁶⁹ y Versalovic *et al*, 1997²⁷, las mutaciones puntuales en las posiciones del gen 23S rRNA de *H. pylori* aparecen generalmente por:

- Transiciones en el dominio V, en las posiciones A2142 G o A2143G¹⁷⁵.
- Transversiones en las posiciones A2142 C¹⁷⁸
- Mutaciones puntuales asociadas con alta resistencia a Cla en T2182C^{179, 180}.

Las determinaciones de estas mutaciones en el gen 23S rRNA realizadas por primera vez en 1996, se estudiaron con técnicas moleculares¹⁷⁵ como Reacción en Cadena de Polimerasa PCR, y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción (PCR-RFLP). En la PCR-RFLP se amplifica la región que contiene las mutaciones, y luego los fragmentos sintetizados se tratan con

endonucleasas de restricción para reconocer los sitios específicos de las mutaciones. La presencia o ausencia de la mutación se determina de acuerdo al tamaño de los fragmentos obtenidos. En la mutación puntual la sustitución de guanina en la posición 2142 del gen por adenina (A2142G) crea un sitio de restricción para la endonucleasas MbolI, produciéndose dos fragmentos de 700 pares de bases que comigran. En cambio la mutación puntual A2143G crea un sitio que es reconocido por la endonucleasa BsaI. La mutación en A2142G es la más frecuente asociada a resistencia a Cla¹⁷⁵, lo que ha suscitado un mayor interés en el estudio molecular del mecanismo de resistencia de este antibiótico. Es importante mencionar que la prevalencia de resistencia a Cla varía de acuerdo al uso del antibiótico en cada área geográfica¹⁸¹ (Castro *et al.* 2009) como es demostrado en diferentes estudios que realizados en todo el mundo. En Europa la prevalencia de resistencia a este macrólido varía entre un 4 al 18%, aunque existen registros altos en Italia registre hasta de un 91% de prevalencia de resistencia a Cla¹⁵² (Branca *et al.* 2004). Canadá y Estados Unidos registran prevalencias del 4% y 18% en respectivamente; en contraste en países en desarrollo la prevalencia de resistencia a Cla es mayor: De 29%, 50% y 100% en Asia, Suramérica y África respectivamente^{156, 157}.

Generalmente la resistencia a Cla se asocia con fallas o poca eficacia del tratamiento^{87, 135, 136, 137, 138} (tabla No 8).

En un estudio de 16 cepas sensibles a claritromicina que incluyó 10 pacientes con tratamiento exitoso y 6 con falla en el tratamiento, correlacionó las mutaciones puntuales en las posiciones A2142G y A2143G del gen 23S RNAr con la CIM, determinó que la mutación más frecuente fue en posición A2143G, después de la exposición o presión continua del antibiótico¹⁸² (Kobayashi I., *et al.* 2006). En Europa y Estados Unidos las mutaciones más frecuentes están presentes en la posición A2142G y A2143G, como lo registraron investigadores alemanes mediante la técnica PCR-RFLP, donde confirman en 36 cepas de *H. pylori* mayor prevalencia de mutaciones en la región A2143G (52.8%) que en la posición A2142G (36.1%). En Bangladesh hay

registros de resistencia del 20,2% por mutaciones en las posiciones A2142 y T2182¹⁸³ (Khan R y cols. 2004).

En Asia, específicamente en China, esta prevalencia es menor, alrededor del 10 al 14%, si el paciente no se ha tratado anteriormente con Cla, debido a que en pacientes tratados previamente con Cla, esta prevalencia se incrementa hasta 32% (OR = 3 a 4)¹⁸⁴ (Zhaoqi Liu, Deng y cols. 2008). Otras evidencias han reportado mayor prevalencia de mutaciones en la posición A2144G¹⁸⁵ en Asia y en Turkia. En Italia, la prevalencia en estas tres mutaciones anteriores, no difieren estadísticamente entre hombres y mujeres (25% vs 20%) ni entre pacientes con dispepsia no ulcerosa, ni en pacientes con úlcera péptica (24% vs 20%); además en esta población la terapia aplicada a los pacientes resistentes y no resistentes a claritromicina mostraron una tasa de erradicación de 66% vs 92% respectivamente, observando que los aislados de *H. pylori* que presentaban mutación en la posición A2143G tuvo menos respuesta de curación con terapia secuencial (IBP + Amx por 5 días, seguida de IBP + Cla y Tinidazol o Mtz) y disminuyó la tasa de erradicación a un 48%¹⁸⁶ (De F. Vicenzo, et al, 2006).

La resistencia a claritromicina demostrada en niños es mayor que adultos tal vez por el tratamiento previos de infecciones respiratorias¹⁸⁷. En Tokio ha reportado mayor frecuencia en niños (42,9%) que en adultos (11,1 %).

En Colombia, Álvarez y colaboradores en el 2007 evaluaron la resistencia antimicrobiana a claritromicina en 88 aislamientos de *H. pylori* obtenidos de pacientes dispépticos de Armenia y Pereira, en donde detectaron por métodos moleculares las mutaciones puntuales involucradas con dicha resistencia, encontrando que la tasa de resistencia a la claritromicina del 2.2%, la cual se asemeja a los datos de Chile y Paraguay, pero difieren de los de Ecuador, Brasil y México¹⁶⁵ (Álvarez et al. 2007).

Un estudio realizado en el 2008 por Yépez y cols haciendo uso del método de difusión en disco reporta una resistencia del 63.1% a este antibiótico en aislados clínicos obtenidos de pacientes de un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá.

Otro mecanismo de resistencia ha desarrollado el *H. pylori*, es la formación de bombas de eflujo, ante la presencia de macrólidos con más de 14 carbonos, como la Cla, dadas por la expresión de genes *Qep*, encargadas de expulsar los antibióticos e incrementar la resistencia bacteriana. Las mutaciones presentes en otros genes de *H. pylori*, pueden aumentar la producción de bombas de eflujo, para poder sobrevivir a la exposición de diversos antibióticos.

Sin embargo, una mutación es causa de una pérdida de control de regulación bacteriana y puede desencadenar mecanismos intracelulares aún desconocidos.

3.3.9.2.1 Gen 23S del rRNA relacionada con resistencia a claritromicina

La pérdida de un segmento de once pares de bases del gen ARNr 23S (Douthwaite et al., 1985), o mutaciones que alteran la conformación del ARNr 23S— que reduce la afinidad del ribosoma hacia el antibiótico¹⁸⁵, están implicados en la resistencia a la claritromicina. Entre las diversas mutaciones aparecen las delecciones puntuales en el dominio V del gen del ARN ribosomal de 23S, afectando actividad peptidil transferasa y evitando en efecto la polimerización de proteína. La mutación se da usualmente por transición de una adenina por guanina en la posición 2142 y 2143, o por mutación por transversión¹⁷⁸.

Estas mutaciones han permitido que la resistencia a la claritromicina sea cada vez más frecuente, aunque de menor prevalencia: Malasia 0%, Corea 5,9%, Bangladesh 20.2 %¹⁸³ (Khan y cols; 2004), Croacia 21%, Portugal 22%, México 24%, Brasil 7%, en Argentina 24%, y registros altos en el Perú del 50%. Tokio ha reportado mayor frecuencia en niños (42,9%) que en adultos (11,1 %). Según un estudio de Rodríguez y col, Colombia reportó en aislados clínicos resistencia de un 63.1%.⁴⁹ Es importante mencionar que la resistencia a Cla ha ido en ascenso⁸⁷, como se ha observado en España con un incremento del 2.2% (1991 a 1993) al 20.9% (1994 a 1996) y 28.3% (1997 a 1999) con un $p < 0.05$, indicando que los mecanismos de resistencia de *H. pylori* se están fortaleciéndose cada día más. Es importante mencionar que según Alarcón et

antibacteriana superior al de la penicilina, si bien no es estable frente a las beta-lactamasas^{181, 188}.

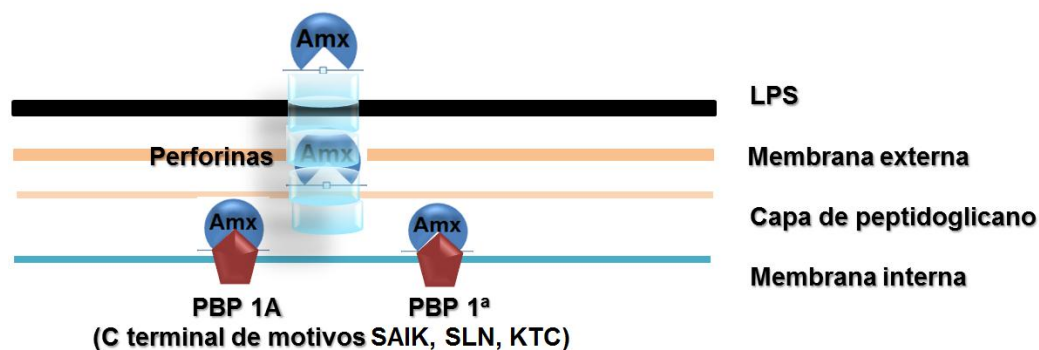
La resistencia *in vitro* a Amx es muy escasa en los aislamientos clínicos de *H. pylori* y varía de acuerdo al sitio geográfico¹⁶¹ (Megraud et al.,1999). Sin embargo, estudios recientes describen un incremento en la prevalencia de la resistencia a Amx entre 0 - 30% en diversos países^{131, 132, 133}, en Corea existen registros de resistencia a Amx del 18.5 % en cultivos primarios, y del 31.3 % en cultivos secundarios. Varios estudios preliminares en nuestro País, han reportado entre un 0% a 9.5% de resistencia a Amx^{165, 166, 167}

Las bacterias Gram-negativas frecuentemente se hacen resistentes a los β -lactámicos porque adquieren el gen de la β -lactamasa, ya sea en su DNA cromosomal o a través de plásmidos. Sin embargo, a la fecha solo se ha reportado un estudio donde demuestran la existencia de cepas de *H. pylori* productora β -lactamasa^{189, 190, 191}.

En *H. pylori* la proteína de unión a la penicilina ó PBP, es necesaria para formar su pared celular. Esta proteína o blanco es inhibida por los antibióticos betalactámicos al fijarse o unirse a ellos. La PBP tienen función transpeptidasa en región C terminal, donde sus motivos SAIK, SLN, KTC permiten unirse a las penicilinas como Amx, evitando la biosíntesis del peptidoglicano de la pared del *H. pylori* y en efecto muerte bacteriana.

La resistencia de *H. pylori* a Amx es básicamente por la disminución de la permeabilidad de la Amx en la membrana. Generalmente la resistencia a este betalactámico está dada por mutaciones puntuales en el gen *pbp1-A*, las cuales Inhiben la unión del antibiótico al producto génico PBP1A⁴⁸. Las enzimas PBPs descritas en *H. pylori* son PBP1, PBP2 y PBP3, importantes en la síntesis del péptido glicano de la pared celular de *H. pylori*, que corresponden a los marcos de lectura abierto (ORF) HP0597 (homóloga a la PBP1A de *Escherichia coli*), HP1556 (homóloga a la proteína FtsI) y HP1565 (homóloga a PBP2 de *H. pylori*) respectivamente, de acuerdo a la notación de la secuencia del genoma de *H. pylori* 26695.

Figura No 3. Mecanismo de resistencia de amoxicilina en *H. pylori*¹³¹



(Modificado por Mercedes Figueroa Macca, Grupo Registro Poblacional de Cáncer de Cali, Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Departamento de Patología, Universidad del Valle, Cali - 2011)

La resistencia a amoxicilina de *H. pylori* está enmarcada generalmente en la detección de mutaciones del gen *pbp 1A*, por sustitución de aminoácidos en las posiciones T438 M, de los motivos SKN ó SNN, o en las posiciones Asn562→Tyr, ó Ser414→Arg en la región transpeptidasa ¹⁹¹ (Rimbara y cols 2007). Ante el polimorfismo genético del gen *pbp* que genera variedad en secuencias de ADN, en diferentes cadenas de *H. pylori*. Otros estudios recientes han detectado mutaciones por sustitución de amino ácidos en posiciones Ast 362→Tyr en el gen *pbp1A*. Pero algunos autores refieren datos no consistentes, en estas mutaciones, ya que reportan que estas sustituciones no son específicas de cepas resistentes, ya que se han detectadas también en cepas sensibles¹⁹¹.

La resistencia a amoxicilina sucede no solo por mutaciones puntuales en el gen *pbp*, sino también por sustituciones de bases nitrogenadas en genes *hopB* ó *hopC*, que interfieren en la transcripción de las porinas HOPB y HOPC, implicadas en el flujo o tránsito de Amx al citosol bacteriano.

Las alteraciones génicas en *pbp1*, *pbp2*, *pbp3* evitan la transcripción de las proteínas de unión a penicilina PBP1, PBP2 y PBP3 respectivamente, inhibiendo la unión de Amx a esta, e incrementando el fracaso terapéutico. Las mutaciones en los genes

pbp1-A, está determinada por varias sustituciones en la región transpeptidasa, como sucede en las posiciones Ser414→Arg, ó Asn 562→Tyr, Asn 563→Tyr^{236, 237,238} y en menor grado las sustituciones de Thr356→ Ser, Thr338→ Ser, Gly595→Ser, Ala369→Thr, Val374→Leu, Leu423→Phe y Thr Gly598→ Ala²³⁵.

Algunos autores refieren que estas mutaciones no son específicas de aislados de *H. pylori* resistentes a Amx, ya que han sido halladas en cepas sensibles también, pero aceptan que el poseer la sustitución de Ser414→Arg en *H. pylori*, es un factor de riesgo de resistencia a Amx¹⁹¹ (Rimbara y cols 2007). Realmente los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a Amx son aún controversiales.

3.9.1.3.1 Permeabilidad reducida en la membrana bacteriana:

En *H. pylori* se han descrito tres péptido glican sintetasas o Proteínas de Unión a la Penicilina PBPs (PBP1, PBP2 y PBP3). En el C terminal de estas proteínas, existen motivos de unión a las penicilinas, como SAIK, SLN, KTC, que permiten unirse a los betalactámicos como la Amx, evitando la biosíntesis del peptidoglican de la pared del *H. pylori*. Mutaciones en estos sitios confieren resistencia a la Amx en *H. pylori*. Sin embargo los reportes de la sustitución de amino ácidos en el gen *pbp 1A*, no son consistentes, ya que el *H. pylori* es muy polimórfico genéticamente, el gen *pbp* tiene variedad en sus secuencias de ADN, en diferentes cadenas de *H. pylori*.

Evidencias actuales de Okamoto et al¹⁹⁰ demostraron que cambios en PBP1 en *H. pylori* están involucrados en la resistencia a Amx, y que este fenotipo es transmitido a otras cepas mediante transformación genética. Además Rimbara y cols en el 2007 reportan mutaciones en los genes *pbp1*, *pbp 2* y *pbp3*, en la región transpeptidasa, mediante múltiples sustituciones de amino ácidos (Ser →Arg) en los motivos de unión a la amoxicilina (SAIK, SLN y KTG). Existe otro estudio similar donde se transforman cepas susceptibles a Amx ATCC43504, con productos de PCR obtenidos por amplificación del gen *pbp1* de islotes resistentes a Amx TH517 y TH743, por cebadores *pbp1 F* y *pbp1R*, logrando un porcentaje de mutación de 0.03%.

3.9.1.3.2 Bombas de eflujo multidrogas:

Generalmente los antimicrobianos ingresan a las bacterias a través de diversos portales o canales de membrana, llamados porinas, como la OmpF¹¹⁹. Este flujo de antibióticos es alterado al ser inhibidas las porinas indirectamente por una proteína reguladora positiva MarA, que estimula la expresión de los genes *marA* y *marB*¹⁹², implicados en el eflujo de los fármacos. Estos mecanismos de resistencia están dados generalmente por no expresión del gen *marP* que produce la proteína reguladora, MarR. La proteína Mar R regula los mecanismos celulares al unirse al operon P de resistencia multidrogas, inhibiendo expresión excesiva de bombas de eflujo MarAB, evitando resistencia múltiple a fármacos¹⁹³ (Eaves et al., 2004; Hans-Jorg et al., 2000; Notka et al., 2002). Mutaciones de *marR* evitan su expresión y la actividad de la proteína MarR posibilitando así una expresión excesiva de la bomba de eflujo MarAB¹⁹⁴ (Linde et al., 2000), proporcionando resistencia múltiple a las bacterias^{193, 196}.

Investigaciones actuales, ha demostrado que la sustitución aminoácidos en los genes *hopB* y *hopC* inhiben la producción de las porinas HopB y HopC posibilitando eflujo de la amoxicilina al interior de *H. pylori*. Este mecanismo de eflujo complementa otras formas de resistencia, como sustituciones del amino ácido Asp362→Tyr detectadas en las mutaciones de los genes *pbp1* (Rimbara y cols 2007), convirtiendo cada vez más resistente al *H. pylori*¹⁹¹.

Además el *H. pylori* usa bombas de eflujo implicando genes como *hefA*, *hefD* y *hefG*, para codificar proteínas HefA, HefD y Hef G de eflujo respectivamente¹⁵³ (Zhi-Qiang Liu, Ping-Chang Yang 2008), provocando que *H. pylori* sobreviva a la exposición a diversos antibióticos como metronidazol, tetraciclina, erythromycina, penicillin G y ciprofloxacina.

Al hacer énfasis en los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a otros antibióticos como la tetraciclina y quinolonas, estos son generados generalmente por mutaciones puntuales en el gen *rRNA* 16S de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano¹⁹⁷ y en el

gen *gyrA* respectivamente. Además por la presencia de proteína de eflujo TetA¹⁹⁸ (*Li y Dannelly*, 2006) o reducción de la permeabilidad de la membrana de *H. pylori*¹⁹⁹. La resistencia a ciprofloxacina o la norfloxacina es generada por mutaciones puntuales en genes *gyrA* y *gyrB*, que evitan la producción de las proteínas blanco de la quinolona, la enzima ADN-girasa, formado por dos proteínas, GyrA y GyrB²⁰⁰. Estas mutaciones de las subunidades de la girasa parecen ser causa de un cambio de conformación suficiente de la enzima girasa de modo que reduce o pierde su afinidad por las fluoroquinolonas²⁰⁰

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer gástrico es la principal causa de muerte por neoplasias en Colombia, avala la necesidad de contar con herramientas que permitan detectar factores de riesgo y resistencia frente a esta patología, cuya persistencia constituye riesgo vital para el paciente. Por otra parte, el diagnóstico bacteriológico y estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos no se realiza rutinariamente en nuestro país, por no contarse con personal entrenado, ni de disponer metodologías alternativas de uso habitual. Esto implica que la erradicación del microorganismo en un paciente se realice con terapias empíricas y que generalmente fracasan, teniendo que repetirse o cambiarse e incrementando así el costo en salud para el paciente y para el sistema de salud al que pertenece. La IARC al tener en cuenta al *H. pylori* como carcinógeno tipo I ^{2, 11}, ha centrado la atención de numerosos grupos de investigación, en el estudio de los factores de virulencia bacterianos, susceptibilidad genética del hospedero y en el posible papel de la erradicación de la infección por *H. pylori* como una estrategia válida de quimioprevención del cáncer gástrico, que exige disponer de medicamentos eficaces que garanticen la erradicación de la infección ^{69, 70}.

En Colombia co-existen regiones de alto (Montañas andinas) y bajo (Costas) riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. En la ciudad de Pasto (Nariño) el O.R para desarrollo de cáncer gástrico es 2,2 veces mayor que en Tumaco, IC ³. Esto se ve reflejado en la frecuencia divergente obtenida en Pasto y Tumaco del diagnósticos de gastritis no atrófica (9% vs 54%)³, asma intestinal (56% vs 19%) y displasia (17 vs 0%) respectivamente. Por estas razones se han propuestos varios protocolos para erradicar la infección por *H. pylori* de la mucosa gástrica, utilizando antibióticos (ATBs) con sales de bismuto o inhibidores de bombas de protones como omeprazol y lansoprazol, según las recomendaciones hechas por el último Consenso de Maastricht 2006 ⁶⁹, que además recomienda que el tratamiento sea simple, efectivo, de bajo costo y libre de efectos secundarios.

Aunque la meta es lograr la erradicación del *H. pylori* por lo menos en 90% de los pacientes tratados, pocos esquemas terapéuticos lo han logrado^{12, 69}. Los mejores esquemas que logran por lo menos la erradicación de la infección del 80%⁶⁹, son las triples, como el esquema de Omeprazol, Claritromicina y Amoxicilina (OCA), debido a los pocos efectos secundarios que produce, porque es más simple de administrar, y proporciona elevados porcentajes de erradicación. Sin embargo, la duración del tratamiento no está bien definida. Se han evaluado esquemas de 7, 10 y 14 días con resultados diversos^{69, 70}. Los esquemas de 14 días reportan erradicación hasta de un 93%¹⁷⁹, razón por la cual se suministró en los pacientes de este estudio.

Es importante tener en cuenta que el fracaso terapéutico depende de varios factores, como el abandono del tratamiento por el paciente, la pronta reinfección de los pacientes tratados con éxito, a la existencia de cepas resistentes a los ATBs, o a una combinación de las tres causas anteriores²⁰².

Conocer a fondo los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos, es importante en áreas de alta prevalencia de la infección²⁰³. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio se ha enfocado en la evaluación del valor predictivo de la sensibilidad *in vitro* vs erradicación del *H. pylori* en habitantes de zonas de riesgo para desarrollo de cáncer gástrico. En Colombia actualmente no se conoce la asociación existente entre resistencia antimicrobiana de *H. pylori*, virulencia y la erradicación de la infección, debido a que no existen criterios estandarizados para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos amoxicilina y claritromicina, ni se usa un esquema terapéutico ideal^{69, 181}. Es indispensable conocer y entender la manera: ¿Cómo se asocian los patrones de susceptibilidad antibiótica con los factores de erradicación en poblaciones que tienen riesgo de cáncer gástrico?, como Túquerres (Alto riesgo) y Tumaco (bajo riesgo), con incidencia de cáncer gástrico de 150 por 100.000 40 por 100.000, respectivamente²⁰⁴, ambas poblaciones con la infección por *H. pylori* altamente prevalente³. Este contraste establece una oportunidad única, para que prospectivamente se complementen estas asociaciones, para explorar otros factores que justifiquen tal diferencia como resultado

de la infección. El entendimiento de este fenómeno puede contribuir a aclarar el proceso de carcinogénesis y al diseño de estrategias para su prevención.

Ante el desconocimiento de los patrones de susceptibilidad de *H. pylori* en nuestro país, es una de las razones por las que este estudio tiene como objetivo determinar la respuesta antimicrobiana de *H. pylori in vitro* obtenidos a partir de mucosas gástricas de pacientes provenientes de zonas de alta prevalencia a la infección por *H. pylori*, Tumaco, para dilucidar la situación actual de nuestra población frente a la infección por *H. pylori*, y poder sugerir de manera más precisa los esquemas propios de tratamiento. La pregunta concreta de esta investigación es:

¿Existe alta prevalencia de resistencia antimicrobiana en aislados de *H. pylori* obtenidos a partir de biopsias de pacientes con gastritis crónica provenientes de población de bajo riesgo a cáncer gástrico?

¿Cuál es la eficacia terapéutica del tratamiento triple OCA en la población de bajo riesgo a cáncer gástrico?

Estas preguntas permitieron formular como la siguiente hipótesis de este trabajo de investigación:

“ La resistencia *in vitro* a Amx y Cla de *H. pylori*, predice la pérdida de eficacia del esquema triple OCA en pacientes con gastritis crónica asociada con la infección por *H. pylori*”.

5. JUSTIFICACION

La erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica humana, ha sido un reto para la comunidad científica, ya que el papel de este patógeno parece cambiar su grado de virulencia, quizás por influencia epigenética aún no clara, como la presión de la bacteria dada por antimicrobianos, permitiendo relacionar el tratamiento de la infección con el cuadro patológico. Diferentes factores relacionados con el *H. pylori* pueden afectar su erradicación, como su sensibilidad antimicrobiana y sus marcadores de virulencia²⁰². Dentro de las pautas empleadas en el tratamiento de *H. pylori*, claritromicina, amoxicilina y tetraciclina son los antibióticos más usados, y dependen de la combinación de los mismos, dosis y su duración⁶⁹. En este estudio se escogieron los antibióticos amoxicilina y claritromicina, debido a que estos antimicrobianos junto con el omeprazol, como I.B.P, han sido considerados como un esquema triple erradicador eficaz entre un 90% al 97%, según III Consenso de Maastricht 2006. Además la combinación de metronidazol, claritromicina resistentes y un I.B. P como omeprazol, pueden fallar en la erradicación de la infección hasta en un 100%²⁰⁵, falla que disminuye si se mezclan estos antibióticos con ranitidina, razones por las cuales en este estudio no se usó.

El fracaso en la erradicación de *H. pylori* es alta en países en desarrollo, y varía por área geográfica¹⁸¹ por esto es esencial tener conocimiento sobre los perfiles de susceptibilidad y las variaciones en los índices de resistencia a claritromicina y metronidazol, y en menor escala a amoxicilina y tetraciclina ya que el conocimiento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de estos antibióticos *in vitro*, puede explicar el éxito o el fracaso de los antibióticos utilizados en los diferentes regímenes erradicadores de *H. pylori* en una población. Es esencial tener conocimiento sobre los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos propuestos en estos regímenes terapéuticos para asegurar su éxito. Los puntos de corte propuestos para la claritromicina son: para las cepas sensibles de $\leq 0,25$ ng/ml, para las cepas resistentes de ≥ 1 ng/ml y para las cepas intermedias de 0,5 ng/ml. Con estos puntos de corte se han obtenido excelentes valores predictivos en el éxito de la triple terapia con un IBP,

claritromicina y amoxicilina. No existen criterios estandarizados para otros antibióticos como la amoxicilina, tetraciclinas, rifabutina y levofloxacino¹⁸¹ (Castro y cols., 2009). En Colombia hay limitada información de la prevalencia de resistencia a los diferentes antibióticos anti- *H. pylori* y no se ha profundizado en el estudio de la asociación descrita entre susceptibilidad antimicrobiana y erradicación.

El desconocimiento de los patrones de susceptibilidad bacteriana en nuestro país, es una de las razones por las que este estudio se justifica, al tener como objetivo determinar la respuesta antimicrobiana de *H. pylori in vitro* obtenidos a partir de mucosas gástricas de pacientes provenientes de zonas de alta prevalencia a la infección por *H. pylori*, como la población de Tumaco.

En consecuencia, el conocimiento de la susceptibilidad antibiótica de cada aislado clínico tiene importancia para la toma de decisión en el esquema de erradicación a utilizar para la infección por *H. pylori*. El Ministerio de Protección Social y el Ministerio de Salud, han recomendado investigar la presencia del *H. pylori*, en todos los pacientes con úlceras pépticas, y manejarlas con tratamiento erradicador¹⁸¹.

Es importante denotar que los resultados obtenidos en este estudio permitirán contribuir al diseño de tratamiento de erradicación de la infección en ésta población; además de complementar los hallazgos del trabajo macro de investigación “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica”, actualmente en ejecución, donde se comparará los perfiles de resistencia bacteriana y de virulencia en dos poblaciones de contraste a riesgo a cáncer gástrico; además fortalecerá al Grupo Registro Poblacional de Cáncer de Cali, al Departamento de Patología de la Universidad del Valle, donde se desarrolló este trabajo de investigación. También permitirá diseñar nuevos proyectos de investigación que complementarán estos estudios como detección de mutaciones puntuales de genes relacionados con resistencia antimicrobiana de *H. pylori*.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERALES

- Determinar la respuesta antimicrobiana de *Helicobacter pylori* aislado a partir de biopsias gástricas en pacientes con gastritis crónica provenientes de zona de bajo riesgo a cáncer gástrico.
- Evaluar la eficacia terapéutica del esquema triple sugerido por Maastricht 2006 en pacientes con gastritis crónica provenientes de Tumaco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la frecuencia de resistencia a claritromicina y amoxicilina *in vitro* de *Helicobacter pylori* en biopsias de antro y cuerpo gástricos provenientes de población de bajo riesgo para cáncer gástrico, Tumaco-Nariño.
- Determinar la relación entre respuesta antimicrobiana a amoxicilina y claritromicina *in vitro* y la eficacia terapéutica en pacientes con gastritis crónica de Tumaco- Nariño

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de descriptivo, comparativo y a simple ciego con 203 adultos con gastritis crónica procedentes de Tumaco, para determinar la prevalencia de la infección y de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en los Laboratorios de Biología Molecular, Histopatología y Microbiología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle.

7.1. Tipo de estudio:

Este es un estudio descriptivo, de prevalencia con un tamaño de muestra de 203 pacientes provenientes de Tumaco-Nariño.

7.1.1. Cálculo de Tamaño de muestra:

Teniendo en cuenta la prevalencia promedio de *Helicobacter pylori* de 79.0% en la población de Tumaco, con un poder del 80% y una pérdida del 10%, el número calculado como tamaño de muestra por conveniencia es de 203 pacientes, según estudio **Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica**”, actualmente en ejecución.

7.2. Población de estudio

Los datos se obtuvieron de 203 pacientes procedentes de Tumaco, municipio con 166.000 habitantes, con actividad económica enmarcada principalmente en la pesca, agricultura y turismo; con clima tropical húmedo, temperatura ambiente promedio de 28 °C, siendo una de las regiones más lluviosas del mundo.

Los pacientes de este estudio fueron seleccionados en consulta externa del Hospital de San Andrés de Tumaco - Centro asistencial nivel II, donde acuden la mayoría de pacientes del oeste del pacífico nariñense - a quienes por padecer síntomas de dispepsia por conducta diagnóstica, se les ordenó endoscopia digestiva. Estos

pacientes de ambos sexos y con edades entre los 18 a 65 años, pertenecen a todos los estratos socioeconómicos.

7.2.1. Criterios de selección.

7.2.1.1. Criterios de inclusión

Hombres y mujeres adultos entre los 18 a 65 años de edad, que vivan en Tumaco y asistan a consulta externa del Hospital de San Andrés de Tumaco, con síntomas de dispepsia, a quienes se les sugiere como conducta diagnóstica o terapéutica la realización de una endoscopia digestiva superior por parte del médico tratante.

7.2.1.2. Criterios de exclusión:

- Paciente con cáncer, o enfermedad avanzada de pulmón, hígado ó corazón.
- Paciente con desordenes de coagulación o con administración de medicamentos con anticoagulantes.
- Paciente que estuviera recibiendo terapia específica contra *H. pylori*, o medicamentos inhibidores de bomba de protones y/o bismuto dentro de las cuatro semanas antes de la endoscopia.
- Pacientes con gastrectomía previa.
- Personas incapaces de entender los términos o que se rehúsen a firmar el consentimiento escrito.
- Prisioneros o individuos en otra forma de reclusión.
- Mujeres embarazadas.
- No acepte las recomendaciones de tratamiento y seguimiento.

7.3 Recolección y preparación de muestra.

Para cumplir con el primer objetivo:

Se recolectaron 4 muestras gástricas (dos de antro y una de cuerpo) para aislar *H. pylori* y poder determinar la susceptibilidad a amoxicilina y claritromicina.

Para cumplir con el segundo objetivo se tomaron 4 biopsias gástricas (dos de antro y dos de cuerpo), para poder realizar los análisis histopatológicos. Para poder determinar la eficacia terapéutica del tratamiento triple OCA-2, se suministró este tratamiento. Seis semanas posteriores se les tomó una prueba en aliento detallada posteriormente en metodología.

7.3.1. Procedimiento de endoscopia y biopsias.

Los pacientes fueron reclutados en consulta externa en el Hospital San Andrés de Tumaco, quienes después de haber firmado de manera consciente el consentimiento informado, se les tomaron por prescripción médica las biopsias gástricas por endoscopia.

Los pacientes fueron registrados en la base de datos, mediante un número ó código de identificación con la sigla SV (Susceptibilidad Virulencia) y la numeración desde 001 hasta 206. Hubo tres pacientes que se excluyeron por no cumplir a cabalidad las recomendaciones postuladas. A cada paciente se le hizo una encuesta que incluía datos demográficos. Anexo No.1. Un vez presentado el paciente en ayunas a consulta externa y después de la encuesta socio demográfica, un gastroenterólogo experimentado con la ayuda de personal asistencial, obtuvo siete biopsias de mucosa gástrica por endoscopia digestiva. **Figura No 4.**

Las muestras obtenidas fueron conservadas de la siguiente manera:

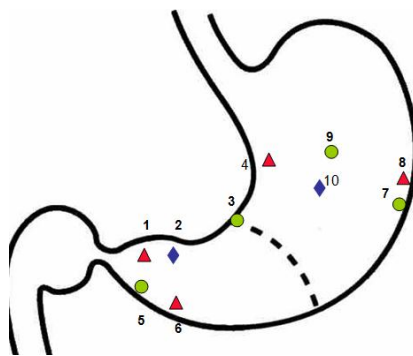
- 1. Para análisis microbiológicos y pruebas moleculares (urea A)** las biopsias gástricas se conservaron en tioglicolato con glicerol al 25%:

- 1.1 Dos muestras de mucosa gástrica antral.
- 1.2 Una muestra de mucosa gástrica corporal.

2. **Para análisis histopatológico:** Se conservaron en formol salino al 10%:

- 2.1 Dos muestras de mucosa gástrica antral.
- 2.2 Dos muestras de mucosa gástrica corporal.

Figura No 4. Topografía de la procedencia de las biopsias gástricas tomadas mediante endoscopia a pacientes con gastritis crónica procedente de Tumaco.



Antro:

- 1: Curvatura menor
- 2: Curvatura menor a 3 cm de píloro
- 5 y 6: Curvatura mayor a 3 cm del píloro.
- 3: incisura angularis.

Cuerpo

- 4: Curvatura menor
- 7: Curvatura mayor a 10 cm del cardias
- 8: Curvatura mayor
- 9 y 10: Pared anterior media

Fuente: Laboratorio de Patología Universidad del Valle.

7.3.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

7.3.2.1 Transporte y congelación de biopsias gástricas:

Las biopsias gástricas conservadas en formol salino y tioglicolato-glicerol al 25%, fueron enviadas con su forma de remisión respectiva desde Tumaco hacia el Laboratorio de Microbiología, Histopatología y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, en neveras portátiles y en nitrógeno líquido respectivamente. Posteriormente se clasificaron y ordenaron en cajas numeradas,

donde se especificó la ubicación de cada biopsia para ser conservadas a -70 °C, en congelador REVCO (Kendrolab. Product ULT 2586-SA37), para preservar la cadena de frío.

7.3.2.2 Procedimientos de histopatología:

Para análisis histopatológicos se procesaron cuatro biopsias gástricas procedentes de curvatura menor, mayor, antro y cuerpo, conservadas en formol salino al 10%, según protocolo especificado en anexo No. 2. Cada fragmento o biopsia obtenida para evaluación histopatológica fue fijada, procesada y examinada separadamente, con un protocolo de deshidratación de 2 horas, seguido de inclusión en parafina en bloques individuales en las siguientes 24 horas. Durante el proceso de inclusión en parafina los fragmentos fueron cuidadosamente orientados para que el plano de la mucosa quedara perpendicular a la superficie de corte, garantizando una apropiada evaluación de todo el espesor de la mucosa. Posteriormente se realizaron tres cortes de 6 µm de grosor. Luego se colocaron en portaobjetos previamente lavados con alcohol ácido, tres secciones o cortes de mucosa, para luego ser fijados durante la noche a 56 °C. Después de este procedimiento estas placas fueron coloreadas con hematoxilina y eosina (H&E), y con coloración de Giemsa modificado²⁰⁶ (Madan E KJ y cols, 1988) para detectar la presencia de *H. Pylori*. Los casos negativos se colorearon con Steinner modificado²⁰⁷. Finalmente se evaluaron individualmente mediante microscopia de luz siguiendo los criterios diagnósticos descritos por la escala visual análoga de Dixon⁷ (Dixon MF y cols. 1996). La evaluación microscópica determinó el tipo de gastritis y la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica mediante la escala de Sydney. Los resultados fueron registrados en una base de datos que incluía aspectos relativos para cada paciente, y diagnóstico por cada fragmento.

7.3.2.3 Procedimientos microbiológicos:

Las biopsias gástricas se registraron en un formato de registro de cultivos que incluía datos como: Días de incubación, calidad de crecimiento, clase de contaminación, identificación, conservación y susceptibilidad bacteriana. Una vez registradas las muestras gástricas de antro curvatura menor clasificadas como biopsias No.1 se

sembraron por triplicado en agar Columbia con 10% de sangre de cordero y con suplemento (Oxoid, H pylori Selective Supplement SR0147E: Vancomycin 5.0 mg, Trimetoprim 2.5 mg, cefsulodin 2,5 mg y anfotericina 2,5 mg), Los cultivos se incubaron a 37° C en atmósfera microaerofílica durante diez días. Teniendo en cuenta que *H. pylori* es una bacteria de crecimiento lento, cada caja de Petri fué evaluada a partir del tercer día de incubación, sin omitir el registro diario de los resultados obtenidos de cada siembra individualmente, indicando el día de contaminación, el día y calidad del crecimiento, los repiques necesarios y la identificación y susceptibilidad. Simultáneamente los resultados fueron registrados en el formato señalado anteriormente.

7.3.2.4. Aislamiento de *H. pylori*.

El cultivo es un método diagnóstico muy sensible (85%) y específico (96%) para detectar la infección por *H pylori*, principalmente en muestras procedentes de pacientes con cáncer gástrico⁸¹.

Después de haber registrado las muestras en los formatos de cultivos, y de haber descongelado los fragmentos de mucosa gástrica, se procesaron para el aislamiento primario de *Helicobacter pylori*, de la siguiente forma:

1. Maceración y homogenización de biopsia gástrica con ayuda de macerador eléctrico (Peller Pestle – Mott – Kontes) y bolillos plásticos en 200 µl de solución salina 0.89% en tubo estéril eppendorff durante un minuto.
2. Siembra por agotamiento del macerado impregnado en el bolillo en la primera caja de Petri con agar Columbia con 10% de sangre y con suplemento preparado y rotulado con el número de la biopsia correspondiente.
3. Siembra por agotamiento con asa calibrada de 10 µl desechables del macerado obtenido en los dos medios selectivos restantes. El macerado restante de las biopsias gástricas fué congelados a -70 °C inmediatamente.

4. Incubación inmediata (5 -6 % de O₂, 8-10% CO₂ y 80-85% N₂) durante diez días.
5. Realización de la prueba de ureasa a partir del macerado en tubo de Nunck con urea al 10%.
6. Conservación inmediata a -70 °C del macerado gástrico sobrante

Se utilizó como cepa control positivo la cepa ATCC 43504, considerando puntos de corte de CIM como sensible al crecer a concentraciones < 0,015 mg/L; y como resistentes las cepas que crecen a concentraciones > 0,12 mg/L tanto para claritromicina, como para amoxicilina¹⁸⁴.

A toda UFC (unidad formadora de colonia) cuya morfología fuese típica del género *Helicobacter*, se le identificó como de la especie *pylori* al ser positiva para las pruebas de identificación: Ureasa, catalasa, oxidasa y coloración de Gram. Una vez identificados los aislados de *H. pylori* se conservaron en PBS (para pruebas extracción de ADN para pruebas moleculares) y en tioglicolato- glicerol 25%(para activación posterior de la bacteria). Además se le realizaron repiques por triplicado en agar sangre sin suplemento a aquellos aislados de calidad escasa de crecimiento. En los casos donde no hubo crecimiento o fué muy escaso en la biopsia No.1, se utilizó la biopsia No 6 de la curvatura mayor del mismo paciente para un nuevo intento de aislamiento de *H. pylori*. Si la situación persistía se intentó de igual manera el aislamiento con la biopsia de cuerpo gástrico No. 8. Una vez identificado el aislado como *H. pylori*, se les practicaron las pruebas de susceptibilidad a amoxicilina y claritromicina, mediante el método de dilución en agar detallado en el anexo No 3. Simultáneamente, para preservar los aislados se tomaron alícuotas, en medio líquido de tioglicolato por duplicado, y en Buffer Fosfato Salino ó PBS para extraer el ADN genómico, para realizar las pruebas moleculares necesarias para otros estudios de investigaciones en curso. Los aislamientos de *H. pylori*, con calidad muy escasa o con muy pocas colonias se repicaron por triplicado en agar sangre sin suplemento para reproducir su crecimiento.

Criterios para identificar colonias de *H. pylori*:

Se consideraron aislados positivos para *H. pylori* los que presentaron colonias pequeñas traslucidas, no hemolíticas, convexas de 1- 2 mm de diámetro, con reacción positiva para ureasa, catalasa y oxidasa, y que microscópicamente fueron bacilos Gram negativos curvos ó espiralados.

7.3.2.4.1 Pruebas de identificación:

Las pruebas de ureasa, catalasa, coloración de Gram y oxidasa, se detallan a continuación:

7.3.2.4.1.1 Prueba de Ureasa: ²⁰⁷

A los macerados sobrante post siembra de las biopsias gástricas, se les realizó la prueba de ureasa en tubo Nunc con 2 ml de solución de urea al 10% con rojo de fenol como indicador de pH ó indicador de la enzima. Foto **No.1**, interpretadas cada minuto durante los primeros cinco minutos, y una lectura final a los 20 minutos. Los resultados fueron registrados en el formato respectivo, considerándose como positivas las muestras que se tornaron de color fucsia durante la prueba. Esta prueba fue realizada de igual manera a los aislados obtenidos de los cultivos de las biopsias gástricas.

Foto No.1 Prueba de Ureasa:



7.3.2.4.1.2 Prueba de Catalasa (Van Hazel et al., 1996)^{207, 223}.

Sé colocó un inóculo del aislado de *H. pylori* en lámina portaobjeto estéril y se adicionaron dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10% y se interpretó como positiva la inmediata formación de burbujas. Foto No.2.

Foto No.2 Prueba de Catalasa²⁰⁷.



Reacción negativa y positiva, realizada en solución de urea al 10% a partir de macerado gástrico en el laboratorio de Microbiología, Departamento de Patología, Universidad del Valle. Cali Julio 2009

7.3.2.4.1.3 Prueba de oxidasa: Método Difco: P-aminodimetilamilina

Se extendió con un asa de argolla un inóculo de aislado de *H. pylori* sobre un papel de filtro de 3x3cm impregnado con reactivo de Kovacs en una lámina portaobjeto. Se consideraron positivos los aislados que se tornaron de color violeta pasados los 5 a 10 segundos. Foto No 3.

Foto No 3. Prueba de oxidasa²⁰⁷



Reacción positiva de inóculo de *H. pylori* aislado en el Laboratorio de

Microbiología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Cali 2010

7.3.2.4.1.4 Coloración de Gram ²⁰⁷

Esta coloración se realizó posterior a la fijación del extendido del inóculo aislado de *H. pylori* con los reactivos de violeta de genciana, lugol, alcohol acetona y fuchina básica. Posterior a esta coloración los extendidos fueron leídos por microscopia en (microscopio Olympus binocular) con objetivo 40X y 100X. Los resultados de cada aislado fueron registrados en los formatos de cultivo. El control de calidad de la coloración de Gram se realizó semanalmente, usando cepas control ATCC43504 de *H. pylori* como control positivo.

Después de identificar química y microscópicamente los aislados de *H. pylori*, se realizaron las pruebas de susceptibilidad a claritromicina y amoxicilina (Amx y Cla) mediante el método de dilución en agar. La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos propuestos, según las guías desarrolladas por el Comité del Instituto de Estándares de Laboratorio americano (CLSI) ²⁰⁷.

7.3.2.5 Preparación de soluciones de trabajo de antibióticos Amx y cla

Es importante resaltar que antes de diluir los antibióticos en las cajas de Petri (55 x 14mm), con Muller Hinton (M.H), se prepararon soluciones de trabajo (ST) de los antibióticos Amx y Cla, de la siguiente manera:

- Se pesaron 50 mg de Amx y Cla por separado.
- Luego se midieron volúmenes en probetas de 50 ml de agua destilada estéril y metanol, solventes para Amx y cla respectivamente.
- Se mezclaron en vortex con magneto estéril, para lograr una solución madre de concentración de 1 mg/ml ó 1000 µg/ml.
- Luego se diluyeron estas soluciones 1:10, usando 100 µl de la solución stock de 1 mg/ml en 900 µl de los solventes mencionados para Amx y cla

(buffer fosfato y metanol respectivamente), para obtener una concentración final de 0.1mg/ml ó 100 µg/ml. de cada antibiótico. Anexo No 4.

- Posteriormente se filtraron 10 ml de cada solución de trabajo ST de 10 µg/ml con filtro de 0.22 µ de diámetro de poro en tubos estériles.
- Finalmente se realizaron alícuotas de 1 ml de cada ST de 10 µg/ml en tubos estériles Nunc, y se conservaron durante una semana a -20 °C, para asegurar la estabilidad del antimicrobiano.

7.3.2.5.1. Cálculo de volúmen necesario para cada caja de Petri con Mueller Hinton y sangre de cordero al 10%

Para saber cuántos micro litros del inóculo bacteriano debían añadirse a cada caja de Petri con M.H.S y obtener las diluciones de los antibióticos deseados, se partió del cálculo inicial del volumen (µl) requerido a partir de la solución madre de 1000 µg/ml, con la siguiente fórmula:

$$V1 C1 = V2 C2$$

Dónde:

C1= Concentración de solución madre: 1000 µg/ml.

V1= Volumen requerido en µl de solución de trabajo necesario para un volumen de 5.0 ml de agar M.H.S agregado a la caja de petri.

V2= Volumen de agar añadido a cada caja de petri: 5.0 ml de agar M.H.S.

C2= Concentración de solución deseada en µg/ml.

$$V1 = \frac{5 \text{ ml} \times 1 \text{ µg/ml}}{1000 \text{ µg/ml}} = 0.005 \text{ ml} = \mathbf{5 \text{ µl.}}$$

De tal manera que es necesario para lograr una concentración de 5 µg/ 5 ml ó de 1 µg/ml usar 5 µl de solución madre diluido en 5.0 ml de agar M.H.

Con estos cálculos se lograron los volúmenes requeridos para obtener las diluciones 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 µg/ml de cada antibiótico, partiendo de la concentración de la solución de trabajo (ST) detallada anteriormente de 100 µg/ml, para obtener la concentración final deseada del antibiótico:

1. Para obtener la concentración de **0.25 µg/ml**:

$$V1 = \frac{5 \text{ ml} \times 0.25 \text{ µg/ml}}{100 \text{ µg/ml}} = 0.0125 \text{ ml} = \mathbf{12.5 \text{ µl}}$$

2. Para obtener la concentración de **0.5 µg/ml**:

$$V2 = \frac{5 \text{ ml} \times 0.5 \text{ µg/ml}}{100 \text{ µg/ml}} = 0.025 \text{ ml} = \mathbf{25 \text{ µl.}}$$

3. Para obtener la concentración de **1.0 µg/ml**:

$$V3 = \frac{5 \text{ ml} \times 1.0 \text{ µg/ml}}{100 \text{ µg/ml}} = 0.05 \text{ ml} = \mathbf{50 \text{ µl.}}$$

4. Para obtener la concentración de **2.0 µg/ml**:

$$V4 = \frac{5 \text{ ml} \times 2.0 \text{ µg/ml}}{100 \text{ µg/ml}} = 0.100 \text{ ml} = \mathbf{100 \text{ µl.}}$$

5. Para obtener la concentración de **4.0 µg/ml**:

$$V5 = \frac{5 \text{ ml} \times 4.0 \text{ µg/ml}}{100 \text{ µg/ml}} = 0.200 \text{ ml} = \mathbf{200 \text{ µl.}}$$

Resumiendo, los volúmenes que usamos en cada caja de Petri para lograr las concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 µg/ml que se usaron en este estudio fueron respectivamente de: **12.5 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl y 200 µl. Tabla No. 10.**

7.3.2.6. Preparación de medios M.H.S en cajas de Petri para la CIM

A cada inóculo se le evaluó la CIM en las cinco concentraciones de antibiótico mencionadas anteriormente, en medio M.H.S. Es importante aclarar que el uso de sangre de cordero al 5 - 10% facilita la lectura de las colonias.

Teniendo en cuenta las técnicas de bioseguridad y de asepsia recomendadas por el CLSI, según las buenas prácticas de laboratorio, usando todos los medios de protección y mechero encendido, teniendo la precaución de no flamear los tubos Nunck con alícuotas de cla, para evitar accidentes por la presencia del metanol (solvente usado para este antibiótico), y sembrando la dilución del aislado por duplicado, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Rotulación de cada caja de Petri con las diluciones sucesivas de cada antibiótico: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 µg/ml.
- Se añadieron a cada caja de Petri, los volúmenes calculados de cada antibiótico de: 12.5 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl y 200 µl según cada concentración del antibiótico.
- Inmediatamente se agregaron 5.0 ml de M.H.S. entre 50 a 55 °C. y se homogenizó correcta y ligeramente cada caja de Petri con el medio y el antibiótico correspondiente.

Se tuvo en cuenta que cada caja de Petri con la mezcla agar- antibiótico alcanzara una profundidad de 3-4 mm, según recomendaciones dadas por el CLSI.

Como control de la preparación de las soluciones de antibiótico y las condiciones de la CIM se utilizó cepa de referencia *Helicobacter pylori* ATCC 43504, considerando puntos de corte de CIM como sensible al crecer a concentraciones < 0,015 mg/L; y como resistentes las cepas que crecen a concentraciones > 0,12 mg/L tanto para claritromicina, como para amoxicilina^{57, 207}.

7.3.2.7. Preparación y siembra del inóculo bacteriano.

El inóculo de *H. pylori* usado fue obtenido a partir de aislados no mayores de 72 horas de incubación en ambiente microaerófilico, con 10% de CO₂, y 5% de O₂ y a 37 °C, para evitar usar formas cocoides de *H. pylori*, formas bacterianas fácilmente resistentes a los antibióticos.

7.3.2.7.1 Ajuste del inóculo al patrón No. 2.0 de Mac Farland

A partir de un cultivo fresco (72 Horas) se tomaron varias colonias de *H. pylori* y se suspendieron en un tubo Eppendorf con 300 µl de solución salina al 0.89% para ser ajustadas con escala de Mc Farland 2 (1×10^7 a 1×10^8 UFC/ ml). Para esto se comparó cada tubo contra el fondo de tabla delineada como contraste. Se agitó muy bien el estándar de turbidez antes de proceder a la comparación. Para asegurar la concentración del inóculo, se determinó a cada uno la densidad óptica de 0.243 ± 0.020 (Espectrofotómetro ELX 800 Biotex instrumental) correspondiente a la concentración de Mac Farland 2 con filtro de 630 nm.

7.3.2.8. Siembra de los inóculos de *H. pylori* (Fig. 5)

Una vez ajustados los inóculos, se agregaron de la suspensión del inóculo, 4 µl a cada caja de Petri con menor dilución de los antimicrobianos Amx y Cla. Posteriormente se incubaron en atmosfera microaerófila y a 37 °C, durante 72 horas. Como controles se usaron:

- Medio Mueller Hinton con Sangre de cordero al 8% (MHS) sin antibiótico
- Una serie de cajas con MHS y las diluciones específicas de los antibióticos para la cepa control ATCC 43504 (entre 0.012 y 0.015).

Recomendaciones llevadas en procedimientos microbiológicos:

- No invertir ni inclinar las placas hasta que la micro gota de inóculo se haya absorbido.
- Verificar que todas las placas estén secas antes de la siembra.

- Sembrar desde la menor concentración de antibiótico para reducir el efecto “carry over” o arrastre de concentraciones del antibiótico de mayores a menores concentraciones.
- Inocular una caja control de viabilidad al finalizar la serie (Caja de Petri sin antibiótico), para confirmar la no contaminación ó un significativo efecto de residuales del antibiótico durante el procedimiento que disminuya la viabilidad de los aislamientos.
- Las cajas de Petri inoculadas deben mantenerse a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el inóculo, máximo durante 2 minutos.
- Verificar siempre las condiciones microaerófilas o de atmósfera del cultivo con bajo contenido de O₂ y al menos 10% de CO₂ (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂).
- Leer los valores de CIM de cepa control ATCC 43504 para Amx y Cla teniendo en cuenta que los valores de CIM de la cepa control deben estar siempre dentro del rango de concentraciones establecido por la CLSI para poder validar los resultados de CIM con cada uno de los antibióticos.
- Hacer las lecturas de la CIM con la luz directa.
- No se debe considerar el desarrollo una tenue película causada por el depósito del inóculo.

7.3.2.9 Criterios de Resistencia de aislados, puntos de corte e interpretación:

Los aislados fueron considerados resistentes a claritromicina y amoxicilina cuando la CIM fue mayor o igual a 1 mg/L (≥ 1 mg/l). Es importante aclarar que según *Castro y cols* 2009, los parámetros de resistencia a amoxicilina aún no están establecidos o estandarizados en el mundo, aunque muchos autores utilicen un CIM de 0.5 mg/l ó igual a 1mg/l (≥ 1 mg/l). Los aislados clínicos se consideraron sensibles cuando la CIM fue menor o igual a $\leq 0,5$ mg/l.

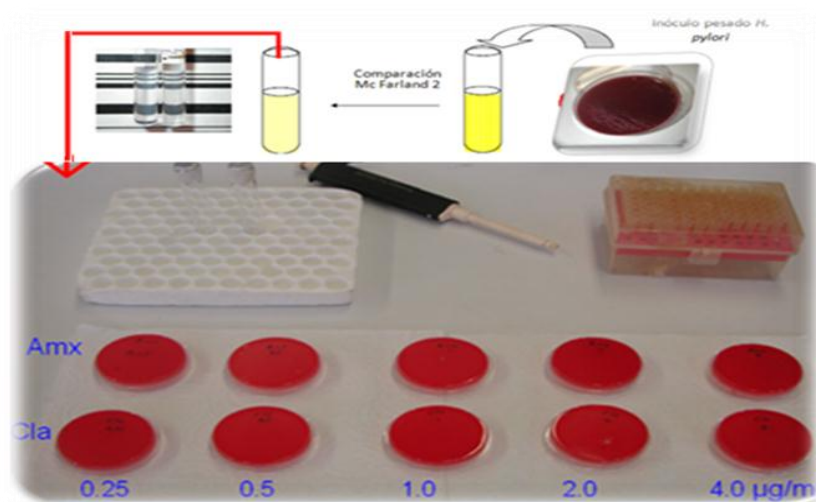
7.3.2.10 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Los aislamientos de *H. pylori*.

Para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori* se utilizó el método de dilución en agar (Ramírez Ramos y Robert H. Gilman, 2001), teniendo en cuenta que la concentración inhibitoria mínima (CIM)²⁰⁷ es definida como la menor concentración del antibiótico que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (ausencia de colonias). Se utilizaron cajas de Petri con Muelle r- Hinton (Oxoid) suplementado con 10% de sangre desfibrinada de cordero (M.H.S) con concentraciones de los antibióticos de 0,25, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 µg/ml, por duplicado, según estudios preliminares^{57, 207}. Anexo No 3, con estándar de Mac Farland 2 según tabla visual delineada, para obtener inóculos entre 10^7 a 10^8 UFC/ml. Este patrón de turbidez de Mc Farland fue homogenizado cada vez que se usó para ajustar inóculo.

Cada inóculo fue diluido en 250 µl de solución salina al 0.89% y ajustado visualmente mediante la tabla delineada de Mc Farland. Para comparar el ajuste visual de los inóculos usados en con Mc Farland 2, se tomaron treinta aislados más obtenidos a partir de la biopsia de antro curvatura mayor, y se validó al comparar las lecturas de las densidad óptica usadas tanto por el método con tabla visual delineada como lecturas del inóculo por espectrofotometría. Estas densidades ópticas fueron leídas en un espectrofotómetro ELX 800, a una absorbancia de 630 nm. Es importante aclarar que el método de ajuste del inóculo bacteriano hecho por espectrofotometría, fue estandarizado mediante una curva de transmitancia espectral con solución salina 0.89% y concentraciones de Mc Farland entre 0.5 a 3. con filtros de 450, 490 y 480-630 y 630 nm de cada solución del inóculo. El ajuste a Mc. Farland 2 del inóculo ideal obtenido, fue el encontrado a una densidad óptica de 0.243 ± 0.020 (Espectrofotómetro ELX 800 Biotex instrumental) correspondiente a la concentración de Mac Farland 2 (1×10^7 a 1×10^8 UFC/ ml) con filtro de 630 nm. Posterior al ajuste del inóculo diluido se tomaron 5 µl de este con pipeta automática y se sembraron por agotamiento en cada caja de petri con M.H. S con la concentración respectiva del antibiótico. Ver Foto No 6. Después de

tres días se hicieron las diferentes lecturas de la CIM y se compararon. Ver recomendaciones de *Megraud y cols*, 2007, **tabla No 11**.

Figura No. 5 Método de Dilución en agar de Amoxicilina y claritromicina para evaluar susceptibilidad de *H. pylori*.



Los resultados obtenidos fueron registrados en formatos de cultivo respectivos. Anexo No.5.

7.3.2.11 Suministro de tratamiento triple OCA

Una vez diagnosticada la presencia de infección por *H. pylori* mediante histopatología, los pacientes infectados fueron manejados con el tratamiento triple por 14 días con omeprazol 20mg 2 v/d, claritromicina 500mg 2 veces/día (2v/d) y amoxicilina 1000mg 2 v/d ⁶⁹. Mediante personal enfermería de apoyo se controló la adherencia de este tratamiento, llevando registros diarios de su cumplimiento. Cuarenta y cinco días post-tratamiento triple OCA se evaluó la erradicación de *H. pylori* mediante la prueba en aliento con [¹³C]-Urea. Posteriormente los resultados de UBT se compararon con los resultados *in vitro* obtenidos a partir de la CIM mediante el estadístico *kappa*²⁰⁸.

Prueba de aliento con [¹³C]-Urea:

Para determinar la erradicación de la infección por *H. pylori*, en el Hospital de San Andrés de Tumaco fueron citados 171 de 180 pacientes positivos para *H. pylori* (Según diagnóstico histopatológico) en ayunas 45 días post tratamiento triple OCA, para recolectar una muestra basal de aire espirado por paciente, en un tubo de 10 ml. Se excluyeron nueve pacientes por no cumplir con el tratamiento a cabalidad, por embarazo y cambio de domicilio. Otra muestra de aliento fué recolectada 30 minutos después de la ingestión de la solución que contenía la [¹³C]-Urea 100 mg²⁰⁹. De los 171 pacientes, dos pacientes fueron excluidas por embarazo. A los 169 pacientes restantes se les tomaron las muestras en aliento por duplicado en ayunas y después de la ingesta ¹³[C] Urea 100 mg, preparada previamente por una enfermera experta en una solución con sabor a naranja en un recipiente plástico graduado. En dos tubos de ensayo de vidrio estériles de 14 x 100 y de tapa rosca, se recogieron las muestras de aliento con boquillas selladas. A todos los pacientes se les indicó suspender la ingestión de antimicrobianos, inhibidores de bomba de protón y compuestos de bismuto dos semanas antes de la realización del estudio para evitar resultados falsos negativos; además de ayuno el día de la prueba.

Procedimiento:

1. El contenido del sobre se colocó en la copa de plástico y se rehidrató con solución de glucosa anaranjada comercial hasta la marca para su dilución completa
2. Al paciente se le indicó inhalar profundamente y contener el aliento por un periodo breve de tres a cinco segundos, y exhalar el aliento dentro del tubo a través de la boquilla (muestra basal).
3. Posteriormente se dio a beber la solución de urea preparada de manera continua o sin pausas.
4. Se guardó reposo durante treinta minutos, durante el cual el paciente no fumó ni ingirió bebidas o alimentos^{209, 210}

5. Se tomó la segunda muestra de aliento (post) utilizando igualmente el tubo de vidrio estéril.

Posteriormente las muestras son remitidas al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, a temperatura ambiente, en formatos específicos. La presencia del isótopo ^{13}C en las muestras de aliento pre y post ingesta [^{13}C]-Urea 100 mg fué detectada mediante espectrofotometría de luz infrarroja, previa calibración del equipo IRIS- DOC (WAGNER Analysen- technik, Bremen, Germany). Para determinar cada resultado se utilizaron los valores de diferencia de (t30) (delta) con respecto a la línea de base de [$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$] (t0), y mediante una diferencia delta DOB (Delta Over Baseline value) se obtuvo el resultado en partes por mil (‰), considerándose positivas las lecturas mayores o iguales al punto de referencia 5‰ previamente descritas en estudios anteriores²⁰⁸. El aumento en la relación de $^{13}\text{CO}_2$ a $^{12}\text{CO}_2$ en el aliento después de tomar la solución se considera indicativa de la infección con *H. pylori*; en ausencia de *H. pylori* la urea ^{13}C no es desdoblada a $^{12}\text{CO}_2$ y los niveles de las muestras basal y post-ingesta permanecen en los mismos valores. Para el análisis estadístico de resultados se utilizaron la prueba exacta de Fisher y la Chi χ^2 ⁶⁰ (Murray RS. 1991).

7.3.3. CONSIDERACIONES ETICAS

La toma de muestras de mucosa gástrica de este proyecto fue avalada por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Valle, a través del addendum con acta No 023, con código 176-08, realizado al proyecto del proyecto "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica", financiado por UNIVALLE-COLCIENCIAS (No 1106-408-20549 RC 3012007). Este proyecto además fue financiado por la Universidad del Valle, en octubre del 2008 con un código interno No.1610. Anexos No.6, 7 y 8.

7.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Plan de análisis: Inicialmente se hizo un análisis univariado, las variables continuas se describieron como promedios y las categóricas como proporciones. La concordancia entre los resultados *in vitro* y los resultados *in vivo* de UBT se estimó mediante el análisis *Kappa*. La significancia se estimó con una prueba de χ^2 o T dependiendo del tipo de distribución y la prueba exacta de Fisher y la χ^2 ⁶¹

Objetivos específicos:

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se discriminaron y correlacionaron entre sí, según base de datos relacional teniendo en cuenta las variables demográficas, histopatológicas y microbiológicas. Los datos fueron analizados en STATA 10.0. Se implementó la prueba exacta de Fisher (fue excluida la frecuencia observada de la categoría sin dato) para evaluar la asociación entre la prevalencia de *H. pylori* según método de diagnóstico (histopatología, Cultivo, UBT) y características socio demográficas, factores de exposición, tipo de gastritis crónica, y resistencia antimicrobiana a claritromicina (Cla) y amoxicilina (Amx). Los aislados se clasificaron como cepas susceptibles y resistentes. Como paso inicial para examinar la relación entre los tipos de gastritis (atrófica vs no atrófica). La relación entre la erradicación y la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, se realizó mediante análisis bivariado estratificado por edad, y sexo, mediante una prueba de χ^2 . Para cumplir con el objetivo 2, se estimó el coeficiente *kappa* para evaluar la concordancia entre los resultados *in vitro* (resistencia antimicrobiana) y los resultados *in vivo* (prueba en aliento U.BT), teniendo en cuenta la tabla de interpretación sugerida por *Atman et al.* 1991. Tabla No.13²⁰⁸.

Manejo de la información:

Los datos obtenidos se almacenaron en un sistema de base de datos relacional diseñada, donde se incluyeron tablas con información individualizada para cada conjunto de datos, tales como: Cuestionario base con información socio demográfico y epidemiológico; resultados histopatológicos, microbiológicos y de biología molecular.

8. RESULTADOS

8. 1 Características de la población del estudio:

Se evaluaron 203 pacientes de ambos géneros (29.06% hombres y 70.94% mujeres) con edades comprendidas entre 19 y 68 años, con una edad promedio de 40.43 ± 11.86 años. El 21.67% de la población se encontró en situación de hacinamiento; los hogares estaban contruidos con pisos de madera (49.75%); el agua provenía de tubería fuera de la vivienda (68.97%), con un sistema de acueducto (96.55%) y un sistema de drenaje conectado a pozo (51.72%). El 82.27% tenían estufa de gas, nevera (75.37%) y no poseían calentador el 97.5%. El 33.5% había fumado alguna vez tabaco; el 11.3% actualmente fuma tabaco y el 30.54% ha sido fumador pasivo. El 14.3% agrega sal algunas veces a los alimentos; el 7.4% tienen un consumo de sal alto y el 3% consume alcohol al menos 3 días por semana. En relación a la historia médica de los pacientes se encontró que 9.4% poseía un pariente que había tenido cáncer de estómago. Tabla No 14 y 15.

8.2 Hallazgos histológicos

Los hallazgos histológicos se describen en la tabla No. 16, estos fueron agrupados por separado según el diagnóstico endoscópico del paciente de acuerdo al tipo de gastritis hallada (atrófica y no atrófica), según la escala visual análoga de Dixon.

En la totalidad de las muestras histológicas se observó gastritis crónica, principalmente no atrófica (88%). Al correlacionar la prevalencia de la infección con género se encontró independencia de la edad, género, tipo de gástritis y la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica.

8.3 Hallazgos de microbiología:

De 203 biopsias gástricas procesadas para aislamiento de *H. pylori*, se obtuvieron **172** cultivos positivos caracterizados por tener colonias brillantes, traslúcidas, redondas, semejantes a las gotas de rocío, ligeramente elevadas, como se observa en la foto

No.4. Además se obtuvo un éxito en el aislamiento de *H. pylori* de 48.28% sembrando solo la biopsia de antro curvatura menor ó No 1. Las biopsias que no crecieron en esta porción gástrica, se sembraron a partir de la biopsia No 6 ó de antro curvatura mayor, el éxito del aislamiento, obteniendo un incremento en aislamiento al 66.01%. Posteriormente las biopsias que siguieron negativas en esta biopsia de antro, se sembraron de la porción de cuerpo gástrico, obteniéndose al final 33 aislados más para un total de 172 aislados representado en un 84.7 % de aislamiento total de las 203 biopsias gástricas; este hallazgo permitió corroborar que el *H. pylori* coloniza diferentes partes de la mucosa gástrica, verificando estudios preliminares (Castro 2009). Donde se especifica la frecuencia de aislamientos por biopsia gástrica. Tabla No.17.

Foto No 4. Colonias aisladas de *H. pylori* a partir de biopsia gástrica de paciente con gastritis crónica procedente de Tumaco en el laboratorio de Microbiología, Departamento de Patología, Universidad del Valle. Cali Julio 2009.



8.3 .1 Evaluación de aislamientos de *H. pylori*:

Como se mencionó anteriormente 172 cultivos (84.7%) fueron positivas para *H. pylori*, de las cuales a 146 aislados (84.9 %), se les pudo realizar óptimamente todas las pruebas de identificación y de susceptibilidad (tabla No 18). Veinte y seis cultivos, tuvieron aislamientos muy escasos, para cumplir con este fin, ya que los repiques realizados a partir de estos no fueron exitosos, probablemente por labilidad del *H. pylori*

durante su manipulación al exponerse al ambiente aerofílico del proceso, o por existencia de poca colonización de esta bacteria en porción o biopsia de mucosa obtenida. Además es importante mencionar que 31 biopsias gástricas fueron negativas para *H. pylori* probablemente por la ausencia de colonización de *H. pylori*, o por que las condiciones de transporte, ó *in vitro*, no fueron ideales, o por poca viabilidad de las bacterias presentes en la muestra, quizás por fallas durante la toma de muestra, transporte, pérdida de cadena de frío, entre otros factores importantes en el aislamiento de *H. pylori*. Todos estos inconvenientes constituyen una limitante para este estudio. De los cultivos primarios o cultivos que crecieron al primer intento, el 32% crecieron entre dos a cinco días de incubación, y el 68% después del sexto día de incubación, corroborando las recomendaciones que los diferentes investigadores recomiendan, sobre incubar los cultivos hasta 10 días a atmósferas microaerofílicas. Al hacer referencia a la calidad del crecimiento de *H. pylori*, se pudo observar que el crecimiento fue en general escaso (77.4%). Además sólo un 2% creció moderadamente, y otro 2% creció de forma abundante, a pesar de lograr y verificar las condiciones de incubación recomendada por el CLSI, de una atmósfera con un 10% de CO₂, 5% de O₂ y 37 °C. Tabla No.18. El mayor porcentaje de crecimiento se observó entre el quinto y décimo día (74.1% principalmente entre el quinto y sexto día, confirmando el crecimiento lento de *H. pylori*. Tabla No.19.

Al hacer referencia a la contaminación encontrada en los cultivos se pudo observar que sólo el 9.4 % de los cultivos se contaminaron durante el estudio, principalmente por hongos ambientales. Además el 48,5 se contaminó después del sexto día de incubación, incrementándose con los días, indicando que la contaminación es proporcional al tiempo de incubación. La mayor contaminación de los cultivos durante el aislamiento de *H. pylori* observada fue durante el sexto al décimo día de siembra (80.6%), quizás por razones re-exposición de los cultivos al ambiente externo durante la lectura por crecimiento de gérmenes oportunistas ambientales, ó por presencia de hongos saprófitos. Tabla No.20.

8.3.2 Susceptibilidad de aislados de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina

Partiendo de 172 aislados de *H. pylori* de 203 pacientes (84.7%), a 146 de estos (84.9%) aislados se les pudo determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los antimicrobianos amoxicilina y claritromicina. Los veinte y seis aislados (15.1%) restantes no se les pudo determinar la CIM, por escasos de inóculo bacteriano, y por qué en los repiques no persistió su crecimiento. Se observó prevalencia de resistencia a amoxicilina, a claritromicina y ambos antibióticos del 21.2 %, 21.2 % y 12.4 % respectivamente. El 80.6 % y 79.5% de los aislados fueron inhibidas con una concentración menor o igual a 0.5 mg/l de amoxicilina y de claritromicina respectivamente. Ambos antibióticos tuvieron un comportamiento unimodal y ningún aislado presentó una CIM a amoxicilina o claritromicina alejada del resto de la población estudiada (tablas No 23 y 24). Se observó el comportamiento esperado de la cepa control ATCC 43504. Los resultados obtenidos de prevalencia de resistencia a claritromicina como para amoxicilina fueron similares, y enmarcados entre los rangos de prevalencia de resistencia antibiótica suramericana, según estudios preliminares (tabla No 9). Al correlacionar la susceptibilidad antibiótica, los datos demográfico como edad, género y los resultados histopatológicos se observó independencia ($\chi^2 p > 0.05$). Tabla No.25.

8.3.3 Resultados de pruebas de aliento (UBT)

Según los resultados obtenidos de 169 pacientes a quienes se les tomó la prueba de UBT cuarenta y cinco días después de haber sido tratados con esquema triple OCA, se obtuvo una eficacia terapéutica del 79.8% (130/163), sólo a 33 pacientes no se les erradicó la infección según los hallazgos. A siete pacientes no se les pudieron determinar la prueba en aliento por calidad deficiente ó error en las muestras en aliento, considerándose como no concluyentes.

Los datos obtenidos de las pruebas en aliento demostraron independencia al asociarlos con los datos demográficos como edad y género con los resultados de UBT obtenidos. Tabla No.26 ($p= 0.58$ y $p = 0.35$ respectivamente).

Al realizar el análisis de concordancia con el coeficiente *Kappa* los resultados de resistencia a amoxicilina y claritromicina *in vitro* mediante la CIM con los resultados de pruebas *in vivo* mediante la prueba de UBT, se encontró que no había concordancia entre estos dos métodos según tablas No.27 y 28, según tabla de interpretación (valor < 0.20) de acuerdo a la interpretación de *Altman et al.1991*²⁰⁸ Tabla No. 13.

9. DISCUSION:

Este es el primer estudio de resistencia antimicrobiana de aislados *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes procedentes de Tumaco. Esta investigación permitió precisar en esta población, la alta prevalencia de la infección por *H. pylori* reportada en países en desarrollo como el nuestro, confirmando estudios preliminares¹⁷, ver tablas No.1 y 2.

Se observó mediante los métodos diagnósticos de histopatología y cultivo una prevalencia de la infección de 87.1 % y 84.7% respectivamente, además poca variabilidad en la frecuencia de la infección en relación con la edad, género, origen del agua y tabaquismo ($p > 0.05$)¹ Sin embargo contradiciendo estudios preliminares se observó significancia estadística en pacientes que no vivían en condiciones de hacinamiento ($p=0.04$), indicando una vez más las controversias de este factor del hospedero con respecto la infección.

En relación a la detección de la infección por *H. pylori* mediante histología pudo observarse que había independencia en el diagnóstico con respecto al número de biopsias y sitio anatómico gástrico (tabla No.21 y 22).

Al contrario al analizar el aislamiento de *H. pylori* a partir de la mucosa gástrica de esta población, se observó que el aislamiento mejoró al cultivar biopsias gástricas de diferentes porciones anatómicas, incrementándose de un 47.3% con una sola muestra a 82.8 % al sembrar tres muestras (dos de antro y una de cuerpo gástrico) indicando la variabilidad de *H. pylori* para colonizar la diferentes partes de la mucosa gástrica del hospedero como refieren diferentes autores²¹¹ (tabla No. 21 y 22).

Al finalizar el aislamiento, se observó un aislamiento óptimo en 146 aislados (87.43%), a los cuales se les pudo realizar todas las pruebas necesarias para esta investigación. En 26 cultivos (12.57%) no se pudo realizar el antibiograma por los repiques fallidos realizados a partir de una sola colonia ó las escasas colonias obtenidas, y hubo falta de crecimiento en 31 biopsias gástricas (17.7%) probablemente atribuible a diferentes

factores tanto intrínsecos como extrínsecos de la bacteria, que incluyen: las exigencias atmosféricas necesarias para su crecimiento, la densidad baja de bacterias en la mucosa gástrica, la presencia de contaminación por oportunistas ambientales y/o a microbiota gástrica competente, la poca colonización ó por la labilidad de la bacteria percibida persistentemente durante todo el proceso²⁰³ ó por la presencia de contaminación. Tabla No 20. Se recomienda realizar las lecturas diarias de los cultivos en una cámara de seguridad biológica con anaerobiosis, y minimizar la reexposición al medio ambiente.

Al hacer referencia a la contaminación encontrada en los cultivos se pudo observar que sólo el 10.94 % de los cultivos se contaminó durante el estudio, principalmente por hongos ambientales. Además 58,26% se contaminó después del sexto día de incubación y el 41.74% se contaminaron antes del quinto día de incubación, indicando que la contaminación es proporcional al tiempo de incubación.

La observación diaria del aislamiento de *H. pylori* en este estudio, permitió identificar que 89.5 % de los cultivos no se contaminaron (tabla No 20). La mayor prevalencia observada de la contaminación de los cultivos fué durante el sexto al décimo día de incubación (80.6%), generalmente generada por hongos saprófitos, probablemente por exposición al medio ambiente durante la lectura, o contaminación durante la siembra o toma de la muestra.

El *H. pylori* es sensible tanto *in vitro* como *in vivo*, a un amplio espectro de antibióticos (amoxicilina, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, imidazoles); sin embargo todos estos antimicrobianos *in vivo* fracasan al ser utilizados como monoterapia, debido a múltiples factores que ocasionan la pérdida de eficacia ó inacción del antibiótico a .pH ácido de la mucosa gástrica (pH 4 a 6) ²⁰³ Por estas razones el uso de los IBP es indispensable, al facilitar la síntesis proteica y la replicación bacteriana (a pH 6 y 8) necesaria para la acción del antimicrobiano²¹² y para disminuir la CIM hasta en un 10%.

El *H. pylori* ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia para sobrevivir, como la presión de selección generada post monoterapias utilizadas contra infecciones

diferentes a la de *H. pylori*, permitiendo seleccionar en la mucosa gástrica a las bacterias con mutaciones asociadas a resistencia. Obviamente esta presión por selección disminuye al asociar el antibiótico con un IBP y varía de acuerdo a su prescripción, debido a que entre más se use el antibiótico, más presión por selección se observa, como sucede con los macrólidos²⁰³, a diferencia de otros antibióticos como la amoxicilina, que por causas aún no claras, no ha aumentado la prevalencia de resistencia a pesar de que el *H. pylori* se haya expuesto durante mucho tiempo a este antimicrobiano y a mutaciones puntuales en el gen *pbp1-A*. En general la resistencia a Amx es muy inferior a la de los macrólidos, probablemente atribuible al efecto de la presión de selección anteriormente descrita.

Contrariamente en este estudio se halló similitud en la prevalencia de resistencia a Amx y a Cla, no observada en otros países, lo cual podría relacionarse con un mayor uso no controlado de los betalactámicos en esta población y por presión por selección generada por estos antimicrobianos en la bacteria. Además debe tenerse en cuenta que en la mayoría de estudios se ha utilizado la técnica de Epsilómetro menos específica y menos sensible que el método de Dilución en Agar, usado en este estudio.

El conocimiento actualizado de la susceptibilidad a los antimicrobianos más usados en una población, constituye una buena herramienta para disminuir las cepas resistentes de *H. pylori*¹⁸⁸, debido a que el principal inconveniente en el manejo de la infección por *H. pylori* es la falla en la erradicación con terapias de primera línea (Amx-Cla- Ome); además antes de definir un esquema de tratamiento óptimo anti- *H. pylori* es importante conocer no sólo el costo, los efectos colaterales, sino su fácil administración y eficacia, para que la dosis del antimicrobiano sea suficiente para neutralizar la concentración bacteriana presente en la mucosa gástrica¹¹³.

Recientemente Gomollón *et al*²¹⁴, cuestionaron sobre cuál es la estrategia actual más costo efectiva, entre iniciar el tratamiento de erradicación con el esquema de primera línea (IBP-Cla-Amx) y luego con la terapia de rescate en casos refractarios, ó emplear la estrategia inversa, concluyendo que es de primera elección aplicar en la población el tratamiento triple OCA, por su mayor adherencia obtenida en los pacientes, como lo demuestra un estudio aleatorizado realizado en Europa que permitió atribuirle al

esquema triple IBP-Cla-Amx mayor eficacia que el tratamiento de rescate cuádruple admitido internacionalmente (IBP- Bismuto-Tetra- Mtz) al obtener una eficacia terapéutica mayor (92% frente 73%).

Las prevalencias de resistencia de *H. pylori* a Cla en el mundo varía entre el 1- 44.7%¹⁵⁷ (Kohanted J y cols, 2007), aunque existan prevalencias mayores de 58%¹⁷⁵ y hasta del 100% en Nigeria ²¹⁴ (Oladipo y cols, 2007). La prevalencia de resistencia *in vitro* a Cla hallada en esta investigación es consistente con los resultados registrados en otros países latinoamericanos y aún en países del sur de Europa, donde existen registros de un 18% de prevalencia de resistencia a Cla ²⁰³.

En Latinoamérica, en países como Uruguay, Chile y México se han reportado prevalencias de resistencia a cla similares entre 19.4%, 20 % y 25 % respectivamente, mientras que en el Ecuador la prevalencia es menor, 9.5 %. Brasil ha reportado registros variables entre 9.8 y 25%, confirmando la existencia de gran variabilidad geográfica con respecto a las tasas de resistencia^{181, 163} (Castro y cols., 2009; Ortiz y cols 2006).

Los resultados encontrados en este estudio de prevalencia de resistencia a Cla del **21.2** % no se alejan de los hallados en dos estudios anteriores hechos en adultos en Bogotá^{155, 215}, que revelan una prevalencia de resistencia del 15% y 17.7% respectivamente, aunque hayan sido hechos con métodos de susceptibilidad diferentes al de dilución en agar. Pero al comparar nuestros resultados con otros dos estudios disímiles, uno en Bogotá con registros de resistencia a Cla de 63.1%¹⁶⁵; y otro en Armenia del 2.2% en 33 aislados de *H. pylori*¹⁶⁶, nos confirman una vez más que la prevalencia de resistencia antimicrobiana de *H pylori* depende de factores relacionados con la población, ubicación geográfica, ó factores como poca vigilancia en el uso de antibióticos ó por el mayor o menor cubrimiento de éstos por los planes subsidiados de salud. Además estas diferencias pueden justificarse quizás por el método con que se determinó la susceptibilidad antimicrobiana, como el método E-test y difusión de discos ó Kirby-Bauer, técnicas de menor sensibilidad que el método estándar de dilución en agar ²⁰⁷ (CLSI 2007).

Con referencia a la prevalencia global de resistencia de *H. pylori* para Amx varía entre 0 y 41%¹⁵⁷. La prevalencia de resistencia *in vitro* a Amx hallada en este estudio (21.2%) no se aleja de las encontradas en otros países en desarrollo, siendo consistente con resultados obtenidos en otros países latinoamericanos (Tabla No 7 y 9).

En la actualidad la resistencia a Amx, se puede asociarse con múltiples factores tanto intrínsecos (permeabilidad reducida en la membrana bacteriana, causada generalmente por mutaciones específicas del gen *pbp1A* ó por bombas de eflujo) ó extrínsecos como el sitio geográfico donde vive el hospedero^{114, 200}. Recientemente se ha detectado en el mundo una creciente resistencia a este antibiótico en diversas regiones geográficas^{131, 132, 133}, por mecanismos aún desconocidos.

En Colombia varios estudios han registrado la prevalencia de resistencia a amoxicilina: 0%¹⁶⁵, 3.5%¹⁵⁵, 7%¹⁶⁶ y 9.5%¹⁶⁷, mediante técnicas microbiológicas diferentes, como E-test, difusión en disco y dilución en agar. Igualmente la diferencias metodológicas pueden justificar la variedad en las tasas de resistencia a Amx, teniendo en cuenta que el método E-test a pesar de tener buena correlación con el método de referencia de dilución en agar, puede incrementar la CIM en algunos antibióticos hasta en un 10 al 20%¹⁸¹ (Castro 2009), mencionados en estudios preliminares.

En esta investigación la prevalencia de resistencia a este betalactámico fue similar a la registrada por Jung Mogg *et al* en el 2006 en Corea (18.5%)¹⁸⁰ mediante el mismo método de dilución en Agar, pero no se asemeja a los registros obtenidos mediante otra metodología empleada para su detección (E-test, Difusión en disco), probablemente por razones citadas anteriormente por Megraud *et al*,. 2009.²⁰³.

Contrariamente en otros países ó continentes se han encontrado hallazgos diferentes, como en Europa (0%)¹²⁹ ó Estados Unidos (1%)²¹⁶ ó Chile y Paraguay (2.2 %)²¹⁷. Sin embargo los registros obtenidos en Brasil (38%)¹⁶³ ó África²¹⁴ (100%) superan la prevalencia de resistencia hallada en este estudio (21.2%).

En este estudio la mayoría de los aislados resistentes a Amx crecieron hasta CIM de 1.0 ng/ml (60%), indicando un patrón de resistencia *in vitro* homogéneo e intermedio (Tabla No 24). Es importante aclarar que los rangos de CIM aún no están establecidos en nuestra población colombiana. En otros países son considerados mediante el método de dilución en agar como CIM resistentes las mayores o iguales a 0.5 mg/ml¹⁸⁰ ó a 0.25 como Vega- Brea¹⁴⁹ lo recomiendan, concentraciones aún no determinadas en nuestra población colombiana.

Según Álvarez y Cols en la población de Armenia no se aisló ninguna cepa resistente a Amx, quizás por errores metodológicos, ó porque realmente los estándares de resistencia de la bacteria en esta área geográfico aún no se han ajustado a la realizada, ó por que no existen cepas resistentes en dicha población.

En general los resultados de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* son controversiales, debido a que no se sabe la realidad ó verdad específica de los diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana de esta bacteria ²⁰³ (Megraud 2009), generalmente asociadas a mutaciones en *gen pbp1A*, o en los genes *hop B* y *hopC*, que inhiben el flujo de la amoxicilina en el interior de la célula, mediante bombas de eflujo HefA, HefD y Hef G¹⁵³ al generar cambios en la permeabilidad celular.

Actualmente nuestro grupo de investigación complementa este estudio determinando la presencia de mutaciones puntuales del gen *pbp1-A* y *23S r RNA* de estos aislados de *H. pylori* asociadas a resistencia bacteriana.

En este estudio la prevalencia de resistencia a Amx y Cla fueron iguales (21.2% vs 21.2%) posiblemente por la prescripción no controlada de estos antibióticos para tratar otras infecciones. Además es importante mencionar que el uso de la Amx es de alta demanda y cubrimiento por el sistema Plan Obligatorio de Salud ó POS. Es posible que esta resistencia *in vitro* de *H. pylori* a Amx y Cla haya sido generada por mecanismos de resistencia intrínsecos de la bacteria ya citados, como mutaciones puntuales en genes como *pbp1A*, *23s rRNA*, ó expresión de genes codificantes de bombas de eflujo

(OMEPR: *hef A*, *hef D* y *hef G*), mutaciones cromosómicas^{153, 181}, adquiridas por transmisión vertical, ó transferencia horizontal de genes de resistencia y plásmidos, aun con mucha controversia en el mundo.

Al asociar la resistencia antimicrobianos con grupo de edad, género y tipo de gastritis se observó independencia para ambos antibióticos, tabla No. 25 ($p = 0.58$ y $p = 0.35$ y $p > 0.05$), a diferencia de otros autores que refieren que la resistencia antimicrobiana se incrementa en el género femenino y en la edad adulta^{5,97, 102,109}

Al hacer referencia sobre la erradicación de la infección por *H. pylori* en una población, según el último Consenso de Maastricht III, es el esquema de primera línea el más recomendado, que incluye la triple terapia estándar con un I.B.P, amoxicilina y claritromicina^{97, 218}. Actualmente se ha observado una progresiva disminución de la eficacia de este tratamiento aún si el tratamiento ha sido suministrado por siete ó diez días²¹⁹ (57 - 79%), sin alcanzar por lo menos el 80% de eficacia recomendada. Esta pérdida de eficacia es debida fundamentalmente al progresivo aumento de la resistencia primaria de *H. pylori* a la cla y al Mtz, realmente un tema actual de preocupación^{97,219}

En este estudio pudo observarse una eficacia terapéutica del 79.8%, similar a los registro internacionales. Tabla No 26.

En general se acepta que un tratamiento anti *H. pylori* debe recomendarse si su eficacia es superior al 80% por intención de tratar y superior al 85% por protocolo¹⁸¹, entendiéndose por intención el hecho de incluir a todos los pacientes incluidos en el estudio, aunque se excluyan por cualquier motivo durante e estudio.

La eficacia actual de la triple terapia en el mundo, como tratamiento de primera elección es habitualmente inferior al 80% y en algunos estudios inferiores al 70%¹⁸¹ no siendo por tanto una opción terapéutica recomendable. Por estas razones la evaluación de este esquema terapéutico es motivo de estudio en muchos países, teniendo en cuenta que se deben cambiar estos antimicrobianos si la resistencia local a los mismos supera al 15-20% para cla y 40% para Mtz⁶⁹. Según diferentes autores, antes de definir

el esquema de tratamiento en una población, se debe considerar el uso previo de macrólidos, debido al impacto clínico que tiene su resistencia en la erradicación, como el descenso de la eficacia a un 50 - 60%^{221, 187, 93}, debido a que su repercusión sobre la eficacia de la terapia triple OCA es mayor cuando hay cepas resistentes a cla^{181, 223}. Según Megraud y cols (2004)⁹³ la eficacia del tratamiento triple OCA disminuye desde un 87,8 a un 18,3%, si hay resistencia a Cla, como se ha observado en poblaciones donde se han detectado cepas resistentes a Cla *in vitro* entre el 15 y 20%^{181,222}. La pérdida de eficacia del tratamiento es hasta del 70%. Por estas razones, la resistencia a Cla es considerada como el principal factor para incrementar las fallas en la erradicación de *H. pylori*. Por todas estas razones, según los resultados de este estudio (21.2% de resistencia a Cla), el esquema triple OCA aplicado a esta población debe replantearse.

Este trabajo de investigación se obtuvo una eficacia terapéutica satisfactoria (79.8%), a pesar de obtener *in vitro* una prevalencia de resistencia a Cla del 21.2%. Estos resultados permiten indicar que son múltiples los factores asociados a la falla en la erradicación, y no dependientes de los resultados *in vitro*, como se demuestra al analizar los resultados de susceptibilidad *in vitro* y los obtenidos mediante la prueba de UBT *in vivo*, donde no se halla la concordancia descrita en otros estudios previos, ver tablas No 27 y 28 ($Kappa -0,037$, E.E= 0.086) como Megraud *et al.*, 2009 y Broutet *et al*, 2000 lo sugieren^{203, 220}.

Al igual que los estudios realizados por Garza y cols, quienes describen que la erradicación no se afecta sólo por la presencia de resistencia a Cla de *H. pylori*, quizás debido a que la erradicación de la infección depende de factores tanto del hospedero, como de la bacteria, como los factores intrínsecos de *H. pylori*: crecimiento, mutaciones puntuales en genes, virulencia por cag PAI, densidad bacteriana en mucosa gástrica ó presencia eventual de bacterias intracelulares; si no puede estar asociada también a diferentes mecanismos de resistencia bacteriana(tabla No 4), ó a diversos factores como baja reproducibilidad de los datos *in vitro*, baja adherencia,

dosis y duración del tratamiento (Megraud 2009)²⁰³, y a propiedades farmacológicas de los antibióticos¹⁶²(Pajares y cols.,2007).

El aumento de aislados de *H. pylori* resistentes a amx y cla halladas *in vitro* en este trabajo permiten darle mayor importancia a la determinación de los genes implicados en resistencia bacteriana (*pbp1a* y *23 S rRNA*) para dilucidar las posibles causas de pérdida de eficacia *in vitro*. Además los rangos de susceptibilidad encontrados permiten determinar una base fundamental para adoptar nuevos esquemas de tratamiento de erradicación en la población de Tumaco. Las diferencias de susceptibilidad *in vitro* con el comportamiento *in vivo* de los antimicrobianos usados en los esquemas de tratamiento, han permitido dar la importancia del uso de los IBP, para mejorar la acción antimicrobiana²⁰³.

El uso de 1 gramo de Amx diario por dos semanas, ha disminuido la frecuencia de resistencia^{69, 203}, debido a la acción bactericida provocada por el anillo betalactámico al lograr desequilibrio osmótico en *H. pylori*. Esta acción sumada a la acción bacteriostática de Cla y del aumento del pH generada por los IBP, han permitido erradicar el *H. pylori* hasta en un 80%, como se pudo observar en este y múltiples estudios en el mundo (tabla No. 29).

10. CONCLUSIONES:

1. El diagnóstico *in vitro* de la resistencia antimicrobiana no predice la eficacia terapéutica del tratamiento de erradicación de la infección por *H. pylori*.
2. La alta resistencia de *H. pylori* a Cla y Amx alerta sobre la necesidad de replantear el esquema de tratamiento anti *H. pylori* usado en la población de Tumaco.
3. Son necesarios los ensayos clínicos multicéntricos para definir las CIM indicadas en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* en zonas de alta prevalencia de la infección por *H. pylori* para mejorar la eficacia de los esquemas de tratamiento en nuestra población Colombiana.
4. Es de vital importancia determinar las causas tanto intrínsecas como extrínsecas de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos más usados en ésta población para contribuir a la determinación de los verdaderos esquemas de tratamiento.

Perspectivas

Para complementar los resultados obtenidos en este trabajo de investigación nuestro grupo actualmente está ejecutando dos proyectos de investigación dos proyectos titulados: “ Susceptibilidad *in vitro* del *Helicobacter pylori* y su relación con su erradicación en pacientes con gastritis crónica procedentes de zona de bajo riesgo de Cáncer gástrico”, y “MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES 23S DEL rRNA Y PBP-1A DE *HELICOBACTER PYLORI*: RESISTENCIA A CLARITROMICINA Y AMOXICILINA IN VITRO Y SU RELACIÓN CON FRACASO TERAPÉUTICO ” PRE00485021243, financiados por la Universidad del Valle y por COLCIENCIAS, cuyos objetivos son:

1. Detectar las mutaciones puntuales en los genes *pbp 1A* y *23S rRNA* relacionadas con resistencia a amoxicilina y claritromicina respectivamente.
2. Estimar la relación entre las cepas de *H. pylori* resistentes a Amx y Cla con los factores de virulencia *cagA* y *vac A m1s1* y su asociación con desarrollo de lesiones precursoras de cáncer gástrico.

Actualmente se encuentra sometido un artículo de investigación en la revista Biomédica del Instituto Nacional de Salud, titulado “**Susceptibilidad *in vitro* de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico**” con código 1411, aceptado en Agosto del 2011, próximo a publicar.

11 BIBLIOGRAFIA

1. **Dowsett SA**, Archila L, Segreto VA, González Cr, Silva A, Vastola KA et al. *J Med Microbiol*. 1999; 48: 317-22 33
2. **Correa P**. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:14-19.
3. **Bravo LE**, Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the african enigma?. *The American J of Gastroenterol* 2002; 97:11:2839-42.
4. **Goodman KJ**, Correa P, Tengana HJ, Delany JP, Collazos T. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25:5:507-15.
5. **Gisbert JP** Gonzales L, Calver X, Roque M, Gabriel R, Pajares JM. *Helicobacter pylori* eradication: proton pump inhibitor versus raditidine bismuth citrate plus two antibiotics for 1 week: a meta-analysis of efficacy. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1141-50. 8.
6. **Correa P**, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, LI D, Johnson WD, Mera R. Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti- *Helicobacter pylori* therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(23):1881-88.
7. **Dixon Mf**, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated sydney sstem. *The American Journal of Surgical Pathology* 1996; 20:10:1161-81.
8. **Correa P**, Houghton JM. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133:2::659-72.
9. **Marschall B J**, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 1984;l: 1311-15
10. **Bioxeda D**. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 1:41-s47.

11. **International Agency for Research on Cancer (IARC)** Working Group. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon (France): IARC; 1994: 62; 177 – 240.

12. **Mera R**, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuolo MB, Camargo MC, Correa P. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. Gut 2005; 54: 1536–40.

13. **Gisbert JP** Calvet X, Gomollón F, Sainz R. Conferencia de consenso. Tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori*. Recomendaciones de la Conferencia Española de Consenso. Med Clin (Barc).

14. **O'morain C**, Borody T, Farley A, et al. Efficacy and safety of single-trile capsules of bismuth biskalcitrate, metronidazole and tetracycline, given with omeprazole, for the eradication of *Helicobacter pylori*: and international multicentre study. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 415-20.

15. **Torres, J.**, Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. & Muñoz, O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis. 1998 178, 1089–94.

16. **Lagunes BY**, Calva RR, Ramírez TE. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en niños sanos en edad escolar. Rev Mex Patol Clin 2001; 48:1: 23–7.

17. **Camargo M. C**, Lazcano-Ponce Eduardo, Torres, Velasco-Mondragón E, Quiterio M, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* Seroprevalence in Mexican Adolescents. 2004; 9: 106.114.

18. **Calva-Rodríguez R**, Luna-Alcántara JJ, Lagunes-Yannelli B, Rivera-Domínguez Santos-Marcial E Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in three populations of children in Puebla Mexico Rev Gastroenterol Mex 2006; 71:4:111-115

19. **Rodríguez CR**, Alcántara LJJ, Lagunes YB, Rivera DME, Calva CD, Santos ME. Prevalencia del *Helicobacter pylori* en tres poblaciones de niños, de la ciudad de Puebla, México, y sus factores de riesgo. Rev Gastroenterol Mex 2006; 71 :4: 440 – 5.

20. **Goodman KJ**, O'Rourke K, Dy RS, Wang C, Redlinger T, Campos A, de la Rosa JM. *Helicobacter pylori* infection in pregnant women from a U.S.- México border population J of Immigrant Health 2003 July; 5:3: 99 – 107.

21. **Martin-de-Argila** C, Boixeda D, Canton R, et al. *Helicobacter pylori* infection in a healthy population in Spain. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8: 1165-68. .
22. **Rothenbacher** D, Bode G, Peschke F, Berg G, Adler G, Brenner H. Active infection with *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population of middle aged to elderly people. Epidemiol Infect 1998; 120: 297-303.
23. **Hornemann** F, Nilius M, Malfertheiner P, Bartmann P. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in German infants and children. Helicobacter 1997; 2: 176-179.
24. **Lanciers** S, Hauser B, Vandenplas Y, Blecker U. The prevalence of *Helicobacter pylori* positivity in asymptomatic children of different ethnic backgrounds living in the same country. Ethn Health 1996; 1: 169-173.
25. **Bravo L.E**, Cortes A, Carrascal, Correa, Ordóñez N. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. Colombia Médica 2000; 31: 122-30.
26. **Vandamme(P.)**, Falsen(E.), Rossau (R.), Hoste(B.), Segers (P.), Tytgat (R.) and De Ley (J.): Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, **41**, 88-103.
27. **Versalovic** J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 283-6.
28. **Suerbaum** S, Smith JM, Bapumia K, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:12619- 24
29. **Ramírez Ramos**, Alberto, CHINGA ALAYO, Erick, MENDOZA REQUENA. Variación de la prevalencia del H. pylori en el Perú período (1985-2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto. Rev. gastroenterol. Perú. 2003; 23:2:92-98. ISSN 1022-5129.
30. **J Mahdavi** J., Sondén B., Hurtig M., Olfat FO., Forsberg L., Roche N., Ångström J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson KA., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg DE., Dubois A., Petersson C., Magnusson KE., Norberg T., Lindh F., Lundskog BB., Arnqvist A., Hammarström L. Sciencie, 2002;297:5581:573-8

31. **Borén T.** *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. **Science**, 2002:297, 573-578.
32. **Katyssulla** Costa, Gerold Bacher, Günter Allmaier, María Gloria Dominguez-Bello, Lars Engstrand, Per Falk, Miguel A. de Pedro, and Francisco García-del Portillo. The Morphological Transition of *Helicobacter pylori* Cells from Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall. *J Bacteriol.* 1999:181:12: 3710–3715.
33. **Bode, F.** Mauch and P. Malfertheiner. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability . *Epidemiology and Infection.* 1993:111: 483-490
34. **Atherton JC**, RM Peek Jr, KT Tham, TL Cover. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori* *Gastroenterology*, 1997:11:1:92-9.
35. **Censini, C** Lange, Z Xiang. Cag, pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factor. *National Acad Sciences Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010: 93 14648–53.
36. **Moran, B** Lindner Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough-and smooth-form lipopolysaccharides. *Journal of bacteriology*, 1997: 179:20: 6453–63
37. **Dunn B**, Campbell G, Perez-Perez G, Blaser M. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori* . *J Biol Chem* 1990; 265:9464-68.
38. **Rivas-Traverso.** Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed*, 2000: 18:1215-25.
39. **K A Eaton, C L Brooks, D R Morgan and S Krakowka.** Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 1991: 59:7: 2470-75.
40. **Spiegelhalder, B** Gerstenecker, A Kersten, E Schiltz and M Kist. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun.* 1993:61:12: 5315-25
41. **Ottlecz A**, Romero JJ, Hazell Stuart L, Graham D and Lichtenberger L. Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts Biochemical and biophysical studies. 1993:38::2071-80
42. **Warren, J. R y Marshal JI B.** 1983. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*: 1983: 1273-75.

43. **Suerbaum S**, Josenhans C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: *Journal of Immun.* 2007; 178: 1312–20. .
44. **Ramirez R**, Sanchez S. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 -2008): epidemiología, microbiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Rev. gastroenterol. Perú*, abr./jun. 2009: 29:2:158-70. ISSN 1022-5129.
45. **Ramirez Ramos y R. Gilman**. Comparación de la prevalencia de la infección del estómago por el *Helicobacter pylori* en el Perú en población Japonesa y Peruana. *Acta Gastroenterol Latin*. **2005**; **35(4)**:219-224.
46. **Suerbaum S**, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl Jour Med* 2002; 347:**1175-86**
47. **Makola D**, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 548-558.
48. **Blaser JM**. *Helicobacter pylori*. *Princ and Pract Inf Dis* 1991; Update 9:3-9.
49. **Parsonnet**, Hansen, Rodriguez I, Gelb A, Warnke A, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann J, Friedman *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Lymphoma *N Engl J Med* 1994; 330:1267-70
50. **Ernst PB**, THE DISEASE SPECTRUM OF *HELICOBACTER PYLORI*: The Immunopathogenesis of Gastroduodenal Ulcer and Gastric Cancer. *Annual Review of Microbiology*. 2005;54: 615-640
51. **Correa P**. *Helicobacter pylori* and gastric **carcinogenesis**. *Am J Surg Pathol*. 1995; 19 Suppl 1:S37–S43. [PubMed].
52. **Sakaki N**. *Helicobacter pylori* and Gastric cancer in view of relation to atrophy of background gastric mucosa. *Nippon Rinsho*. 1993;51:3242-47.
53. **K Hulten**, SW Han, H Enroth, PD Klein, AR Opekun, RH Gilman, DG Evans, L Engstrand, DY Graham, FA El-Zaatari. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*. 1996: 1 :1031-1035.
54. **Nolte FS**, Metchock B, McGowan, J.E., Edwards, A., Okwumabua, O., In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 6ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1995 : 400-437.

55. **Sandin** RL. Polymerase chain reaction and other amplification techniques in microbacteriology. Clin Lab Med. 2006; 16:617-39.
56. **Laila** F Nimri*1, Ismail Matalaka2, Kamal E Bani-Hani3 and Marwa Ibrahim. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients Gastroenterology 2006; 6 : 2
57. **Van der** Ende A, Rauws EA, Feller M, Mulder. JC, Tytagat JG, Dankert J: Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of family with history of peptic ulcer disease. *Gastroenterol* 1996; 111:638-47
58. **Johnson** John L. Classification In. Howard Barbara J. Clinical and pathogenic microbiology 2ed. St. Louis: Mosby Year book; 2002: 3-8.
59. **Isenberg** HD, ed. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992:11.10.1-11.10.9.
60. **Murray** RS. Estadística. 2a ed. Mc Graw-Hill, 1995; 109: 136-141.
61. **K A Eaton**, C L Brooks, D R Morgan and S Krakowka. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun. 1991; 59:7: 2470-75.
62. **Leying**, Suerbaum, G Geis, Cloning and genetic characterization of a *H.pylori* flagellin gene. interscience.wiley.com.. 1992:1365-2958.
63. **Suerbaum**, G Geis, Cloning and genetic characterization of a *H.pylori* flagellin gene. interscience.wiley.com. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01466
64. **Ottlecz** A, Romero JJ ,Lichtenberger L. *Helicobacter* infection and phospholipase A2 enzymes: Effect of *Helicobacter felis* infection on the expression and activity of sPLA2 enzymes in mouse stomach. Biomedical Life Sciencies: 221:1-2:71: 7710.
65. **Kist** M, Spiegelhalder C, Moriki T, Huberman E, (1993), Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis. 1993: 280, 58-72.
66. **Lyra** A, Santana G, Santana N, Silvany-Neto A, Magalhães E, Pereira EM, Mascarenhas R, Lyra MC, Viga A, Ferreira K, Zterka S, Lyra LG. Seroprevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in blood donors in Salvador, Northeast-Brazil. Braz J Infect Dis 2003; 7: 339-345.

67. **Olmos** JA, Rosa Diez G, Higa R, Algranati S, Rios H, DePula JA, Dos Ramos Farias E, Davolos J. Seroprevalencia de *H. pylori* en hemodializados. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2003; 33:139-144.
68. **Jiménez F.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-Caga de *Helicobacter pylori* y su relación con factores epidemiológicos en Santa Fe. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2004;34:16-20.
69. **Malfertheiner**, Mégraud F; O'Morain C; Bazzoli F; El-Omar E; Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*; 2007; 56:772-81.
70. Mégraud F; O'Morain C; Bazzoli F; El-Omar E; Graham D; Hunt R; Rokkas T; Vakil N; Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*; 2007;56:6:772-81.
71. **Boccio** J, Zubillaga M. *Helicobacter pylori*. Conceptos actuales. Editorial. APPTLA 1997; 47:194-6.
72. **Zubillaga** M, Oliverti P, Calcagno ML, Coldman C, Caro R, Mitta A, et al. Min 14C-UBT: A combination of gastric basal transit and 14C-Urea Breath Test for the detection of *Helicobacter pylori* infection in human beings. *Nuclear Med Biol* 1997; 24:565-9.
73. **Aguilar** Gutiérrez, Saavedra S, Mendoza P. 1, Bussalleu. Different virulence factors of *H. pylori* are being used. *Int J Med Microbiol* 2008;298(1-2):87-98. 55.
74. **Pérez-Pérez** WR Brown, TL Cover, BE Dunn, P Cao and MJ Blaser. Effects of cations on *Helicobacter pylori* urease activity, release, and stability. *Infect Immun*. 1994: 62:299-302
75. **Cohen** H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:4: 720-741.
76. **Kuipers** EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, Van der Ende A, et al. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 2000; 181, 273-282.
77. **Hussain** MA, Kauser F, Khan AA, Tiwari S, Habibullah CM, Ahmed N. Implications of molecular genotyping of *Helicobacter pylori* isolates from different human population by genomic fingerprinting of enterobacterial repetitive intergenic consensus regions for strain identification and geographic evolution. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2372-2378.

78. **Paredes E.**, Rojas C., Briones C., Briceño C, Jorquera A., Gonzalez C., Garcia. Rev. Asociación de gen vacA, un nuevo determinante genético en *Helicobacter pylori*, con patologías gástricas en pacientes chilenos. *Infection and Immunity*, 1994, p. 299-302, Vol. 62, No. 1.
79. **Dunn BE**, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10 (4): 720-741.
80. **Bilbao R.**, Pablo, Claros P., Maysa, DamianiM., Esther *et al.* Infección por *Helicobacter pylori*: Asociación a Patologías gástricas y Métodos de diagnóstico. *BIOFARBO*, dic. 2007, vol.15, no.1, p.51-54. ISSN 1813-536
81. **Cervantes Garcia E.** *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Rev Fac Med UNAM* 2006; 49: 163-1
82. **Coyle - López.** Manual de Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Departament of laboratory medicine nd microbiology. Organizavion Panamericana de la Salud. University of Washintong. 2000:5: 120- 133.
83. **Piccolomini R**, Di Bonaventura G, Gatamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E -test, agar dilution and broth dilution for susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997; 35 :1842-6.
84. **Malbrán C.** Manual de Procedimientos para la determinación de Sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. INEI – ANLIS. Argentina. 2001: 39-66.
85. **Alarcon T**, Baquero M, Domingo, López – Brea M,. Royo G *Rev. :Lo que se conoce sobre infección por H. pylori.* Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. 2004. Cap.17
86. **Blaser MJ.** Ecología de *Helicobacter pylori* en el estómago humano. *Clin J Invertir* 100:759-762, 1997.
87. **Goodman KJ**, Correa P. The transmisión of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 1995;24(5):875- 87.
88. **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.

89. **Garza González, E.** Giasi *González*¹, M. A. Martínez Vázquez. Revista Española de Enfermedades Digestivas-Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2005; 10: Supl. 1: 40-6.
90. **Koike T, Ohara S, Sekine H, et al.** *Helicobacter pylori* infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. *Gut* 2001; 49: 330–4.
91. **El-Serag HB, Sonnenberg A, Jamal MM, et al.** Corpus gastritis is protective against reflux oesophagitis. *Gut* 1999; 45: 181–5.
92. **Velazco CA.** Rev. 2005. Tratamiento de la infección por *H. pylori* asociada con gastritis en niños Colombia Médica. Vol. 36 N° 2 (Supl 1), 2005.
93. **Sjostrom, J.E., Larsson, H.** Factors affecting growth and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* effect of pH and urea on the survival of a wild type strain and a urease deficient mutant. *J Med Microbiol* 1996; 44: 425-433.
94. **Megraud F.** *H. pylori* resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
95. **Ballesteros Amozurrutia Ma:** Peptic ulcer and *Helicobacter pylori*. Results and consequences of its eradication. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65; 4:41-9
96. **Fox J G.** Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduce helicobacter-induced gastric atrophy *Nat Med* 2000; 6: 536 – 42
97. **Holcombe C.** *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut* 1992; 33: 429-31.
98. **Chey WD, Wong BCY and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.** *American College of Gastroenterology Guideline on the Management of Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-1820
99. **Kusters, J.G., van Vliet, A.H. & Kuipers, E.J.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol.Rev* . 2006: 19, 449-90.
100. **Chen LT, Lin JT, Tai JJ, et al.** Long-term results of anti-*Helicobacter pylori* therapy in early-stage gastric highgrade transformed MALT lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1345–5

101. **Malfertheiner** P, Mossner J, Fischbach W, et al. *Helicobacter pylori* eradication is beneficial in the treatment of functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:615
102. **Blum AL**, Talley NJ, O'Morain C, et al. Lack of effect of treating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* 1998;339:1875–81.
103. **Vaira D**, Menegatti, M., Landi, F., Ricci, C., Ali', A., Miglioli, M. *Helicobacter pylori* Eradication. *Ann Intern Med* 2007; 146:556-563:1-20
104. **Carter**, A.P., W. M. Clemmons, D.E. Brodersen, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, y V. Ramakrishnan. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature*. 2000 407:340–348.
105. **Goodman** KJ, Correa P. The transmisión of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 1995;24(5):875- 876
106. **Goodman** KJ, Correa P, Tengana HJ, Delany JP, Collazos T. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25(5):507-15.
107. **Arnold** L M, Sapir Y, Martin N. *Trans R Soc Lond B Biol Sci Philos*. Septiembre de 2008, 12; 363.
108. **Barnard**, F.M., y A. Maxwell. 2001. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GryA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:1994–2000
109. **Björkholm**, B., I. Nagaev, O.G. Berg, D. Hughes, y D.I. Andersson. 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* 287:1479–1482
110. **Gisbert JP**, Pajares JM. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina en España. Una revisión sistemática. *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 111-6.
111. **Garza E**, Giasi Gonzalez E, Martinez Vazquez MA, et al. *Helicobacter pylori* eradication and its relation to antibiotic resistance and CYP2C19 status. *Rev Esp Enferm Dig* .2007;99:71
112. **Chevalier**, J., J.-M. Pagès, y M. Malléa. *In vivo* modification of porin activity conferring antibiotic resistance to *Enterobacter*. 1999: 5: 53-61

113. **Breuer T**, Goodman, Malaty, Sudhop T, David Y. Graham. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93: 553-61.
114. **Megraud F**. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances. *J Clin Gastroenterol*, 2003;8: 13-20
115. **Lind, T.**, Megraud, F., Unge, P., Bayerdorffer, E., O'morain, C. ACH2 study: role of omeprazole with 1 –week tripe therapies. *Gastroenterology* 1999: 116:248-253
116. **Fakheri H**, Malekzadeh R, Merat S, Khatibian M, Fazel A, Alizadeh BZ, Massarrat S. Clarithromycin vs. furazolidone in quadruple therapy regimens for the treatment of *Helicobacter pylori* in a population with a high metronidazole resistance rate. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 411-4
117. **Blaser MJ**. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis* 1999;179(6):1523-1530.
118. **Moxon R**, Rappouli R, Bacterial pathogen genomics and vaccines. *British Med Bulletin* 2002; 62: 45-48.
119. **Suerbaum S**, Josenhans C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol Med Today* 1999; 5:32-39.
120. **Cohen, S.P.**, L. M. McMurry, y S.B. Levy. *marA* locus causes decreased expression of *OmpF* porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1988;170:5416–5422
121. **Darwin, C**. *Origin of Species and The Descent of Man* (Modern Library Reprint Edition) Random House, New York. 1955, 125-303.
122. **Taylor DN**, Parsonnet J. *Epidemiology and natural history of H pylori infections of the gastrointestinal tract*. In: Blaser MJ, Smith PF, Ravdin J, Greenberg H. and Guerrant RL (eds). New York: Raven Press, 1995; 551-564.
123. **Debets-Ossenkopp, YJ**, Brinkman AB, Kuipers EJ, JE-CM Grauls Vandenbroucke, y Kusters JG. *Microb Letter*. Mecanismo de resistencia a la claritromicina en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. 1996: 42 : 2749-2751.
124. **Björklm, B.,S** Sjölund P G. Falk, O.G. Berg, L. Engstrand, y D.I. Andersson. 2001. 98:14607–1461.

125. **Marschall B J.** Manejo del paciente con úlcera péptica en la era del *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12 (Supl 1):s36-s40.
126. **Glupczynski** et al. Abstract: 2107. *39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, San Francisco, 26 al 29 de septiembre de 1999.
127. **Sadian** et al. Abstract: 1257. *39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, San Francisco, 26 al 29 de septiembre de 1999
128. **Bioxeda D.** Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12: 1:41-7.
129. **Rev Cubana Aliment Nutr**,.2001;15:1:42-54.
130. **Katarzyna Dzierzanowska-** Fangrat, Elzbieta ozynek, Danuta Celinska Cedro,Danuta Dzierzarnowska. Primary resitance to clarithromycin strinas of *H. pylori* isolated from children in Poland. *Agents Chemother* **2005**, 49(8):3208-3216.
131. **Okamoto T**, Yoshiyama H, Nakazawa T, Park ID, Chang MW, Yanai H et al. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 849-56
132. **Dore MP**, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepúlveda AR. Amoxycillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 47-54.
133. **Han SR**, Bhakdi S, Maeurer MJ, Schneider T, Gehring S. Stable and unstable amoxycillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2740-1.
134. **Van Zwet AA**, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Thijs JC, Van der Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG et al. Stable amoxycillin in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998; 352: 1595
135. **WGO**. World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines: *Helicobacter Pylori* en los países en desarrollo. Septiembre del 2006.
136. **Martín de Argila C**, Boixeda de Miquel D, Gisbert JP. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*JR Prous SA, 1996; 75-91.
137. **Gómez-Rodríguez BJ**, Rojas-Feria M, García-Montes JM, Romero-Castro R, Hergueta-Delgado P, Pellicer-Bautista FJ, Herrerías JM Incidence and factors influencing on *Helicobacter pylori* infection recurrence. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004;96:9:620

138. **III° Simposio Internacional de Patología Gastroduodenal "Helicobacter pylori"**
Primer Consenso Argentino para su diagnóstico y
tratamiento.,2004.http://www.caded.org/helicobacter_pylori.htm.
139. **Salas** Aguilar, Erradicación de *Helicobacter pylori* mediante triple terapia en
C.Rica. Acta méd. Costarrica. 2003;.:45:2
140. **Ramírez** R.A, Pareja C. A, Leey C. J, Mendoza R.D. Helicobacter pylori en el
Perú. Editorial Santa Ana. 2003.
141. **Rodríguez** W, Tratamiento del Helicobacter Pylori con Omeprazol, Amoxicilina y
Claritromicina en esquemas de 7 y 10 días Rev. Gastroenterol. Perú. 2003; 23:
177-83
142. **Mislewick** JJ, Harris AW, Bardhanh KD, Levis, Morain C, Cooper BT et al. One
week triple therapy for Helicobacter pylori: a multicentre comparative
study.Tratamiento del HP con Omeprazol, Amoxicilina, Claritromicina 1 8 3 Gut
1997; 41:735-39
143. **De Boer** Wa, Tytgat GNJ. Regular new: Treatment of Helicobacter pylori
infection. BMJ 2000; 320:31-4.
144. **Soto G**, Bautista C, Roth DE, Gilman RH, Velapatiño B, Ogura M et al.
Helicobacter pylori Reinfection is Common in Peruvian Adults Following Successful
Antibiotic Eradication Therapy. Aceptado para publicación: *Journal of Infectious
Diseases*.
145. **Chiba N**, Hunt RH. Ulcer peptic and *Helicobacter pylori* infection: etiology and
teatment. En: McDonald J, Burroughs A, Feagan B, editors. Evidence Based
Gastroenterology and Hepatology. London: BMJ Books; 1999: 66-90.
146. **Tytgat** GN, Noach LA, Rauw EAT. Helicobacter pylori infection and duodenal
ulcer disease. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:1:127-39.
147. **Anselmi** S, Castillo V, Gonzalez K, Angel G, Medina Y, Lozada M.Academia
Biomédica Digital. Rev. Helicobacter pylori: Un Camino Al Cáncer. 2007: 32.
1317-987.
148. **Boixeda**, Delgado Iribarren, Rev. 2001 Principios Básicos de Antibiotepatria.
Universidad de Alcalá de Henares
149. **Alarcón** T, Domingo D, Lopez-Brea M Antibiotic resistance problems with
Helicobacter pylori. Int J Antimicrob Agents 1999; 12:19-26.
150. **Vega** AE, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Detection of clarithromycin-
resistant Helicobacter pylori in frozen gastric biopsies from pediatric patients by a

commercially available fluorescent in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:4: 421-3.

151. **Cammarota**, G., Martino, A., Pirozzi, G., Cianci, R., Branca, G. High efficacy of 1-week doxycycline- and amoxicillin-based quadruple regimen in a culture-guided, third-line treatment approach for *Helicobacter pylori* infection, *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 19:7: 789–795.
152. **Revista Española** de Enfermedades Digestivas *versión impresa* ISSN 2007:1130-0108; 992: 63-70.
153. **Branca** G, Spanu T, Cammarota G, Schito AM, Gasbarrini A, Gasbarrini GB, Fadda G. High levels of dual resistance to clarithromycin and metronidazole and *in vitro* activity of levofloxacin against *Helicobacter pylori* isolates from patients after failure of therapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2004.02.032
154. **Zhi-Qiang** Liu, Peng-Yuan Zheng, Ping-Chang Yang *World J Gastroenterol* 2008; 7; 14;33: 5217-5222.
155. **Gutiérrez O, Otero** W. *Helicobacter pylori* y resistencia al metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroent* 1998; 13: 31-3
156. **Trespalacios**, Ariza' Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* at the San Ignacio University Hospital in Bogota. *Acta Med Colomb.* 2008; 33:1.
157. **Gómez**, Cossio, Guerrero , Larraga. Densidad bacteriana (*Helicobacter pylori*) y respuesta inflamatoria del cardias, cuerpo y antro gástricos en pacientes con dispepsia. 2007;19:3: 262.
158. **Kohanteb**, A Bazargani, M Saberi-Firoozi- Indian Journal of 2010 Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* to selected agents by agar dilution method in Shiraz-Iran.2010;5:4:374-377.
159. **Shirin** H, Birkenfeld S, Shevah O, Levine A, Epstein J, Boaz M, et al. Application of Maastricht 2-2000 guidelines for the management of *Helicobacter pylori* among specialists and primary care physicians in Israel: are we missing the malignant potential of *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 322-5
160. **Nariman** F, Eftekhari F, Habibi Z, Falsafi T. Anti- *Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 2004; 9:146-51.
161. **Falsafi** T, Mobasheri F, Nariman F, Najafi M. Susceptibilities to different antibiotics of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients at the Pediatric Medical Center of Tehran, Iran. *J Clin Microbiol* 2004; 42 :387-9

162. **Megraud F**, Lehn N, Lind T et al. Antimicrobial susceptibility testing of *H pylori* in a large multicenter trial: the MACH2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(11):2747-2752.
163. **Pajares Garcia, R Pajares-Villarroya**. *Helicobacter pylori*: Antibiotic resistance- *Revista Española de Enf. Digest*, Vol. 99, N.º 2, pp. 63-70, 2007.
164. **Ortiz-Godoy A**, Ribeiro M, Borges Y, Vitiello L, Carvalho M. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterology* 2003; 3:4-6.
165. **Lang L, Garcia F**. Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of *Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 572-7.
166. **Alvarez A**, Moncayo JI, Santacruz JJ, Santacoloma M, Corredor LF, Reinoso E. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4022-4.
167. **Yepes CA**, Rodríguez A, Ruiz A, et al. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Med Colomb* 2008; 33(1): 11-14.
168. **Rodriguez**. Comparación de dos esquemas basados en pantoprazol para erradicación de *H. pylori* en pacientes con úlcera duodenal activa. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 1998; 63 –62: de la 67 a la 71.
169. **Toracchio S, L. Marzio**. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains. *Digestive and Liver Disease* 35.2003:541– 45.
170. **Jiang N**, Doyle P. Growth Supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:5: 1984–1987.
171. **Vallejos**, Toledo. *Rev: Resistencia antimicrobiana en Helicobacter pylori: Aspectos clínicos y moleculares* *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1313- 1320.
172. **Cole SP**, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 3124-3132
173. **Herrera Mendoza**. Nova, publicación científica SSN:2004: 2: 2 100-8

174. **Naik**, S. y RUCK, R. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33: 1614-1616
175. **Hardy**, D.J. Swanson RN, Rode RA, Marsh K, Shipkowitz NL, Clement JJ. Enhancement of the in vitro and in vivo activities of clarithromycin against *Haemophilus influenzae* by 14-hydroxy-clarithromycin, its major metabolite in humans. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(7):1407–1413. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#)
176. **Van Doorn** LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WGV, de Boer AW .Importance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA status for the efficacy antibiotic treatment. Gut 2000; 46; 321-326.10.
177. **Versalovic** J, Shortridge D, Kibler K, Griff MV, Beyer J, Flamm RK et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob agents chemother. 1996; 40: 477-80.
178. **Björkholm** Sjölund, P G. Falk, O.G. Berg L. Engstrand, and D.I. Andersson. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Science. 2001: 98:14607-12.
179. **Modley**, Harry, Mendez. Libro Línea *Helicobacter pylori*: Fisiología y Genética Cap Muta génesis del *Helicobacter pylori*. 2001.
180. **Hultén** K, Han, S.W., Enroth, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Evans, D.G., Engstrand, L., Graham, D.Y., and El-Zaatari, F. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. Gastroenterology, 1995; 110: 1031-1035.
181. **Kim Jung** M, Joo Sung KIM, ONUNG Jeon Kim, In Young Kim. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients. J Microbiol Biotechnol. 2008;18:9:1584-9.
182. **Castro 2009**, Rev. Esp. Enferm Dig 2009;101:11: 743-756.
183. **Kobayashi**, K Murakami, M Kato. Surveillance of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility reflecting the general population in Japan is limited. - Am Soc Microbiol Journal of clinical 2007
184. **Khan** R R y cols. 2004. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. Antimicrob Agents Chemother 48: 3567-3569.

185. **Zhuoqui** Liu, Gu: Guoshuang. Feng. Junling. Ma Cheng You_ DengD .Prevalence of fa243g mutation of h. pylori 23srna in Chinese with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology. 2008: 8:81.

186. **Marais**, L Monteiro, A Occhialini, M Pina, H Lamouliatte, F Mégraud. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens *Gut* 1999;44:463–467

187. **De F. Vincenzo**, et al, 2006. Clarithromycin resistance genotypes and eradication of *H. pylori*. *Ann Inter.Md.* 2006: 144:94-100.

188. **Cisneros S.** Trabajo de tesis de bacteriología: Mecanismos de resistencia de *H. pylori* a Amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol. Univ. Javeriana 2009. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis309.Pdf>

189. **Hernández** Power Mayrin, Reyes Z O, Rodríguez. B. Revisión: La resistencia a antibióticos en *H. pylori*. Temas actualizados 2009.

190. **Smith** SI, Oyedele KS, Arigbabu AO, Atimomo C, Coker AO. High amoxycillin resistance in *Helicobacter pylori* isolated from gastritis and peptic ulcer patients in western Nigeria. *J Gastroenterology* 2001; 36: 67-8.

191. **Okamoto** T, Yoshiyama H, Nakazawa T, Park ID, Chang MW, Yanai H et al. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 849-56.

192. **Rimbara** E, Noguchi N, Kawai N, Sasatsu M. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.2008;61, 995–998.

193. **Alekshun** y Levy s. Cell, re. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug resistance . V128:6:1037-1050, 23 March 2007.

194. **Eaves** D.J., V. Ricci, and L.J.V. Piddock. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004: 48:1145–1150.

195. **Linde** et al., 2000; Okusu e, Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, y N. Lehn. 2000. In vivo increased resistance to Ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1865–1868.

196. **Alekshun** y **Levy** s. Cell, re. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug resistance . 2007: 128:6:1037-1050, 23.
197. **HanS J**, L., F. Notka, M. Metze, B. Kochanowski, P. Heisig, y N. Lehn. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000:44:1865–1868.
198. **Chopra** I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, Molecular biology and epidemiology of bacterial. Microbiol. Mol. Biol. Rev.,2001: 65: 232-260.
199. **Li Dannelly** HK Inactivation of the putative tetracycline resistance gene HP1165 in *Helicobacter pylori* led to loss of inducible tetracycline resistance. Arch. Microbiol.,2006: 185: 255-262.
200. **Wu** JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY. Tetracycline-resistant clinical *H. pylori* isolates with and without mutations in *16rRNA*-encoding genes. Antimicrob. Agents. Chemother.,2005: 49: 578-58.
201. **Gerrits** M, Zoete, Arents N, Kuipers J, Kusters J. 16S rRNA Mutation-Mediated Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2002:46:9: 2996-300.
202. **Queiroz** D, Luzzza F. Rev. *Helicobacter* Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection 2006:11:1-15
203. **Giannini** EG, Bilardi C. *J Clin Gastroenterol*. 2006:40:6::515- 20
204. **Megraud** F. Corti R. Resistencia bacteriana del *H. pylori* en e mundo en el año 2009. Acta Gastro. Latinoam. 2009:39:4:282-90.
205. **Sicinschi** LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo MB, Romero-Gallo J, Bravo LE, Schneider B. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. Clinical Microbiology and infection 2009 [Epub ahead of print].
206. **Neri** M, Milano A, Laterza F, et al. Role of antibiotic sensitivity testing before first-line *Helicobacter pylori* eradication treatments. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 821-7.

207. **Madan E**, Kemp J, Westblom TU, Subik M, Sexton S. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7: 559-565.[Medline]
208. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement Methods*. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, M100-S17 . 2007: Vol 27 No1 Replaces M100S16 Vol 26 No 3. M7 MIC Pag. 134.
209. **Altman DG**. *Practical statistics for medical research*. New York: Chapman and Hall; 1991.
210. **Hernández T**. Helicobacter pylori: la bacteria que mas infecta al ser humano. Rev Cubana Aliment Nutr 2001; 15:42-54.
211. **Graham DY**, Lu H, Yamaoka Y. A report to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* 2007; 12: 275-8.7
212. **Lam SK**. Etiology and pathogenesis of peptic ulcer: J Gastroenterol.1994; 29: 7:39-54.
213. **Gutiérrez O**, Otero W, Cardona H. Terapia cuádruple con furazolidona como tratamiento de rescate para la infección por Helicobacter pylori. Rev Col Gastroenterol 2003; 18: 222-8.
214. **Gomollon F**. Valdeperezj, garuz R. Fuentes J. Barrera F. mallo J Análisis de costo- efectividad de 2 estrategias de erradicación de *H. pylori*: Resultados de un estudio aleatorizado y prospectivo en cuidado primario. Med. Clin (Barc) 2000; 115: 1-6.
215. **Oladipo Aboderin**, Abdul R. Abdu, Babatunde Wumi Odetoyin, Iruka N. Okeke, , Oladejo O. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. African Health Sciences.2007:7:3.
216. **Henao SC**, Otero, Ángel LA, et al. Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *H. pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. Rev Col Gastroenterol 2009; 24:1: 10-15.
217. **Duck WM**, Sobel J, Bruckner JM. Antimicrobial resistance, incidence and risk factors among *Helicobacter pylori* infected persons, in the United States. Emerg Infect Dis.2004; 10: 1088-94.

218. **Fariña** N, Kasamatsu E, Samudio M, Morán M, Sanabria R, Laspina F. Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal. *Rev Med Chile* 2007; 135:1009-1014.
219. **Howden CW**, Hunt RH. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori*. Ad Hoc Committee on practice parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2330-8.
220. **Vakil** N, Megraud F. Eradication therapy for *H. pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-100
221. **Broutet**, N., Tchangoué, S., Pereira, E., Mégraud, F. *Risk factors for failure of Helicobacter pylori eradication therapy*. En: Hunt, R.H., Tytgat, G.N.J. (Eds.). *Helicobacter pylori: Basic mechanisms to clinical cure* 2000
222. **Kluwer** Academic Publishers and Axcan Pharma, The Netherlands 2000; 601-607.
223. **Fuccio** L, Laterza L, Zagari RM, Cennamo V, Grilli D, Bazzoli F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2008; 337: 746-750
224. **Van Den Hazel**, H., M.C. Kielland-Brandt, and J.R. Winther. Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*. 1996: 12:1-16.
225. **Mégraud** F y Lehours P. *Helicobacter pylori*. Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*; 2007; 20; 2: 280–322.

TABLAS

Tabla. No1. Prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia.

Fuente: Bravo y col. *Helicobacter pylori*: Patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Médica 2003. Vol 34. No 3.

Autor	Ciudad	Método diagnóstico	Edad (años)	Positivo /Total	% positivos
Cortés, <i>et al</i>	Cali 1987	Histología y cultivo	2-60	173/244	72.2
Carmona, <i>et al</i> . Citado por García, <i>et al</i> .	Cali 1988	Histología y cultivo	-	109/135	80.7
García, <i>et al</i> .	Medellín 1989	Histología y cultivo	-	110/164	67.1
Uribe, <i>et al</i> .	Bogotá 1989	Histología y cultivo y ureasa rápida	15-60	66/69	69.7
Citado por García, <i>et al</i> .	Bogotá 1989	Histología	15-60	47/68	69.1
Citado por García, <i>et al</i> .	Pasto 1989	Histología, ureasa rápida	>18	53/62	85.5
Correa, <i>et al</i> .	Pasto 1989	Serología (IgG ELISA)	Adultos	49/53	93.0
Correa, <i>et al</i> .	Cali 1989	Histología	-	-	-
		Serología (IgG ELISA)	Adultos	22/35	63.0
Citado por García, <i>et al</i> .	Bogotá 1990	Histología	-	75/90	81.1
Citado por García, <i>et al</i> .	Cartagena 1990	Histología, cultivo ureasa	-	54/54	100.0
Citado por García, <i>et al</i> .	Bogotá 1990	Histología, cultivo método de agar-urea	-	62/64	96.9
Uribe, <i>et al</i> .	Medellín 1991	Histología	56-75	1/30	3.3
Solorsa, <i>et al</i> .	Popayán 1991	Histología 16-70	-	18/60	30.0
Gutiérrez, <i>et al</i> .	Bogotá 1991	Histología	Adultos	¿/30	-
Vargas, <i>et al</i> .	San Gil 1992	Cultivo	>40	24/50	48.0
García, <i>et al</i> .	Cartagena 1994	Cultivo e histología	22/79	63/90	70.0
Arbeláez, <i>et al</i> .	Bogotá 1994	Histología y ureasa rápida	Adultos	10/18	60.0
Gutiérrez, <i>et al</i> .	Bogotá 1996	Histología y ureasa rápida	12-50	60/60	100.0
Campuzano, <i>et al</i> .	Bogotá 1996	Serología IgG	1-10	22/50	44.0
Alvarado, <i>et al</i> .	1996, Cinco comunidades indígenas; Meta,	Agglutinación látex	15-60	30/49	61.2
Arango, <i>et al</i> .	Vichada, Guainía y Bogotá y poblaciones aledañas incluyendo poblaciones de Boyacá Aldana, Nariño, 1996	Ureasa rápida	Adultos	855/878	97.4
Goodman, <i>et al</i> .		Prueba de aliento ¹³ C-Urea	2-9	472/684	69

**Tabla. No. 2. Categorías diagnósticas según ciudad de procedencia.
Hospitales de Colombia 1997.**

Ciudad	n	Normal (%)	Gastritis			Cáncer (%)	Úlcera (%)	Prevalencia <i>H. pylori</i> (%)
			No atrófica (%)	Atrófica multifocal (%)	NOS (%)			
Cali	1.392	3.3	67.3	15.2	3.2	8.0	3.0	63.1
Pasto	1.545	0.9	50.1	40.5	1.5	4.7	2.3	41.7
Popayán	1.350	0.2	19.1	68.4	2.5	7.8	1.9	86.5
Medellín	494	1.4	20.9	11.5	41.3	13.2	11.7	65.0
Armenia	254		18.5	13.8	34.6	15.4	17.7	80.6
Manizales	438	0.9	13.2	65.3	10.5	9.8	0.2	85.5
Neiva	148		26.4	6.1	29.7	24.3	13.5	84.0
Ibagué	207		40.1	22.7	4.8	30.9	1.4	59.5
Bogotá	866	0.7	27.9	21.7	29.8	9.9	9.9	74.4
Tunja	494		16.2	25.7	50.2	6.3	1.6	99.1
Villavicencio	44		22.7	4.5	29.5	27.3	15.9	*
Cúcuta	227	1.3	32.6	14.5	5.3	24.7	21.6	*
Barranquilla	749	4.3	32.0	5.9	51.8	4.5	1.5	63.7
Cartagena	138	0.7	6.5	7.2	47.8	16.7	21.0	70.6
Montería	215	0.5	78.6	2.3	6.5	0.7	5.1	56.9
Sincalejo	91	1.1	30.8	18.7	31.9	8.8	8.8	82.9
Total	8.652	1.4	36.4	30.3	17.6	9.3	5.1	69.1

Fuente: Bravo y col. *Helicobacter pylori*: Patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colombia Médica 2003. Vol 34. No 3.

Tabla No 3. Comparación de métodos diagnósticos de microbiología de Epsilómetro (E- test) y Dilución en agar.

País	Autor	S (IC 95%)	E (IC 95%)	VPP	VPN
Canadá	Best et al.,2003	100	100	100	100
Polonia	Dzietzonawaka et al.,2001	100	100	100	100
Bangladesh	Khan Rase let al.,2004	100	100	100	100
Francia	Megraud et al 1999	100	100	100	100
E.U.A	Osato et al.,2001	98.4	98.3	95.5	97.5
Italia	Piccolomini et al.,1997	100	100	100	100
Hong Kong	Wang et al 2000	100	100	100	100

S:sensibilidad **E:** especificidad **VPP:** valor predictivo positivo **VPN:** valor predictivo negativo

N: No hay dato

Tabla 4. Factores que afectan la eficacia terapéutica de los tratamientos de erradicación de la infección de *H. pylori*

Factores del hospedero

- ❖ Adherencia (*Megraud et cols, 2003*).
- ❖ Pronta reinfección o recurrencia de *H. pylori*
- ❖ Uso de inhibidores de bomba de protones I.B.P.
- ❖ Gradiente de pH en mucosa gástrica (↓ pH poca eficacia)
- ❖ Patrones de resistencia locales en la población
- ❖ Relación prescripciones antibióticos /resistencias
(*Magee et al, BMJ, 1999*)

Factores de *H. pylori*

- ❖ Diversidad genética de cepas: Infección indefinida.
- ❖ Virulencia de las cepas infectantes (*Azuma et al., 2004*)
- ❖ 20% de bacterias en fase estacionaria (adheridas mucosa gástrica).
- ❖ Mecanismos de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos.

Tabla 5. Esquemas de tratamiento anti *H. pylori*.

	Régimen	Dosis	Duración	Erradicación (%)
Pauta triple clásica:	Tetraciclina + Metronidazol + Bismuto Subsalicilato	500 mg/6h 400 mg/6h 120 mg/6h	2 semanas	85
Pauta doble:	Claritromicina + Omeprazol	500 mg/8h 40 mg/24 h	2 semanas	74
	o Claritromicina + Ranitidina-Bismuto Citrato	500 mg/8h 400 mg/12h	2 semanas	82
Pauta triple:	Metronidazol o Amoxicilina + Claritromicina + Omeprazol	400 mg/12h 1 g/12h 500 mg/12h 20 mg/12h	1 semana	90
	Ranitidina-Bismuto Citrato + Claritromicina + Amoxicilina	400 mg/12h 500 mg/12h 1 g/12h	2 semanas	90

Fuente: Pautas terapéuticas de *H. pylori* (Maastricht 2006; Dunn *et al.*1997).

Tabla 6. Esquema de tratamiento anti *H. pylori* de tercera línea

1) ESQUEMA CON LEVOFLOXACINA*		
IBP Levofloxacina 500 mg. Amoxicilina 1000 mg.	b.i.d. Día b.i.d.	10 días
2) TRATAMIENTO SECUENCIAL POR 10 DIAS		
5 días	IBP b.i.d. + Amoxi 1 gm b.i.d. IBP b.i.d. + Claritro 500 mg b.i.d. + Tinidazol 500 mg b.i.d.	
5 días	IBP b.i.d. + Amoxi 1 gm b.i.d. + Furazolidona 200 mg b.i.d. IBP b.i.d. + Tetra 1 gm b.i.d. + Bis b.i.d.	

Fuente: Ramirez R, Sánchez S. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 - 2008): Epidemiología, Microbiología Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento, Perú 2009).

Tabla 7. Resistencia mundial de *H. pylori* a claritromicina y amoxicilina.

País	Autores	ClaR	AmxR
Norte América			
Alaska	Parkinson et al, AJ. Gut 1999; 45 (suppl 111): A15	26,3	ND
USA	Laine et al, Am J Gastroenterol, 2000;95:3393–8.	10,6	0,1
USA	Duk, Gold B et al., Emerging Infectious Diseases: 2004; 10: 1008-94	12	0,9
USA	Mégraud et al. Gut 2004;53:1374–1384 .	12,2	ND
Canadá	Fallone, C. A. Can J Gastroenterol 2000;14, 879–882.	12	0
México	Torres et al, J of Clin Microbiol 2001; 39: 2677-2680.	24	ND
Centro América			
Costa Rica	Riva F et al. Rev Med Panamá 2000; 25: 19-23.	6	ND
Costa Rica	Bosques et al, Medicina Universitaria Costa Rica: 2001:3: 124-7.	ND	51,2
Jamaica	Lee et al, Indian Med J 2004; 53: 374-377.	8	ND
Sur América			
Brasil	Prazeres-Magalhães.,Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2021–3.	9,8	29
Brasil	Ortiz G et al. BCM Gastroenterol.2003;3:1-6	16	38
Brasil	Vallejos et al, Medica de Chile. 2007;135:287-93	7	ND
Venezuela	Urrestarazu M et al. Rev. Soc. Ven. Microbiolo. 2003;23:14-15	7	0
Colombia	Yepes et al, Act Medica Colombia; 2008; 33:1:11-14	63,1	9,5
Colombia	Henao S et al.2009 Asoc Col Gastroent Endosc. Digest, Coloproctol y Hepatología	15	ND
Colombia	Trespacios et al, 2010, Asoc Col Gastroent Endosc. Digest, Coloproctol y Hepatología	17,7	3,8
Colombia	Álvarez ET L,Rev Méd Chile 2009; 137: 1309-1314	3,8	0
Ecuador	Debets et al, Journal of Antimicrobial Chemotherapy;2003: 51, 141–145	9,5	0
Perú	Vásquez A. J Clin Microbiol 1996; 34: 1232-1234	50	0
Chile	Vallejos et al, Rev. Medica de Chile. 2007;135:287-93	20	ND
Paraguay	Fariña et al, Rev. Med de Chile; 2007:135:1009-14	2,2	2,2
Uruguay	Cohen.,2008	12	0
Argentina	Vega y cols.,2010. International Journal of Infectious Diseases (2010) 1–8	24	0
Europa			
España	López-Brea M et al. J Antimicrob Chemother 2001;48:295–7.	21,1	0
Francia	Birac C. Gut 1999; 45 (suppl 111): A107	15,8	0
Bélgica	Bontems P et al. Pediatr Infect Dis J 2001;20:1033–8.	16	0
Francia	Birac C. Gut 1999; 45 (suppl 111): A107	15,8	0
Portugal	Cabrita et al, J Antimicrob Chemother 2000;46:1029–31.	22	0
Austria	Crone J et al. Gastroenterol Nutr 2003;36:368–71.	20,3	0
Bulgaria	Fochesatto et al., Revista de Postgrado Catedra Medicina;2004:138:11-17	11,4	0
Alemania	Dammann et al. Korean J Gastroenterol 2004; 44: 126-135.	4,4	ND
Suecia	Storskurubb y cols	3	0
Italia (norte)	Pilotto et al. Dig Liver Dis 2000;32:763–8.	1,8	0
Italia (central)	Toracchio et al, 2002. Dig Liver Dis 2003;35:541–5.	23,5	0,2
Italia	Romano et al., 2008 J Clin Pathol 2008;61:1112-1115.	18	0
Bulgaria	Boyanova et al, Journal of Medical Microb. 2006;55:65-68	12,5	1,5
Polonia	Dzierzanowska-Fangrat K,Int J Antimicrob Agents 2001;18:387–90.	23,5	ND
Asia			
Irán	Kohanteb et al. IndianJ M Microbiology. 2007: 25: 374-7	20,8	9,4
Japón	Kato et al, Antimicrob Agents Chemother 2000;44: 2214–16.	12,9	0
Japón	Kobayashi I et al.2005. J of Clin Microbiol 2007; 45:4006-10	27,7	ND
Corea	Kim et al, J Antimicrob Chemother 2001;47:459–61.	5,9	0
Corea	Kim, J.M. et al.Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 2004: p4843–4847	13,8	18,5
China	Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología 2010: 0-4.	28	3
India	Datta et al.,Aliment Pharmacol Ther 2005;22:51-7.	44,7	32,8
Malasia	Khean-Lee et al Helicobacter 2011; 16:3:241-5	0	0
África			
Nigeria	Aboderin et al, Afr Health Sci. 2007; 3:143-7	100	100
Nigeria	Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología 2010:Pagina 10-4	13	0
Oceanía			
Australia	Alarcón et al. Rev Esp Quimioterap,2002;15: 4: 341-5	11	ND
N. Zelanda	Fraser et al,Aust N Z J Med.1999;29:512–16.	6,8	ND

ClaR: Prevalencia de resistencia a claritromicina. AmxR: Prevalencia de resistencia a amoxicilina. ND: No determinado.

Tabla 8. Genes involucrados en mutaciones puntuales relacionados con resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Mecanismo de Resistencia
Metronidazol	Daño al ADN	↓ Reducción de Imidazol Mutación gen <i>rdxA</i>
Claritromicina	Inhibición de síntesis proteica (rRNA 23S)	Mutaciones gen <i>23S rRNA</i>
Amoxicilina	Inhibición de división celular (PBP)	↓ Permeabilidad membranal, mutación gen <i>pbp1A</i> Betalactamasas
Tetraciclina	Bloquea unión del aminoacil-tRNA	↓ Permeabilidad membranal, mutación gen <i>16S rRNA</i>

Fuente: Megraud y Lehour. *CLINICAL MICROBIOLOGY REV*, Apr. 2007, p. 280 – 322.

Tabla 9 Promedios de Prevalencia de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en el Mundo

Continente	Mtz (%)	Cla (%)	Amx (%)	Lev (%)
América del Norte	44.62	17.9	1.15	-
América del Sur	83.82	24.88	25.28	-
Europa	32.44	12.45	4.93	11.8
Asia	40.53	19.5	26.1	13.42
África	80	13	-	80

Tabla 10 Concentraciones de los antibióticos amoxicilina y claritromicina usadas en el método de dilución en agar.

Concentración de Antibiótico [μg /ml]	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
Volúmen en μl de la solución de trabajo con [$1\mu\text{g}$ /ml] de cada antibiótico.	12.5	25	50	100	200

Tabla 11 Condiciones recomendadas para el método de dilución en agar según Estándares americanos y europeos

Método	CLSI EUA	Grupo Europeo para el Estudio de <i>H. pylori</i>
Medio	Mueller Hintoncn 5% de sangre de cordero envejecida por 2 semanas.	Mueller Hintoncn 10 % de sangre de caballo .
Inóculo	Turbidez según Mc Farland 2 (1×10^7 - 1×10^8 UFC/ ml), a partir de cultivos de dos días.	Turbidez según Mc Farland 4 (0.5×10^9 - 1×10^9 UFC/ ml) a partir de cultivos de dos días.
Incubación	Atmósfera microaerofílica 35 °C	Atmósfera microaerofílica 37 °C
Lectura	a los 3 días	a los 3 días
Cepa (s) Control	ATCC 43504 de <i>H. pylori</i>	CCUG 38770, CCUG 38771 y CCUG 38772 de <i>H. pylori</i> .
Antibióticos	Amoxiclin, claritromicina, metronidazol y tetraciclina	Amoxiclin, claritromicina y metronidazol

Tabla 12 Prevalencia de resistencia de *H. pylori* a Claritromicina en el Mundo

País	Autor	Método CIM	% Cla
Italia (norte)	Pilott et al	Epsilometro	1,8
Alemania	Damman et al;Walle et al 2008	Epsilometro	2,2 - 4
Israel	Samra et al	Epsilometro	8,2
E.U.A	Graham et al,. 1998; Ossato et al: Laine et al.	D. Agar	7, 10,6 y 12,2
México	Garza G et al, 2007	Epsilometro	11,1
Francia	Foshesato et al.,2004, Megraud 2004	D. Agar	15 -21
Brasil	Duk, Gold B et al,. 2004; Otiz et al,.2003	D. Agar	18 -22
Italia	Aboderin et al.,2007, Zulo y cols 2004	Epsilometro	19.1
Italia (central)	Toracchio et al	D. Agar	23,4
Uruguay	Torres et al, 2009	Epsilometro	12.2 y 19.4
Chile	Vallejos CM, G: 2007	Epsilometro	.20
Portugal	Cabrito	Epsilometro	22
Italia	Foshesato et al.,2004	Epsilometro	23.4
México	Torres et al, 2001	D. Agar	25
Alaska	Foshesato et al.,2004	D. Agar	26.3
Argentina	Stege PW, Vega AE. 2006; Vega y cols,.2010	Epsilometro	24 – 27
Italia	Romano et al,. 2008	Epsilometro	41.3
Polonia	Ziemniak et al.,2006	Epsilometro	48.6
Perú	Vásquez (1996),Foshesato et al.,2004 Bosque et al,.2001	Epsilometro	50 – 61
Colombia	Yepes y cols,. 2008	Epsilometro	63.1
India	Vallejos et al.,2003, Datta et al,. 2006	Epsilometro	73-80
Israel	Samra et al	Epsilometro	8,2
Nigeria	Oladipo y cols, 2007	D.Discos	100
Bulgaria	Boyanova et al. 2009	D. Agar	18,4
Nigeria	Oladipo y cols, 2007	D.Discos	100

Tabla 13. Tabla de interpretación de la concordancia.

Valor de <i>kappa</i>	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Fuente: **Altman** DG. *Practical statistics for medical research*. New York: Chapman and Hall; 1991.

Tabla No.14 Relación entre características demográficas, histopatología, control con UBT y aislamiento de *H. pylori* por cultivo.

Características de vivienda	Histopatología		p	Control UBT seis		p	Cultivo		p
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Hacinamiento									
≤ 3 persona/cuarto	20/203	135/203	0.15	98/168	27/168	0.55	28/203	127/203	0.04
> 3 persona/cuarto	2/203	42/203		33/168	7/168		2/203	42/203	
Sin dato	1/203	3/203		2/168	1/168		1/203	3/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Material casa									
Cemento	10/203	62/203	0.53	51/168	8/168	0.18	12/203	60/203	0.20
Baldosa	4/203	21/203		13/168	7/168		5/203	20/203	
Madera	9/203	92/203		65/168	19/168		12/203	89/203	
Sin dato	0/203	5/203		4/168	1/168		2/203	3/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Agua en tubo									
Dentro de vivienda	6/203	49/203	0.67	36/168	8/168	0.58	8/203	47/203	0.40
Fuera de vivienda	16/203	124/203		93/168	25/168		21/203	119/203	
Llave pública	0/203	3/203		2/168	1/168		0/203	3/203	
No dispone	1/203	2/203		1/168	1/168		1/203	2/203	
Sin dato	0/203	2/203		1/168	0/168		1/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Origen de agua									
Acueducto	21/203	175/203	0.18	129/168	34/168	0.27	28/203	168/203	0.07
Pozo	0/203	2/203		2/168	0/168		0/203	2/203	
Otro	1/203	1/203		0/168	1/168		1/203	1/203	
Sin dato	1/203	2/203		2/168	0/168		2/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Drenaje de la casa									
Conectado a calle	4/203	43/203	0.23	35/168	6/168	0.47	6/203	41/203	0.45
Conectado pozo	14/203	91/203		65/168	21/168		19/203	86/203	
Desague de río	1/203	29/203		21/168	4/168		2/203	28/203	
No tiene	3/203	15/203		11/168	3/168		4/203	14/203	
No sabe	1/203	2/203		1/168	1/168		0/203	3/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Estufa de gas									
No tiene	3/203	33/203	0.38	20/168	9/168	0.14	4/203	32/203	0.61
Tiene	20/203	147/203		113/168	26/168		27/203	140/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Nevera									
No tiene	8/203	42/203	0.17	34/168	3/168	0.04	8/203	42/203	0.82
Tiene	15/203	138/203		99/168	32/168		23/203	130/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	
Calentador									
No tiene	23/203	175/203	0.54	130/168	34/168	0.61	31/203	167/203	1.00
Tiene	0/203	5/203		3/168	1/168		0/203	5/203	
Total	23/203	180/203		133/203	35/203		31/203	172/203	

Tabla No.15. Relación entre factores de exposición y histopatología, control UBT seis semanas, cultivo y resistencia antrimicrobial

Factores de exposicion	Histopatologia		p	UBT seis semanas		p	Cultivo		p
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Ha fumado tabaco									
Si	9/203	59/203	0.7	46/168	8/168	0.1	10/203	58/203	1.0
No	14/203	120/203		87/168	27/168		21/203	113/203	
Sin dato	0/203	1/203					0/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	
Fuma ahora tabaco									
Si	1/203	22/203	0.5	19/168	1/168	0.1	3/203	20/203	1.0
No	22/203	157/203		113/168	34/168		28/203	151/203	
Sin dato	0/203	1/203		1/168	0/168		0/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	
Expuesto al tabaco									
Si	4/203	58/203	0.0	44/168	11/168	0.5	5/203	57/203	0.1
No	18/203	122/203		89/168	24/168		26/203	114/203	
Sin dato	1/203	0/203		133/168	35/168		0/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	
Consumo del alcohol									
No consume	13/203	110/203	0.6	85/168	19/168	0.4	19/203	104/203	0.5
≤3 dias/semana de consumo	9/203	60/203		40/168	15/168		10/203	59/203	
>3 dias/semana de consumo	0/203	6/203		4/168	1/168		2/203	4/203	
Sin dato	1/203	4/203		4/168	0		0/203	5/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	
Adicional sal a la comida									
Siempre	0/203	2/203	0.0	2/168	0/168	0.4	0/203	2/203	0.2
Casi siempre	2/203	1/203		1/168	0/168		1/203	2/203	
Algunas veces	3/203	26/203		19/168	3/168		6/203	23/203	
Nunca	17/203	150/203		111/168	31/168		23/203	144/203	
Sin dato	1/203	1/203		0/168	1/168		1/203	1/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	
Consumo de sal									
Bajo	10/203	64/203	0.2	49/168	13/168	0.6	11/203	63/203	0.5
Medio	10/203	104/203		77/168	19/168		16/203	98/203	
Alto	3/203	12/203		7/168	3/168		4/203	11/203	
Total	23/203	180/203		133/168	35/168		31/203	172/203	

Tabla No.16 Prevalencia de *H. pylori* según diagnóstico histológico y género en pacientes de Tumaco.

Diagnóstico histopatológico	Prevalencia de <i>H. pylori</i> %				
	Hombres		Mujeres		
	n	%	n	%	
Gástritis No atrófica	41	90.2	123	87.0	87.8
Gástritis atrófica sin metaplasia	6	83.3	8	100	92.9
Gástritis atrófica con metaplasia	10	80	14	100	91.7
	57	87.7	146	89.0	88.7

Gastritis no especificada = 1 caso

Tabla No.17 Aislamiento de *H. pylori* obtenido en cultivo a partir de biopsias gástricas provenientes de pacientes con gastritis crónica de Tumaco.

	n (%)	Sitio anatómico		Frec (%)
Crecimiento	172 (84.7)	Antro:		
		134 (77.9)	C. Menor	98 (56.9)
			C. Mayor	36 (20.9)
		38 (22.1)	Cuerpo gástrico	38 (22.1)

Tabla 18 Calidad de los aislados de *H. pylori* obtenidos en cultivos a partir de biopsias gástricas provenientes de Tumaco.

Calidad de crecimiento			Frecuencia %
Escaso	Moderado Abundante		
168 (98)	2 (1)	2 (1)	172 (100)

Tabla 19. Frecuencia de crecimiento por días de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco

Día	Frec (%)	Frec acum (%)
10	47 (12.9)	47 (12.9)
9	36 (10)	83 (22.9)
8	42 (11.5)	125 (34.4)
7	34 (9.2)	159 (43.6)
6	51 (14)	210 (57.6)
5	60 (16.5)	270 (74.1)
4	43 (12)	313 (86.1)
3	49 (13,4)	362 (99.5)
2	2 (0,5)	364 (100)
n (%)	364	364 (100)

Tabla 20. Frecuencia de contaminación observada en cultivos durante aislamiento de *H pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco

Día	Frec (%)	Frec. Acum (%)
2	1 (1.6)	1 (1.6)
3	3 (4.7)	4 (6.3)
5	2 (3.1)	6 (9.4)
6	25 (39.1)	31 (48.5)
7	4 (6.3)	35 (54.8)
8	8 (12.5)	43 (67.3)
9	1 (1.6)	44 (68.9)
10	20 (31.3)	64 (100)
n (%)	64 (100)	64 (100)

Tabla 21 Prevalencia de *Helicobacter pylori* según método diagnóstico

Fragmento gástrico	Histología		Cultivo	
	N	%	n	%
Antro curvatura menor	195	87.2	202	48.51
Antro curvatura mayor	196	84.7	203	43.35
Cuerpo gástrico	201	88.1	199	53.26
Antro curvatura menor- mayor	203	85.7	203	66.01
Antro curvatura menor-cuerpo	203	88.7	203	74.38
Antro curvatura mayor –cuerpo	203	88.7	203	74.38
Antro curvatura menor-mayor- cuerpo	203	88.7	203	84.73

Tabla 22 Prevalencia de *H. pylori* según método diagnóstico número y fragmento gástrico

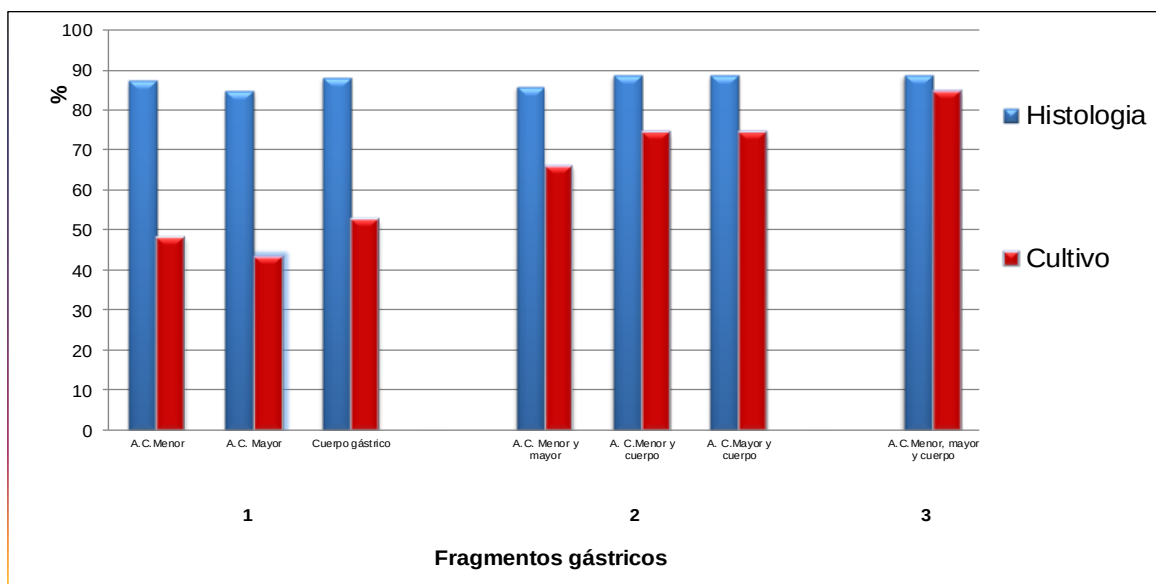


Tabla No. 23 Frecuencia relativa y acumulada de resistencia de aislados de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenidos a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco

Susceptibilidad de <i>H. pylori</i> a Amx		
C.I.M.	frec. Rel. %	frec.(%)acum
<0.25	75 (51.37)	75 (51.37)
0,25	26 (17.81)	101(69.18)
0,5	15 (10.27)	116 (79.45)
1	18 (12.33)	134 (91.78)
2	8 (5.48)	142(97.26)
4	3 (2.05)	145 (99.32)
>4	1 (0.68)	146 (100.00)
Susceptibilidad de <i>H. pylori</i> a Cla		
C.I.M.	frec. Rel. %	frec.(%)acum
<0.25	78 (53.42)	78(53.42)
0,25	22 (15.07)	100(68.49)
0,5	17 (11.64)	117(80.14)
1	13 (8.9)	130(89.04)
2	7 (4.76)	137(93.84)
4	5(3.42)	142(97.26)
>4	4 (2.74)	146(100.00)

Tabla No. 24 Frecuencia de resistencia de aislados de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenidos a partir de biopsias gástricas de pacientes provenientes de Tumaco.

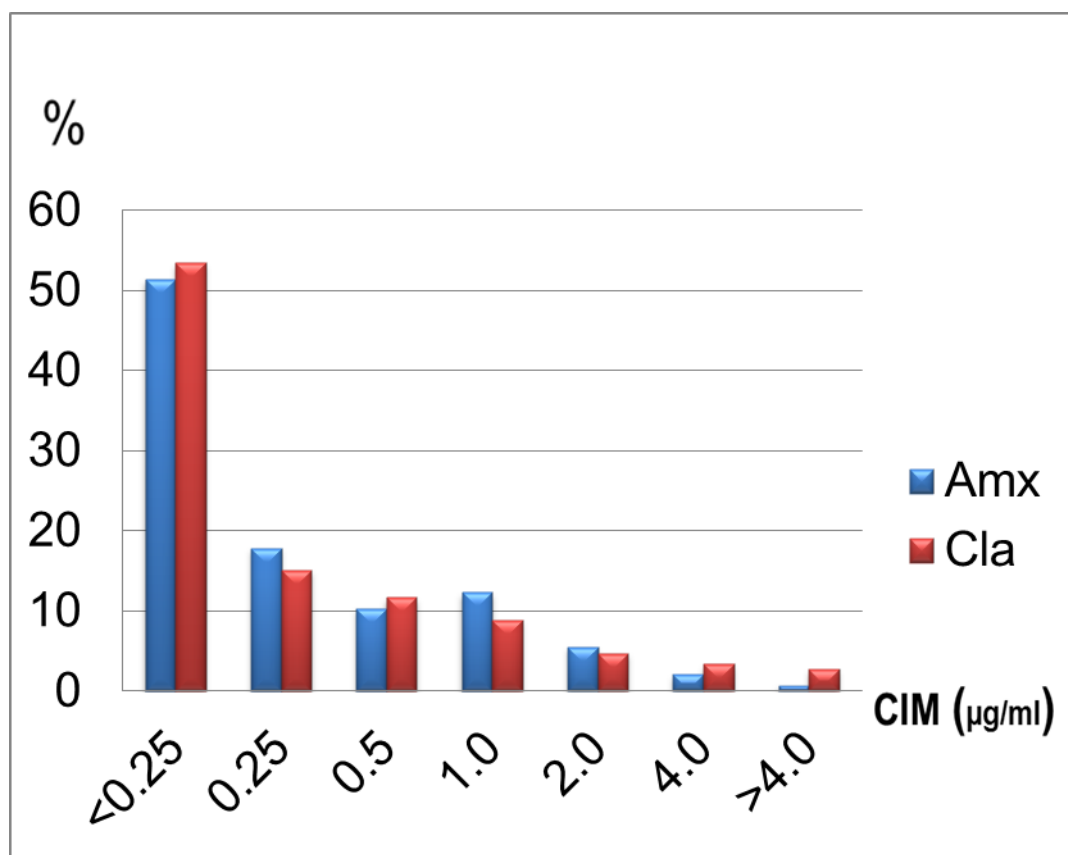


Tabla No. 25 Relación entre datos demográficos y resistencia de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina

Edad	Antimicrobiano			
	n	Amx (%)	n	Cla (%)
19-35	12	24.0	9	18.0
36-47	8	16.7	11	22.9
48-68	11	22.9	11	22.9
Género				
Masculino	11	24.4	10	22.2
Femenino	20	19.8	21	20.8

Tabla 26. Relación entre datos demográficos y prueba en aliento obtenida en pacientes post tratamiento triple administrado según Consenso de Maastricht III.

	Eficacia OCA	
	n	%
Edad (años)		
[19-35]	54	85.2
[36-47]	57	75.5
[48-68]	52	78.9
Género		
Masculino	49	85.7
Femenino	114	77.2
Eficacia global	163	79.8

Tabla 27. Cálculo de concordancia entre resultados de resistencia de *Helicobacter pylori* a amoxicilina *in vitro* e *in vivo*

	<u>Concordancia</u>		<i>Kappa</i>
	<u>Obtenida</u>	<u>Esperada</u>	
Resistencia Amx/ Eficacia	65.38%	66.62%	- 0.037
Resistencia Cla/ Eficacia	65.38%	66.62%	- 0.037

Tabla 28. Concordancia entre resultados obtenidos *in vitro* de resistencia de *H. pylori* e *in vivo* con prueba en aliento.

Resultado <i>in vivo</i>	n	Resistencia <i>in vitro</i>	
		Amx (%)	Cla (%)
Eficacia (n:104)	80%	23	23
Fracaso (n: 26)	20%	19	19

Tabla 29. Eficacia terapéutica del esquema OCA 2 en obtenida en diferentes países del mundo.

País	Autor	%Eficacia OCA2
Canadá	Lind T et al. MACH 1, 1996	78
Colombia	Bravo – Cortés 2011 (por publicar)	79.8
España	Gistbert et al, 2005	82.5
C. Rica	Salas et al,. 2003	84.7
Croacia	Bago et al,.2002	85
Chile	Riquelme et al.2007	88
Francia	Megraud et al. MACH 2, 1999	88.9
Argentina	Antelo et al,.2001	82.8
Turquía	Sancar et al,. 2006	90
Japón	Unge et al,.2003	93
Suecia	Megraud et al. MACH 2, 1999	97

LISTA DE ANEXOS

Anexo No. 1: Encuesta sociodemográfica realizada a participantes del trabajo de investigación "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica" realizada en el Hospital San Andrés de Tumaco.

Anexo No.2. Procedimiento de Operación Estandar para Toma de endoscopias en adultos.

Anexo No 3: Protocolo para la determinación de la concentración Mínima Inhibitoria. Mediante el método de Dilución en Agar.

Anexo No 4. Protocolo de preparación de solución de trabajo con antibióticos amoxicilina y claritromicina.

Anexo No 5. Formato de registro de cultivos para aislamiento de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas.

Anexo No 6. Aval de Ética Humana otorgada por el Comité de Ética Humana de La Universidad del Valle (CIREH).

Anexo No.7. Certificado de participación como ponente en el Congreso Nacional de Ciencias Biológicas con la presentación de ponencia titulada "**Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica**". Popayán, Octubre 2009.

Anexo No. 8. Constancia de inscripción de **Poster presentado en la Semana de Enfermedad Digestiva, DDW, 2009** "Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with Chronic Gastritis", New Orleans Mayo 2010.

Anexo No.9. Certificado de participación como ponente en el XI Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2009, con la presentación de ponencia titulada **"Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica"**. Cali Octubre 2009.

Anexo No.10. Certificado de presentación de poster en el XII Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2010, con la presentación de la ponencia **"Comparación de dos patrones de referencia para la detección de la infección de *H. pylori* en mucosa gástrica de pacientes con gastritis"**. Cali Octubre 2010.

Anexo No.11. Certificado de participación como ponente en el XII Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2010, con la presentación de la ponencia **"Susceptibilidad de *H. pylori* *in vitro* a amoxicilina y claritromicina y su relación con eficacia terapéutica en pacientes con gastritis crónica"**. Cali Octubre 2010.

ANEXOS

Anexo No. 1: Encuesta sociodemográfica realizada a participantes del trabajo de investigación "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica" realizada en el Hospital San Andrés de Tumaco, Departamento de Patología, Universidad del Valle.

**"Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de
Helicobacter pylori en pacientes con gastritis crónica"**
HOSPITAL SAN ANDRES DE TUMACO

UNIVERSIDAD DEL VALLE, DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

La Universidad de Nariño y la Universidad del Valle, desean ejecutar un estudio con la participación de un grupo de sujetos adultos de ambos sexos residentes en Tuquerres y Tumaco con el objeto de estudiar la efectividad de los antibióticos que se usan frecuentemente para erradicar la infección por *Helicobacter pylori* del estómago humano.

Las preguntas de este cuestionario pretenden conocer el entorno donde usted vive y algunos aspectos relacionados con su alimentación y su salud. Su participación en el estudio es voluntaria. Si usted decide participar, y más adelante cambia de opinión, puede retirarse del estudio cuando quiera. Recuerde que la información que usted nos ofrece será muy útil para ayudar a otras personas.

Por favor no deje de responder ninguna pregunta. Busque la opción que más se acerque a su realidad. Este es un documento anónimo y la información es confidencial, es decir que nadie conocerá sus respuestas.

De antemano le agradecemos su valiosa participación.

I. DATOS GENERALES

1. Código del estudio: 2. Cédula de Ciudadanía (C.C):

2.1 Sexo F ☐ M ☐

3. Iniciales del nombre : (Orden: Nombres y apellidos de acuerdo con la C.C.)

4. Fecha de nacimiento: Día: Mes: Año:

5. Edad (Años cumplidos):

6. Dirección de su casa: Teléfono:

Dirección de un familiar _____ Teléfono : _____

7. Ciudad: _____ : Procedencia: _____ Barrio _____

8. Comuna: |__| Número de años en los que ha vivido en la zona: |__||__|

9. Peso (Kgs): |__||__||__| 10. Talla (cms): |__||__||__|

11 Nivel Educativo: _____ 11 A Seguridad Social: ☐ Subsidiado

☐ Contributivo

11 B Servicio que ordenó procedimiento: _____ ☐ No asegurado

12. Ocupación actual:

- 1. Empleado ☐
- 2. Trabajador independiente ☐
- 3. Pensionado ☐
- 4. Incapacitado para trabajar ☐
- 5. Desempleado ☐

II. AHORA PREGUNTAREMOS ALGUNOS ANTECEDENTES RELACIONADOS CON SU SALUD:

13. Patológicos: 13.1 Cáncer Si ☐ No ☐ 13.2 Coagulopatía Si ☐ No ☐

13.3 Enfermedad renal crónica Si ☐ No ☐ 13.4 Hepatopatía Si ☐ No ☐

13.5 Diabetes Si ☐ No ☐ 13.6 Cardiopatía Avanzada Si ☐ No ☐

13.7 Várices esofágicas Si ☐ No ☐ 13.8 VIH(+) Si ☐ No ☐

13.9 Enf. pulmonar crónica Si ☐ No ☐ 13.10 Enf. Psiquiátrica Si ☐ No ☐

10.11 Otro ☐ Cuál: _____

14 Quirúrgicos: 14.1 Gastrectomía parcial o total Si ☐ No ☐

14.2 Cirugía cardíaca: Si ☐ No ☐ 14.3 Cirugía estética reciente (3 meses): Si ☐ No ☐

14.4 Otra cirugía reciente Si ☐ No ☐ Cuál: _____

15 Farmacológicos: 15.1 Warfarina Si ☐ No ☐ 15.2 Aspirina Si ☐ No ☐

15.3 Ibuprofeno – AINE Hace menos de 1 semana: Si ☐ No ☐

Por mas de dos días Si ☐ No ☐

16 Antibióticos Si ☐ No ☐ Macrólidos ☐ Imidazoles ☐ β -Lactámicos ☐

Cefalosporinas ☐ Trimetoprim ☐ Aminoglucósidos ☐ Tetraciclina ☐ TMS

Otro ☐ Cuál: _____

Hace Cuánto? Mas de 1 mes ☐ Hace menos de 1 mes ☐ Por cuántos días _____

17 Ha recibido tratamiento para una bacteria que se relaciona con la gastritis?

Si ☐ No ☐

Cuál: _____

18 Ha recibido tratamiento para la gastritis? Si ☐ No ☐ **Cuál:** Antiácidos ☐ IBP ☐
AntiH2 ☐ Protector de mucosa ☐ Otro ☐ **Cuál:** _____

Hace cuánto tiempo: Hace más de 1 mes ☐ Hace menos de 1 mes ☐

Por cuánto tiempo: más de una semana ☐ Menos de 1 semana ☐

III. A CONTINUACIÓN PREGUNTAMOS ALGUNAS COSAS RELACIONADAS CON SU FAMILIA Y LA FORMA EN QUE VIVEN.

19. ¿Cuántas personas viven en su casa? |__||__|

20. ¿De qué material es la mayor parte del piso de su casa?

- | | | |
|----|-------------------|-----------------------|
| 1. | Tierra | ☐ |
| 2. | Cemento | ☐ |
| 3. | Baldosa | ☐ |
| 4. | Madera | ☐ |
| 5. | Otro, Cual? _____ | ☐ |

21. ¿Cuántos cuartos usan para dormir? |__||__|

22. ¿En total, cuántos cuartos tiene su vivienda sin contar pasillos, baños y cocina?

|__||__|

23. ¿Su casa dispone de agua entubada?

- | | | |
|----|--|-----------------------|
| 1. | Dentro de la vivienda | ☐ |
| 2. | Fuera de la vivienda, pero dentro del edificio, vecindad o terreno | ☐ |
| 3. | Llave pública o hidrante | ☐ |
| 4. | No se dispone de agua entubada | ☐ |

24. ¿Cuál es origen del agua que usted toma?

- | | | |
|----|-------------------|-----------------------|
| 1. | Acueducto | ☐ |
| 2. | Pozo artesiano | ☐ |
| 3. | Otro, Cual? _____ | ☐ |
| 9. | No sabe | ☐ |

25. ¿Cómo es el drenaje de su casa?

- | | | |
|----|----------------------------------|-----------------------|
| 1. | Conectado al drenaje de la calle | ☐ |
| 2. | Conectado a un pozo séptico | ☐ |
| 3. | Desagüe a un río o lago | ☐ |
| 4. | No tienen drenaje | ☐ |
| 9. | No sabe | ☐ |

26. ¿En su casa tienen?

Pregunta	Electrodomésticos u otros enseres	Si	No
26.1	Televisor	☐	☐
26.2	Videocassetera	☐	☐
26.3	Estufa de gas	☐	☐
26.4	Nevera	☐	☐
26.5	Calentador	☐	☐
26.6	Moto, automóvil o camioneta	☐	☐

27. ¿ Ha fumado al menos un día tabaco o alguno de los productos derivados del tabaco en los ultimos 6 meses?

- 1. No ☐
- 2. Si ☐
- 9. No sabe. ☐

28. ¿Fuma usted ahora?

- 1. No ☐
- 2. Si ☐
- 3. ☐

29. Está usted expuesto al humo de tabaco proveniente de algún miembro de su familia o compañero de trabajo que fuma?

- 1. No ☐
- 2. Si ☐

IV. INGESTA DE ALCOHOL

30. ¿Cuántos días a la semana consume usted alguna bebida alcohólica?

|_|||_|

31. Si la respuesta anterior fue si, por favor describa la cantidad y que tipo de licor (cerveza, aguardiente, ron, etc) que consume

- 1. Un vaso pequeño (50 mL) ☐ Tipo: _____
- 2. Un vaso mediano (100 mL) ☐ Tipo: _____

3. Un vaso grande (250 mL) ☐ Tipo: _____

4. Media botella _____ ☐ Tipo: _____

5. Botella (700-750 mL) ☐ Tipo: _____

V. HABITOS ALIMENTICIOS

32. ¿Cuál es la frecuencia normal de consumo de los siguientes alimentos o bebidas a la semana?

Código del ítem	Unidad	Alimento	Cuántas veces/semana? (si es menos de una vez semanal, codifique 98, si no consume nada, codifique 00)
32.1	1 vaso	Leche	__ __
32.2	1 porción	Pan	__ __
32.3	1 porción	Pasta	__ __
32.4	1 porción	Arroz	__ __
32.5	1 porción	Avena, trigo, cereales, maíz	__ __
32.6	1 porción	Carne roja (res ó cerdo)	__ __
32.7	1 porción	Carne roja salada ó nitrada (res ó cerdo)	__ __
32.8	1 porción	Pollo	__ __
32.9	1 porción	Pescado	__ __
32.10	1 porción	Mariscos (Camarones, ostras, pulpo, caracoles, etc)	__ __
32.11	1 porción	Embutidos (jamón, salchichón, salami, salchichas, etc)	__ __
32.12	1 unidad	Huevo	__ __
32.13	1 porción	Queso	__ __
32.14	1 medida	Granos (frijoles, lentejas, garbanzos, etc)	__ __
32.15	En términos generales, con qué frecuencia a la semana podría usted decir que come algún tipo de vegetales (excluya el consumo de platanos verdes o maduros, papa, yuca u otros tuberculos)?		__ __

32.16	1 porción	Vegetales verdes o amarillos	
32.17	1 unidad	Frutas cítricas (naranjas, toronjas, limones, mandarinas, kiwi, etc)	

33. Cómo considera usted su consumo de sal?

1. Bajo ☐
2. Moderado ☐
3. Alto ☐

34. Cada cuanto adiciona sal a los alimentos que estan listos para comer?

1. Siempre ☐
2. Casi siempre ☐
3. Algunas veces ☐
4. Nunca ☐

VI. A CONTINUACIÓN PREGUNTAMOS ALGUNAS COSAS RELACIONADAS CON SU HISTORIA MEDICA.

35. Algún miembro de su familia sufre o ha sufrido de cáncer del estomago?

1. No ☐
2. Si ☐. Por favor indique el parentesco: _____
9. No sabe ☐

36. En este momento sufre usted de algun tipo de enfermedad?

1. No ☐
2. Si ☐
9. No sabe ☐

37. Si la respuesta anterior fue si, por favor indique cual(s)

37.1 _____

37.2 _____

37.3 Otras: _____

38. Número de veces que ha visitado al médico en los últimos 5 Años:

39. Razones por las cuales lo ha visitado:

39.1

39.2

39.3

39.4 Otras:

40. Observaciones:

41. Fecha de la encuesta: Día: Mes: Año:

47. Código del entrevistador:

Anexo No.2. Procedimiento de Operación Estándar para Toma de endoscopias en adultos.

PROTOCOLO DE TOMA DE BIOPSIAS POR ENDOSCOPIA,

Materiales:

1. Toalla plegable para secar las mangueras del endoscopio y la pinza de biopsia.
2. Toalla de papel en rollo.
3. Soporte para colgar equipo.
4. Mesa auxiliar pequeña.
5. Agua destilada
6. Cepillos
7. Endoscopio
8. Boquillas
9. Fuente de luz
10. Palillos estériles
11. Camilla
12. Tanques para nitrógeno
13. Medias veladas
14. Cinta de rotulación
15. Piola
16. Tijeras
17. Marcador ultra fine point
18. Tubos nunc con tioglicolato mas glicerol
19. Frascos oblocitos con formol buffer
20. Xilocaina spray

Procedimiento

Ubicar al paciente en la camilla y dispensarle xilocaina en la faringe. Colocarle la boquilla e introducir la sonda del endoscopio por la boca y el esófago suavemente. Detallar las mucosas en busca de várices esofágicas u otras alteraciones. Pasar por el duodeno y llegar cardias, cuerpo y antro del estómago: Realizar un paneo con la cámara y llegar al píloro. Seleccionar los sitios de toma de biopsias y con la ayuda de la

asistente de endoscopia tomar las muestras con la obturación de las pinzas. Aplicar protocolo de rotulación el día anterior de la toma de muestras. A medida que se toman las muestras se sitúan con la ayuda de palillos estériles individuales en su respectivo tubo nunc, vial, frasco u OCT, dependiendo de su destino. Los nunc, los oct introducirlos en las medias o cañas de container e inmediatamente en el tanque de nitrógeno líquido. Los frascos oblocitos con las muestras para histología se dejan a temperatura ambiente y antes de las 48 horas aplicar protocolo de deshidratación si su destino es inmunohistoquímica, de lo contrario se pueden dejar esperar hasta finalizar la toma de todas las muestras.

Protocolo de toma de muestras estudio SV

Universidad del Valle

Espécimen	Medio de recolección	Procedimiento
Dos muestras de mucosa gástrica antral, curvatura menor y mayor.	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia CIM
Cuatro muestras: dos de antro y dos de cuerpo	Formol al 10%	Análisis histopatológico
Dos muestras de mucosa gástrica de cuerpo: curvatura mayor y menor	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia CIM
Una muestra de mucosa gástrica de cuerpo pared anterior media y otra de antro curvatura menor.	Tioglicolato con glicerol	Preservación a -70°C

Materiales requeridos para el piloto por cada paciente

Material	Cantidad	Descripción	Comentarios
Tubo Kristiensen (ureasa)	1	Recolección de muestra	
Frasco buffer formol 3ml	4	Recolección de muestra	
Tubo de tioglicato glicerol 25% 2ml	4	Recolección de muestra	
Tubo SSN 2ml	4	Recolección de muestra	
Tubo RPMI 2ml	1	Recolección de muestra	
Tubo de RNA Latter 0.2 ml	1	Recolección de muestra	
Tubo vacío	2	Recolección de muestra	
Termo con nitrógeno	1	Almacenar muestras	
Caja Icopor	1	Transporte de muestras	
Palillos x 15	3	Toma de Muestras	
Agar Sangre Cajas	12	Cultivo H.P.	
Lápiz rotulador	3	Rotulación de muestras	
Tijeras	1	Corte de material	
Guantes Caja	1	Bioseguridad	
Mecheros	2	Cultivo	
Alcohol Frasco	1	Desinfección	
Toallas	1	Limpieza	

Paquete			
Puntas amarillas Caja	1		
Puntas azules Caja	1		
Beacker	1		
Jarra de microaerofílica	1	Incubación	
Sobres de microaerofílica Puntas libres RNAasas	1	Incubación	
Piola			
Balines			
Encendedor			
Cinta de enmascarar			
Tapabocas			
Media velada			
Bolsas rojas		Desecho biológico	
Ependor ζ + Bolillo macerador		Cultivo	
		RNA	

Anexo No 3: Protocolo para la determinación de la concentración Mínima Inhibitoria. Mediante el método de Dilución en Agar.

PROTOCOLO PARA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA
MINIMA

Objetivo: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *H. pylori* a los antibióticos amoxicilina y claritromicina.

Método: **Dilución en Agar**

Preparación de medio de cultivo:

Base Mueller Hinton para MIC:

Preparar 200 ml (40 cajas petri; cada una con 5 ml) Mueller Hinton con 5% de sangre de cordero

Procedimiento:

Preparar 190 ml de Muller Hinton + 10 ml de sangre de cordero.

34g – 1000ml

X 190ml

X=6.46 gr.

Para 200ml, pesar 646 gr de agar Mueller Hinton adicionar 190ml de agua destilada, autoclavar, y 10 ml de sangre de cordero.

Concentración Inibitoria Mínima (CIM)

Antimicrobianos usados:

- Amoxicilina
- Claritromicina

Aislado de *H. pylori*: Se tomaran aislados con crecimiento no mayor a 72 hora, para evitar formas cocoides resistente.

Los aislados serán considerados resistentes a metronidazol cuando la CIM sea $\geq 8\mu\text{g/ml}$ y resistentes a Claritromicina y Amoxicilina cuando la CIM sea $\geq 1\mu\text{g/ml}$.

Se preparan diluciones desde el punto de corte +/-2 diluciones; así, si el punto de corte para amoxicilina y claritromicina está determinado en $1\mu\text{g/ml}$, se harán diluciones 0.25-

0.5-1-2-4 µg/ml. Sobre una base de 5 ml de agar Mueller-Hinton suplementando con 5% de sangre desfibrinada de cordero, en cajas de Petri pequeñas estériles.

Para Claritromicina y Amoxicilina se determino el punto de corte en 1 µg/ml; así, se hara diluciones 0.25-0.5-1-2-4 µg/ml.

Preparar un Stock de 1mg/ml a partir de 50mg de cada antibiótico.

Pese 50mg de c/antibiótico y adiciones 50ml de agua destilada esteril cubra on papel aluminio y diluir agitando con magneto. Filtre máximo 10ml con filtro de 0,22µ.

Diámetro de poro en tubo estéril.

Sugerencia: Cada stock alicuotarlo en 10 tubos nunc de 1 ml c/u. congelar a -20°C

El stock esta a 1000 µg/ml.

$V_1 \times 1000 \mu\text{g/ml} = 5\text{ml} \times 1\mu\text{g/ml}$.

$V_1 = 0,005\text{ml} = 5\mu\text{l}$ del Stock en 5 ml de medio de Mueller Hinton mas sangre de cordero al 5% para la dilución de 1µg/ml.

Concentraciones de antibiótico y volúmenes adicionados a cajas petri con ml de medio Mueller Hinton mas 5% sangre de cordero para antibiograma de aislados AP001-AP012.

Concentración de Antibiótico [µg /ml]	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
Volúmen en µl de la solución de trabajo con [1µg /ml] de cada antibiótico.	12.5	25	50	100	200

Se realizaran controles con aislados AP001-AP012 sin antibiótico, por lo que a cada caja de petri pequeña le corresponderá una caja petri pequeña de Muller Hinton suplementada al 5% en sangre de cordero pero sin antibiótico. Finalmente se tendrán 30 cajas petri pequeñas con aislados AP.

El control externo se realizara con cepa ATCC 43504.

**CEPA ATCC 43504 CONTROL DE CALIDAD POSITIVO PARA MIC
CLARITROMICINA Y AMOXICILINA**

Preparar un stock de $0.01\mu\text{g/ml}=10\mu\text{g/ml}$ a partir de 5mg de amoxicilina y claritromicina.

Anexo No 4. Protocolo de preparación de solución de trabajo con antibióticos amoxicilina y claritromicina

Objetivo: Determinar el volumen necesario de antibiótico en cada dilución del mismo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *H. pylori* a los antibióticos amoxicilina y claritromicina.

Método: Dilución en Agar

Para Claritromicina y Amoxicilina se determinó el punto de corte en $1\mu\text{g/ml}$; así, se hara diluciones 0.25-0.5-1-2-4 $\mu\text{g/ml}$.

Preparar un Stock de 1mg/ml a partir de 50mg de cada antibiótico.

Pese 50mg de c/antibiótico y adiciones 50ml de agua destilada esteril cubra on papel aluminio y diluir agitando con magneto. Filtre máximo 10ml con filtro de $0,22\mu$.

Diámetro de poro en tubo esteril. Cada stock alicuotarlo en 10 tubos nunc de 1 ml c/u. congelar a -20°C

El stock está a $1000\mu\text{g/ml}$.

$V_1 \times 1000\mu\text{g/ml} = 5\text{ml} \times 1\mu\text{g/ml}$.

$V_1 = 0,005\text{ml} = 5\mu\text{l}$ del Stock en 5 ml de medio de Mueller Hinton mas sangre de cordero al 5% para la dilución de $1\mu\text{g/ml}$.

Concentraciones de antibiótico y volúmenes adicionados a cajas Petri con ml de medio Mueller Hinton más 5% sangre de cordero para antibiograma de aislados AP001-AP012. Se preparan diluciones desde el punto de corte +/-2 diluciones; así, si el punto de corte para amoxicilina y claritromicina está determinado en $1\mu\text{g/ml}$, se harán diluciones 0.25-0.5-1-2-4 $\mu\text{g/ml}$. Sobre una base de 5 ml de agar Mueller-Hinton suplementando con 5% de sangre desfibrinada de cordero, en cajas de Petri pequeñas estériles.

Concentración de Antibiótico [μg /ml]	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
Volúmen en μl de la solución de trabajo con [$1\mu\text{g}$ /ml] de cada antibiótico.	12.5	25	50	100	200

Anexo No 5. Formato de resgistro de cultivos para ailamiento de *H. pylori* a partir de biopsias gastricas.

No identificación ó SV	Crecimiento de <i>H pylori</i>										Calidad	Contaminación	Identificación	Conservación		Susceptibilidad CIM				
	Lectura por Día													Preservado	Extracción	Amx	Cla	Densidad Óptica	Observaciones	
tipo de Biopsia	Día/Mes/año	Actividad	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2=++, 3=	0=No 1=Si	UCOG	TIO/GLI	PBS	lug/ml	lug/ml		

Anexo No 6. Aval de Ética Humana otorgada por el Comité de Ética Humana de La Universidad del Valle (CIREH).

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana		
Facultad de Salud		

PARA: **Dr. LUIS EDUARDO BRAVO**
Escuela de Medicina

DE: **MARTHA LUCÍA VÁSQUEZ T.**
Vicedecana de Investigaciones

ASUNTO: CERTIFICADOS ETICA HUMANA

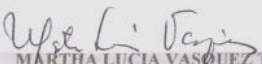
FECHA: de 2007

Cordial saludo:

Con la presente remito el certificado de ética humana correspondiente al proyecto:

073- SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIAL SEGÚN FACTORES DE VIRULENCIA DE
07 AISLADOS DE *Helicobacter Pylori* EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA

Atentamente,


MARTHA LUCÍA VÁSQUEZ T.
Vicedecana de Investigaciones



ACTA DE APROBACIÓN N° 011-07

Proyecto: SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIAL SEGÚN FACTORES DE VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Helicobacter Pylori* EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA

Sometido por: DR. LUIS EDUARDO BRAVO

Código Interno: -073-07

Fecha en que fue sometido:

10

05

2007

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:



Resumen del proyecto



Protocolo de investigación



Formato de consentimiento informado



Instrumento de recolección de datos



Folleto del investigador (si aplica)



Cartas de las instituciones participantes



Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO

☐ RIESGO MÍNIMO

☒ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada.

6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.

7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:

a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.

b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:

a. Lesiones a sujetos humanos.



- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:

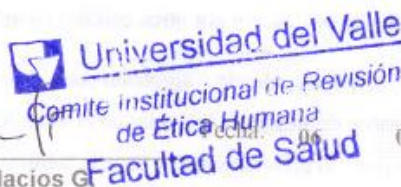
Nombre:

Mauricio Palacios

Capacidad representativa:

PRESIDENTE

Teléfono: 5185677

**CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE**

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Ley 44 de 1993 de la república de Colombia y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle

Firma:

Nombre:

Martha Lucia Vásquez

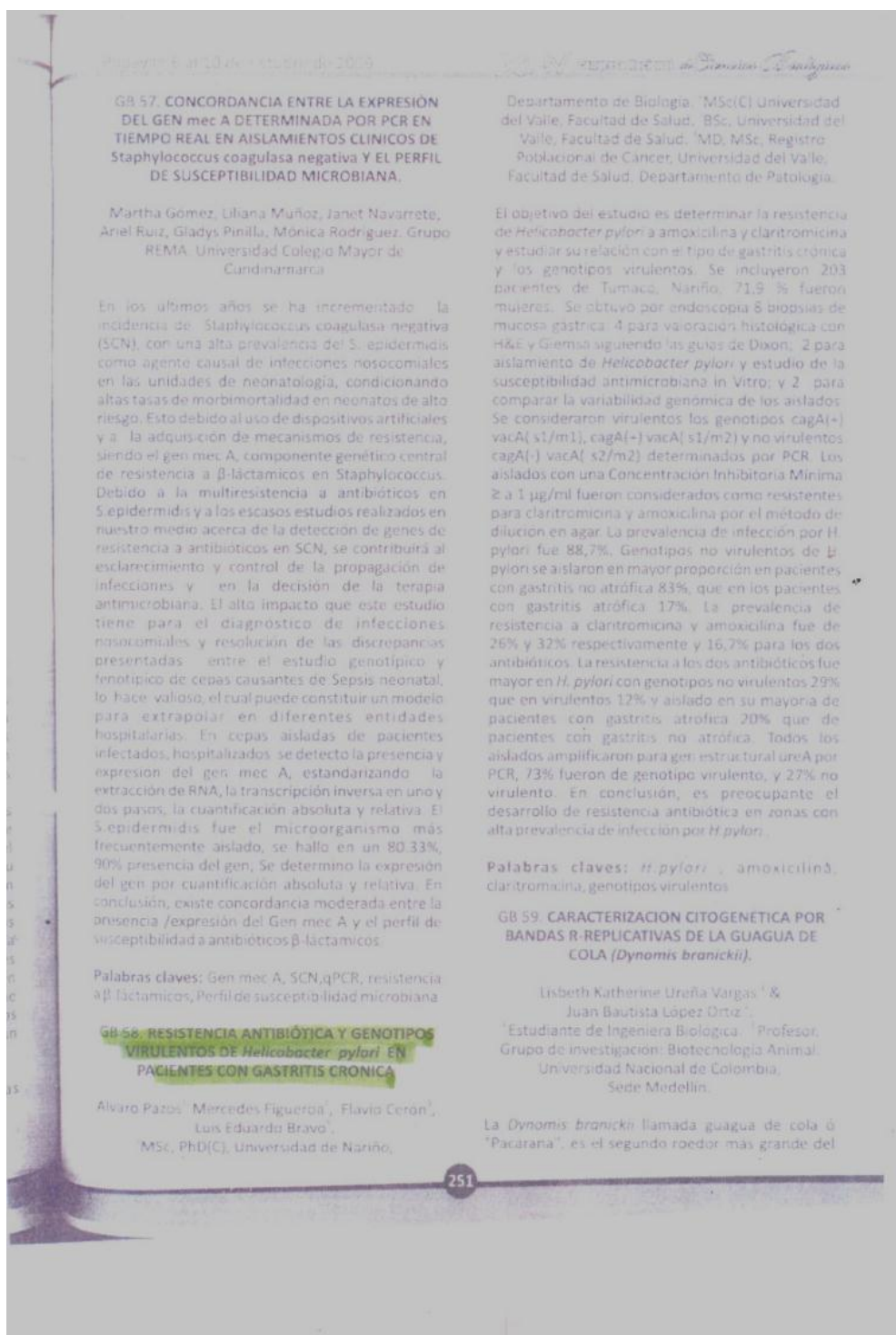
Capacidad representativa:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono: 5185680

Fecha: 06/06/2007

Anexo No.7. Certificado de participación como ponente en el Congreso Nacional de Ciencias Biológicas con la presentación de ponencia titulada **"Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica"**. Popayán, Octubre 2009.



Anexo No. 8. Constancia de inscripción de Poster presentado en la Semana de Enfermedad Digestiva, DDW, 2009 "Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with Chronic Gastritis", New Orleans Mayo 2010.

Poster Session: Epidemiology

Conference: CLINICAL PRACTICE

Track: CLINICAL PRACTICE, Epidemiology

Type: Poster

Date: Wednesday May 5, 2010

Time: 8:00 AM - 5:00 PM

Location: ENMCC

Room: Hall F

Description: Please note that there are no Continuing Medical Education units associated with this session.

Presenter: Nghi B. Ha^{1,4}, Huy N. Trinh², Trang T. Nguyen², Kevin D. Klapstein⁴, Nghiem B. Ha^{1,3}, Mindie H. Nguyen³

Presentation Time: 8:00 AM-5:00 PM

Presentation: W1011. Prevalence, Risk Factors, and Disease Knowledge of Chronic Hepatitis B (CHB) Infection in Vietnamese Americans in California: A Prospective Study

Presenter Company: 1. Pacific Health Foundation, San Jose, CA, United States. 2. Song Manh, Inc., San Jose, CA, United States. 3. Gastroenterology & Hepatology, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA, United States. 4. Public Health, Touro University, Vallejo, CA, United States.

Abstract: Prevalence, Risk Factors, and Disease Knowledge of Chronic Hepatitis B (CHB) Infection in Vietnamese Americans in California: A Prospective Study

[Add To My Event Plan](#)

Presenter: Constance E. Ruhl¹, James Everhart²

Presentation Time: 8:00 AM-5:00 PM

Presentation: W1012. Gallstone Disease and Mortality in the United States Population

Presenter Company: 1. Social & Scientific Systems, Inc., Silver Spring, MD, United States. 2. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, United States.

Abstract: Gallstone Disease and Mortality in the United States Population

[Add To My Event Plan](#)

Presenter: Angel Lanas^{1,3}, Beatriz Armada²

Presentation Time: 8:00 AM-5:00 PM

Presentation: W1013. Gastrointestinal and Cardiovascular Risk Profile of Osteoarthritis Patients Receiving NSAID. The Jornada Study

Presenter Company: 1. Gastroenterology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. 2. Medical Department, Pfizer Spain, Zaragoza, Spain. 3. IACS-CIBERhd, Zaragoza, Spain.

Abstract: Gastrointestinal and Cardiovascular Risk Profile of Osteoarthritis Patients Receiving NSAID. The Jornada Study

[Add To My Event Plan](#)

Presenter: Adam C. Ehrlich, Michelle K. Kim

Presentation Time: 8:00 AM-5:00 PM

Presentation: W1014. Surgical Intervention and Racial Differences in Small Intestinal Carcinoid Tumors

Presenter Company: The Dr. Henry D Janowitz Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, United States.

Abstract: Surgical Intervention and Racial Differences in Small Intestinal Carcinoid Tumors

[Add To My Event Plan](#)

Presenter: Luis E. Bravo, Mercedes Figueroa, Alvaro Pazos

Presentation Time: 8:00 AM-5:00 PM

Presentation: W1015. Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of *Helicobacter Pylori* in Patients With Chronic Gastritis

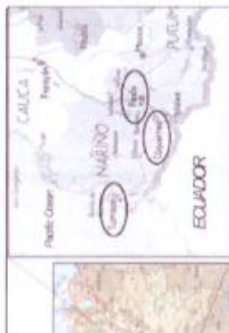
Presenter Company: Pathology, Universidad del Valle, Universidad de Nariño- Colombia.

Abstract: Antimicrobial Resistance and Virulence Genotypes of *Helicobacter Pylori* in Patients With Chronic Gastritis

[Add To My Event Plan](#)

Luis Eduardo Bravo¹, Mercedes Figueroa², Alvaro Pazos Moncayo³

¹ Department of Pathology, School of Medicine, Universidad del Valle, Cali, Colombia
² School of Basic Sciences, Universidad del Valle, Cali, Colombia
³ Department of Biology, Universidad de Nariño, Pácora, Colombia

[illegible][illegible]

at 149 of *Copies in stock* in 1990 of 129 copies.

As a result of the 1992 election, the House of Representatives will have a 55-43 Republican majority. The Senate will have a 52-48 Democratic majority. The President will be a Republican, George Bush, and the Vice President will be a Democrat, Dan Quayle. The House will have 10 Republican seats in the South, 10 Democratic seats in the South, and 10 seats in the North. The Senate will have 10 Republican seats in the South, 10 Democratic seats in the South, and 10 seats in the North.

[illegible]

【用法】口服。每次10~20粒，每日3次。

1. 2020年12月31日，甲公司“应付账款”科目所属各明细科目期末贷方余额如下表所示：

The percentage of *in situ* digestion was 88%. The mean $\pm$ SD for the α -glucosidase activity was 2.07 ± 0.16 mU/g of the substrate (mean $\pm$ SD) in the *in situ* digestion. The α -glucosidase activity was 1.02 $\pm$ 0.02 U/g of the substrate.

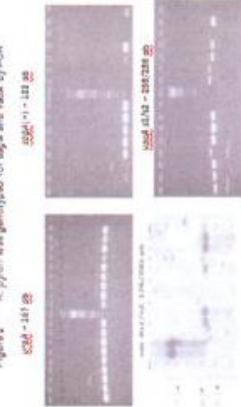
Table 1. Tumor-Inhibitory Properties of N-Syn Infection by *Chlamydia* *cholesterol* and *Chlamydia* *cholesterol*

HISTOLOGIC DIAGNOSIS	Mean		Range		Total
	$\bar{x}$	s_x	$x_{\min}$	$x_{\max}$	
ADENOCARCINOMA OF THE COLON	17	80.2	123	87.2	87.2
TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER	5	11.1	5	102	52.5
TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE UTERUS	15	50.0	14	102	81.7
CARCINOMA OF THE PANCREAS	2	2.2	2	102	100
ADENOCARCINOMA OF THE STOMACH	37	87.7	105	92.5	115.5

Figure 3. Optical density of *Myxobolus* standards (numbers under standards) and *Myxobolus* isolates.

[illegible]

is a common method for classifying and analyzing

[illegible][illegible][illegible]

The above information is for informational purposes only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is not to be used for any other purpose. The information is not to be used for any other purpose.

Anexo No.9. Certificado de participación como ponente en el XI Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2009, con la presentación de ponencia titulado "**Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica**".

Facultad de Salud

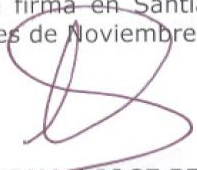


**EL SUSCRITO VICEDECANO DE INVESTIGACIONES DE LA
FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE**

HACE CONSTAR

Que la investigadora **MERCEDES FIGUEROA MACCA** presentó la ponencia titulada **Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica**, dentro del marco del XI Simposio de Investigaciones en Salud realizado del 21 al 23 de octubre de 2009.

Se firma en Santiago de Cali, a los veintinueve (29) días del mes de Noviembre de 2010.


HERNAN JOSE PIMIENTO JIMENEZ
Vicedecano de Investigaciones y Postgrados

Universidad del Valle
San Fernando
Calle 4B No. 36-00
Conmutador: (57) (2) 518 5686
Fax: (57) (2) 518 5684
<http://salud.univalle.edu.co>
Cali - Colombia.

Anexo No.10. Certificado de presentación de poster en el XII Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2010, con la presentación de la ponencia **"Comparación de dos patrones de referencia para la detección de la infección de *H. pylori* en mucosa gástrica de pacientes con gastritis"**. Cali Octubre 2010.



**EL SUSCRITO VICEDECANO DE INVESTIGACIONES DE LA
FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE**

HACE CONSTAR

Que la investigadora **MERCEDES FIGUEROA MACCA** presentó el trabajo de investigación titulado **Comparación de dos patrones de referencia para la detección de la infección de *H. pylori* en mucosa gástrica en pacientes con gastritis**, en la modalidad de posters, dentro del marco del XII Simposio de Investigaciones en Salud realizado del 20 al 22 de octubre de 2010.

Se firma en Santiago de Cali, a los veintinueve (29) días del mes de Noviembre de 2010.

HERNAN JOSE PIMIENTA JIMENEZ
Vicedecano de Investigaciones y Postgrados

Universidad del Valle
San Fernando
Calle 4B No. 36-00
Comutador: (57) (2) 518 5686
Fax: (57) (2) 518 5684
<http://salud.univalle.edu.co>
Cali - Colombia.

Anexo No.11. Certificado de participación como ponente en el XII Simposio de Investigaciones en Salud, Universidad del Valle 2010, con la presentación de la ponencia "Susceptibilidad de *H. pylori in vitro* a amoxicilina y claritromicina y su relación con eficacia terapéutica en pacientes con gastritis crónica". Cali Octubre 2010.



**EL SUSCRITO VICEDECANO DE INVESTIGACIONES DE LA
FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE**

HACE CONSTAR

Que la investigadora **MERCEDES FIGUEROA MACCA** presentó la ponencia titulada **Resistencia antibiótica y genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica**, dentro del marco del XI Simposio de Investigaciones en Salud realizado del 21 al 23 de octubre de 2009.

Se firma en Santiago de Cali, a los veintinueve (29) días del mes de Noviembre de 2010.


HERNAN JOSE PIMIENTO JIMENEZ
Vicedecano de Investigaciones y Postgrados

Universidad del Valle
San Fernando
Calle 4B No. 36-00
Conmutador: (57)(2) 518 5686
Fax: (57)(2) 518 5684
<http://salud.univalle.edu.co>
Cali - Colombia.

Anexo No.12. Nota de aprobación de trabajo de investigación



UNIVERSIDAD DEL VALLE – FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS
POSTGRADO CIENCIAS BIOMÉDICAS.

ACTA DE SUTENTACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS MÉDICAS (7683)

Jurado calificador conformado por los Doctores:

1. PEDRO ROVETTO, MD, PhD
2. MONICA CHAVEZ, MSc, PhD
3. GERARDO LIBREROS, MSc.

El día 16 de FEBRERO de 2011, a las 10:30 A.M. se lleva a cabo la Sustentación del Trabajo de Investigación presentado por el estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Medicas(7683): MERCEDES FIGUEROA MACCA con código 200505565.

Título del Trabajo de Investigación: *"Susceptibilidad in Vitro de Helicobacter Pylori en pacientes con gastritis crónica procedentes de zona de bajo riesgo de cáncer gástrico"*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Armando Daniel Cortes'.

Dr. Armando Daniel Cortes.
Director del Proyecto



De acuerdo con los resultados anteriores se determina que la sustentación del trabajo de investigación presentada por el estudiante es:

☒ Aprobada ☐ Meritoria ☐ Laureada ☐ Reprobada

En caso de ser reprobada el estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el Director del Trabajo.

☐ Requiere ó ☐ No requiere nueva sustentación.

El plazo para la nueva sustentación y/o para presentación del documento final es de:

Otros comentarios:



Dr. LEONARDO FIERRO P. MD., PhD
Director Postgrado Ciencias Biomédicas

Jurado-----
PEDRO ROVETTO., MD, PhD

Jurado-----
MONICA CHAVEZ ,MSc

Jurado-----
GERARDO LIBREROS , MSc