

## Original

# Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia

J. Díaz-Regañón, T. Alarcón, D. Domingo y M. López-Brea

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

### RESUMEN

*Helicobacter pylori* posee diversos factores de patogenicidad, entre los que se encuentran los genes *vacA* y *cagA*, que se han asociado a síntomas más graves. Las diferentes pautas de tratamiento tienen fallos de erradicación de hasta el 20% debido, entre otras causas, al desarrollo de resistencia a los antibióticos. En nuestro medio está aumentando la resistencia de *H. pylori* al metronidazol y la claritromicina, especialmente en los niños, aunque mantiene su sensibilidad a la amoxicilina y la tetraciclina. Para conocer el patrón de sensibilidad a estos antibióticos se estudiaron 36 aislamientos clínicos de *H. pylori*. Se determinó la CMI por difusión y dilución en agar, y la detección de los genes *vacA* y *cagA* se realizó por PCR convencional. Todas las cepas fueron sensibles a la amoxicilina y la tetraciclina. La resistencia al metronidazol por difusión y por dilución fue del 35,7% y el 36,1%, y a la claritromicina del 21,4% y el 22,3%, respectivamente. Hubo una cepa con resistencia intermedia a la claritromicina (CMI de 0,38 mg/l) por el método de difusión en agar, que se incluyó entre las cepas resistentes. Se observaron tres discrepancias entre los dos métodos de sensibilidad. El alelo s1 del gen *vacA* se detectó en el 17,2% de las cepas y el alelo s2 en el 82,8%. El 51,7% de ellas presentaban el gen *cagA*. Por lo tanto, todas las cepas probadas fueron sensibles a la amoxicilina y la tetraciclina, pudiendo considerar a estos antibióticos como de primera línea, mientras se mantiene un ligero aumento en los valores de resistencia a claritromicina y metronidazol. El gen *cagA* se presentó en los porcentajes esperados, mientras que el alelo s1 del gen *vacA* fue detectado en una proporción menor.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori* - Resistencia - Virulencia

## Susceptibility of 36 *Helicobacter pylori* clinical isolates to four first-line antibiotics and virulence factors

### SUMMARY

*Helicobacter pylori* possess various virulence factors, including *cagA* and *vacA* genes, that are associated with more aggressive symptoms such as bleeding ulcer and gastric cancer. Although there are different treatment regimens, there is still a failure rate of up to 20% due to antibiotic resistance, among other causes. In our country resistance to metronidazole and clarithromycin is increasing, especially in children, although they are still susceptible to amoxicillin and tetracycline. In order to determine the susceptibility pattern to these antibiotics 36 *H. pylori* clinical isolates were studied. MIC was determined by agar diffusion and agar dilution, and *vacA* and *cagA* genes were detected by conventional PCR. All isolates were susceptible to amoxicillin and tetracycline. Resistance to metronidazole by diffusion or dilution tests was 35.7% and 36.1%, respectively, and to clarithromycin, 21.4% and 22.3%, respectively. There was one strain that showed intermediate resistance to clarithromycin (MIC 0.38 mg/l), using agar diffusion, and that was included among the resistant strains. Three discrepancies were observed between the diffusion and dilution methods. The *vacA* s1 allele was detected in 17.2% of the strains, and *vacA* s2 in 82.8%; 51.7% of the total were *cagA*+. In conclusion, all strains tested in our study were susceptible to amoxicillin and tetracycline, allowing them to be considered as first-line antibiotics, while clarithromycin and metronidazole maintain a slight increase in their resistance level. The *cagA*+ strains were detected in expected quantities, while the s1 allele of the *vacA* gene was detected in lower quantities.

**Key words:** *Helicobacter pylori* - Resistance - Virulence

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un bacilo gramnegativo de morfología helicoidal con cuatro a seis flagelos que le dotan de movilidad. Su crecimiento óptimo se produce a 37 °C en microaerofilia, y es productor de catalasa, ureasa y oxidasa. Posee diversos factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización o al daño de la mucosa gástrica; entre estos últimos se encuentra la citotoxina vacuolizante VacA, que es una proteína producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*, resistente a la acción del ácido y de la pepsina. Su papel patógeno no está claramente definido y, aunque se ha asociado más frecuentemente con aislamientos causantes de úlcera en la población europea (1), no parece esencial para su producción (2). Esto podría explicarse por la existencia de distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos (3).

La proteína CagA es otro factor patógeno importante. Es una proteína antigénica de función desconocida, que presentan el 60% de las cepas de *H. pylori* y que se asocia con la expresión de la actividad vacuolizante de la citotoxina (4). Está codificada por el gen *cagA*, y su presencia se asocia a alteraciones importantes, como gastritis grave, atrofia de la mucosa y alto riesgo de úlcera o cáncer gástrico. De las cepas procedentes de pacientes con úlcera, un porcentaje superior al 90% son *cagA* positivas.

Otros factores importantes de patogenicidad son la "isla" de patogenicidad, las proteínas de choque térmico, el lipopolisacárido, la ureasa, la capacidad de movilidad y la capacidad de adherencia.

La infección por *H. pylori* se presenta en casi la mitad de la población mundial, convirtiéndose así en la infección bacteriana crónica más común de los humanos (5). Se manifiesta principalmente con clínica digestiva (dispepsia, gastritis, úlcera), y en algunos estudios se ha asociado a clínica extradigestiva (cardiopatía isquémica, fenómeno de Raynaud, enfermedades inmunitarias) (6, 7).

Para el diagnóstico de *H. pylori*, el cultivo adquiere cada vez más importancia en ciertas poblaciones con mayor prevalencia de resistencia a los antibióticos, debido a la posibilidad que ofrece de probar la sensibilidad a éstos. Está recomendado en casos de resistencia primaria a la claritromicina mayor del 15% a 20% y tras dos fallos de tratamiento (8).

Existen diferentes pautas terapéuticas establecidas por varios consensos: National Institute of Health de 1994, europeos de 1996, 2000 y 2005 (8, 9), canadiense de 1998 (10) y asiático de 1997 (11), que incluyen la administración tanto de antiácidos como de antibióticos en terapias dobles (actualmente no recomendadas), triples o cuádruplas.

Cualquiera de ellos puede fallar en la erradicación de *H. pylori*, en un 5% a 20% de los casos, debido entre otras causas a falta de cumplimiento terapéutico por parte del paciente, a la aparición de efectos secundarios y al desarrollo de resistencia antibiótica. En nuestro medio está aumentando la resistencia al metronidazol y la claritromicina, especialmente en los niños, pero se mantiene la sensibilidad a la amoxicilina y la tetraciclina (12).

El objetivo de nuestro estudio fue conocer los patrones de sensibilidad a los antibióticos de primera línea contra *H. pylori* y las características patógenas de esta bacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se estudiaron 36 cepas de *H. pylori*, tanto de niños como de adultos, aisladas de muestras tomadas por endoscopia. Las biopsias se sembraron en medios selectivos y no selectivos para *H. pylori* y se incubaron en estufa a 37 °C en atmósfera microaerófila durante 5 a 15 días. La identificación se llevó a cabo por medio de la morfología de la colonia, la tinción de Gram y la positividad de las pruebas de la ureasa, la catalasa y la oxidasa.

En los estudios de sensibilidad bacteriana se incluyó la cepa patrón *H. pylori* NCTC 11637 (National Collection of Type Cultures, London; Type Strain). Para corroborar la presencia de los genes *vacA* y *cagA* se incluyó la cepa control TIGR 26695 (The Institute for Genome Research).

### Antimicrobianos y estudio de sensibilidad *in vitro*

Los antimicrobianos claritromicina y metronidazol se probaron por el método *E-test*<sup>®</sup>, y la ampicilina y la tetraciclina por el de disco, ambos por difusión en agar, usando placas de Columbia agar base suplementado con un 5% de sangre de carnero. Cada placa fue inoculada con un cultivo de 48 a 72 horas de *H. pylori*, y después se depositaron las tiras de *E-test*<sup>®</sup> o los discos para posteriormente ser incubadas a 37 °C. A los tres días se hizo una primera lectura de los resultados, que fueron confirmados a los cinco días.

Por el método de dilución en agar, los antibióticos probados y sus correspondientes solventes, siguiendo las recomendaciones del NCCLS, fueron amoxicilina-tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/l, tetraciclina-agua, metronidazol-agua y claritromicina-metanol. Para determinar la CMI de cada antibiótico se probaron diferentes concentraciones obtenidas por diluciones dobles seriadas (128-0,008 mg/l) a partir de un cultivo puro de *H. pylori* a una concentración

del 2 de la escala MacFarland (contenido aproximado de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml), que se inocularon, mediante un replicador automático, en placas de Mueller-Hinton con un 5% de sangre desfibrinada de caballo conteniendo la concentración de antibiótico a estudiar. La CMI se definió como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibía el crecimiento bacteriano visible después de tres a cinco días de incubación.

### Puntos de corte de resistencia

Se siguieron las recomendaciones del NCCLS del año 2000 para la claritromicina (cepas sensibles CMI  $\leq 0,25$  mg/l, intermedias CMI = 0,5 mg/l y resistentes CMI  $\geq 1$  mg/l) y de la BSAC del año 2004 para la amoxicilina (sensibles CMI  $\leq 1$  mg/l y resistentes CMI  $\geq 2$  mg/l), el metronidazol (sensibles CMI  $\leq 4$  mg/l y resistentes CMI  $\geq 8$  mg/l) y la tetraciclina (sensibles CMI  $\leq 2$  mg/l y resistentes CMI  $\geq 4$  mg/l) (13).

### Estudio de factores de virulencia

Para el estudio de la presencia de los genes *vacA* y *cagA* se procedió a la extracción del DNA cromosómico de *H. pylori* según un protocolo previamente descrito (14). La detección de los alelos del gen *vacA* se realizó mediante una técnica de PCR, siguiendo el protocolo de Atherton y cols. (15), y para la detección del gen *cagA* se siguió el protocolo de Covacci y cols. (16), que detecta un producto amplificado de 297 pb situado entre las posiciones 1751 y 2048 de la secuencia previamente mencionada (17). El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) y el de revelado mediante electroforesis en gel de agarosa teñidos con bro-

muro de etidio, utilizando marcadores de peso molecular adecuados al peso del fragmento a detectar. Posteriormente se visualizaron mediante transiluminador Uvidoc (Sigma, Saint Louis, USA) y se fotografiaron con máquina de papel térmico Mitsubishi P91 (Mitsubishi, Ciprés, USA).

### RESULTADOS

Por difusión en agar, las 36 cepas de *H. pylori* fueron sensibles a la amoxicilina y la tetraciclina, el 35,7% fueron resistentes al metronidazol y el 21,4% resistentes a la claritromicina. Por dilución en agar también todas las cepas fueron sensibles a la tetraciclina y la amoxicilina, el 36,1% fueron resistentes al metronidazol y el 22,3% resistentes a la claritromicina. Hubo una cepa con resistencia intermedia a la claritromicina (0,38 mg/l), por el método de difusión en agar, que se incluyó entre las cepas resistentes (Tabla 1).

Se observaron tres discrepancias entre los dos métodos de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. Una cepa resultó ser sensible al metronidazol por el método de dilución mientras que fue resistente por el método de difusión; otra fue resistente a la claritromicina por dilución, pero sensible por difusión; y una tercera cepa fue sensible a la claritromicina por dilución y resistente por difusión.

De las 36 cepas de *H. pylori*, a 29 se les pudo extraer el DNA y realizar el estudio de detección de los genes *vacA* y *cagA*.

La secuencia señal del gen *vacA* se presentaba como forma *s1* en el 17,2% de las cepas (cinco cepas de las 29 probadas) y como *s2* en el 82,8% (24 cepas de las 29 probadas). El 51,7% de las cepas de *H. pylori* presentaron el gen *cagA* (15 cepas de las 29 probadas) y el 48,3% de las cepas no (14 cepas de las 29 probadas).

Tabla 1. Sensibilidad antibiótica de *H. pylori* por los métodos de difusión y dilución en agar (CMI en mg/l).

Antibiótico	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistencia
Claritromicina				
Difusión en agar	<0,016	8	<0,016->256	22,30%
Dilución en agar	0,032	2	<0,008-128	21,40%
Metronidazol				
Difusión en agar	0,125	>256	<0,016->256	36,10%
Dilución en agar	4	>128	1-128	35,70%
Amoxicilina				
Dilución en agar	<0,008	0,016	<0,008-0,125	0
Tetraciclina				
Dilución en agar	0,5	1	0,125-2	0

De las 15 cepas *cagA*+, tres presentaban el alelo *s1* del gen *vacA* (20% de las cepas *cagA*+ *vacA* *s1*) y 12 presentaban el alelo *s2* (80% de las cepas *cagA*+ *vacA* *s2*). De las 14 cepas *cagA*-, dos expresaban el alelo *s1* (14,3% de las cepas *cagA*- *vacA* *s1*) y 12 expresaban el *s2* (85,7% de las cepas *cagA*- *vacA* *s2*).

## DISCUSIÓN

La resistencia a la tetraciclina y la amoxicilina es un hecho excepcional (18-20), pero están apareciendo estudios que describen tasas de resistencia del 12,3% al primer antibiótico (21) y hasta del 38% al segundo (22). La mayoría de los estudios demuestran que predominan las cepas sensibles (23, 24), y en nuestro caso todas las cepas lo fueron, confirmándose su utilidad en la terapia contra *H. pylori* de primera línea.

Los macrólidos se han considerado antibióticos con buena actividad *in vitro* frente a *H. pylori*. La resistencia primaria a este grupo de antibióticos es baja, entre el 2% y el 10% en la mayoría de los países europeos, pero el desarrollo de resistencia secundaria eleva este porcentaje hasta el 70% a 100% (25). Diferentes estudios nos informan de grados de resistencia a la claritromicina muy diversos: 2% (26), 6,2% (27), 16,5% (28), 18,2% (29) y hasta un 29,1% (30). En nuestro estudio, la resistencia a la claritromicina fue del 22,3% por el método de difusión en agar y del 21,4% por el de dilución. Al incluir cepas tanto de adultos como de niños (con mayores grados de resistencia), pero en porcentaje desconocido, y al no conocer tampoco si habían hecho tratamiento previo con este antibiótico, no podemos afirmar que esta tasa de resistencia obtenida sea alta (para resistencia primaria y adultos) o baja (para resistencia secundaria y niños).

El metronidazol es el antibiótico con mayor tasa de resistencia de los utilizados frente a *H. pylori*. La resistencia primaria se encuentra entre el 30% y el 40%, y la secundaria entre el 70% y el 100% (25). Su amplio uso en otras infecciones en la población general puede estar influyendo en el incremento de la resistencia. En España se observó que del 7,4% de resistencia en los años 1991-1993 se pasó a un 20,25% en 1994-1996 y a un 43,9% en 1997-1999 (31); no obstante, actualmente parece que esta resistencia ha disminuido y se está manteniendo estable alrededor del 35% (32). En nuestro estudio la tasa de resistencia fue del 36,1% por difusión en agar y del 35,7% por dilución, confirmando dicha estabilidad.

Los estudios realizados sobre el gen *vacA* muestran grandes discordancias, ya que mientras unos hablan de un 100% de presencia del alelo *s1* otros encuentran porcentajes del 63% y del 65% (12, 33). En nuestro estudio, la pre-

sencia del alelo *s1* fue del 17,2%. Al no conocer la proporción de cepas procedentes de niños y adultos no podemos asociar los resultados con un mayor número de cepas infantiles, que son las que se relacionan con el alelo *s1* (34).

Hasta ahora la mayoría de los estudios referían porcentajes superiores al 85% de cepas de *H. pylori* *cagA*+ (12, 33), pero en los últimos trabajos realizados este porcentaje varía enormemente: 85% a 90% en Corea (35), 64% en México (36), 61,7% en Turquía (37) y 31% a 40% en Brasil (38). En nuestro caso el porcentaje de cepas *cagA*+ fue del 51,7%, quizás por el hecho de que se incluyeron cepas de niños, ya que en éstos el porcentaje de *cagA*+ es menor (34). Dentro de estas cepas *cagA*+, el 20% presentaban el alelo *s1* del gen *vacA* y el 80% el alelo *s2*. En otros estudios, el porcentaje de presencia del alelo *s1* del gen *vacA* en cepas *cagA*+ es superior al del alelo *s2* (39).

En conclusión, todas las cepas de *H. pylori* estudiadas fueron sensibles a la amoxicilina y la tetraciclina, por lo que se mantiene la opción de primera línea de tratamiento con estos antibióticos. Los porcentajes de resistencia a la claritromicina y el metronidazol fueron similares por dilución y por difusión, y se mantuvieron dentro de los límites esperados. La presencia del alelo *s1* en las cepas estudiadas fue menor que en otros estudios; sin embargo, las cepas *cagA*+ se detectaron en un porcentaje similar al descrito en estudios recientes. Al relacionar las cepas *cagA*+ con los alelos *s1* y *s2* del gen *vacA*, encontramos que es más frecuente que las cepas *cagA*+ presenten el alelo *s2*.

---

**Correspondencia:** Manuel López-Brea, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, C/Diego de León 62, 28006 Madrid. Tel. y Fax: 91 520 23 17; E-mail: micro@helicobacterspain.com

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Sieg, A., Galle, P., Stremmel, W. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 944-948.
2. Suerbaum, S., Josenhans, C. Virulence factor of *Helicobacter pylori*: Implications for vaccine development. *Molec Med Today* 1999; 5: 32-39.
3. Van Door, L., Figueriedo, C., Sanna, R. y cols. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66.
4. Tummuru, M.K., Cover, T.L., Blaser, M.J. Cloning and expression of a high-molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61: 1799-1809.
5. Cover, T.L., Blaser, M.J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: Pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Int Med* 1996; 41: 85-117.

6. Gasbarrini, A., Franceschi, F., Armuzzi, A. y cols. *Extradigestives manifestations of H. pylori gastric infection*. Gut 1999; 45: 19-112.
7. Nilsson, H.O., Pietroiusti, A., Gabrielli, M., Zocco, M.A., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. *Helicobacter pylori and extragastric diseases. Other Helicobacters*. Helicobacter 2005; 10: 54-65.
8. Malfertheiner, P., Mégraud, F., O'Morain, C. *Guidelines for the management of Helicobacter pylori infection. Summary of the Maastricht-3 2005 Consensus Report. Business Briefing*. Eur Gastroenterol Rew 2005; 1-4.
9. Goh, K.L. *Update on indications for treatment of H. pylori (including Maastrich 2)*. Curr Opin Gastroenterol 2001; 17: 543-546.
10. Hunt, R.H., Fallone, C.A., Thomson, A.B. *Canadian Helicobacter Consensus Conference update: Infections in adults. Canadian Helicobacter Study Group*. Can J Gastroenterol 1999; 13: 213-217.
11. Lam, S., Talley, N. *Helicobacter pylori consensus, report of the 1997 Asia Pacific consensus conference on the management of Helicobacter pylori infection*. J Gastroenterol Hepatol 1998; 13: 1-12.
12. López-Brea, M., Martínez, M.J., Domingo, D., Alarcón, T. *A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in Helicobacter pylori from Spanish children*. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 295-297.
13. Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., Royo, G. *Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. Procedimientos en Microbiología Clínica, 2004. Recomendaciones de la SEIMC, Madrid 2004*.
14. Ge, Z., Taylor, D.E. *H. pylori DNA transformation by natural competence*. En: Clayton, C.L., Mobley, H.L. (Eds.). *Methods in Molecular Medicine. Helicobacter pylori protocols*. Humana Press, New Jersey, USA 1997; 145-152.
15. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K.R., Blaser, M.J., Cover, T.L. *Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration*. J Biol Chem 1995; 270: 17771-17777.
16. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M. y cols. *Molecular characterization of the 128-Kda immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5791-5795.
17. López-Brea, M., Alarcón, T. *Sensibilidad a antimicrobianos en la infección por Helicobacter pylori*. En: López-Brea (Ed.). *Helicobacter pylori. Retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento*. Prous Science, Barcelona 1999; 281-305.
18. Han, S.R., Bhakdi, S., Macurer, M.J., Schneider, T., Gehring, S. *Stable and unstable amoxicillin resistance testing performed prior to eradication therapy?* J Clin Microbiol 1999; 37: 2740-2741.
19. Van Zwet, A.A., Vandenbrouke-Grauls, C.M.J.E., Thijs, J.C., Van der Wouden, E.J., Gerrits, M.M., Kusters, J.G. *Stable amoxicillin resistance in Helicobacter pylori*. Lancet 1998; 353: 1595.
20. Dore, M.P., Kwon, D.H., Sepulveda, A.R., Graham, D.Y., Realdi, G. *Stable amoxicillin resistance in Helicobacter pylori*. Helicobacter 2001; 6: 79.
21. Kim, J.M., Kim, J.S., Jung, H.C., Kim, N., Song, I.S. *Antibiotic resistance of Helicobacter pylori isolated from Korean patients in 2003*. Korean J Gastroenterol 2004; 44: 126-135.
22. Godoy, A.P., Ribeiro, M.L., Benvenuto, Y.H y cols. *Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in Helicobacter pylori clinical isolates*. BMC Gastroenterol 2003; 3: 20.
23. Versalovic, J., Shortdridge, D., Kibler, K. y cols. *Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 477-480.
24. Toro, C., García-Samaniego, J., Carbó, J. y cols. *Prevalencia de la resistencia primaria de Helicobacter pylori a ocho antimicrobianos en un hospital de Madrid*. Rev Esp Quimioterap 2001; 14: 172-176.
25. Glupczynski, Y. *Antimicrobial resistance in Helicobacter pylori: A global overview*. Acta Gastroenterol Belg 1998; 61: 357-366.
26. Koivisto, T.T., Rautelin, H.I., Voutilainen, M.E. y cols. *Primary Helicobacter pylori resistance to metronidazole and clarithromycin in the Finnish population*. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 701.
27. Gomollón, F., Santolaria, S., Sicilia, B. y cols. *Helicobacter pylori resistance to metronidazole and clarithromycin: Descriptive analysis 1997-2000*. Med Clin (Barc) 2004; 123: 481-485.
28. Lopes, A.I., Oleastro, M., Palha, A., Fernandes, A., Monteiro, L. *Antibiotic-resistant Helicobacter pylori strains in Portuguese children*. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 404-409.
29. Chen, J., Chen, F.B., Yu, J.D., Chen, X.J., Li, Z.Y., Zhang X.P. *Prevalence of Helicobacter pylori resistant to clarithromycin, amoxicillin and metronidazole in children*. Zhonghua Er Ke Za Zhi 2004; 42: 769-771.
30. Alarcón, T., Vega, A.E., Domingo, D., Martínez, M.J., López-Brea, M. *Clarithromycin resistance among Helicobacter pylori strains isolated from children: Prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis*. J Clin Microbiol 2003; 41: 486-499.
31. Domingo, D., Alarcón, T., López-Brea, M. *Virulence factors of Spanish Helicobacter pylori isolates and correlation with gastritis or ulcer production*. Clin Microbiol 1999; 5: 668-671.
32. García-Campos, J.A., Alarcón, T., Domingo, D., Serrano, M., Abanades, S., López-Brea, M. *Clarithromycin and metronidazole resistance in Helicobacter pylori strains obtained from patients with peptic ulcer vs. gastritis*. Helicobacter 2004; 9: 587.
33. Domingo, D., Alarcón, T., Prieto, N., López-Brea, M. *Relación entre sensibilidad antibiótica y factores de virulencia en aislamientos clínicos de Helicobacter pylori*. Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 340-345.
34. Alarcón, T., Martínez, M.J., Urruzumo, P. y cols. *Prevalence of CagA and VacA antibodies in children with Helicobacter pylori-associated peptic ulcer compared to prevalence in paediatric patients with active or non-active chronic gastritis*. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 842-844.
35. Kim, J.W., Kim, J.G., Chae, S.L., Cha, Y.J., Park, S.M. *High prevalence of multiple strain colonization of Helicobacter pylori in Korean patients: DNA diversity among clinical isolates from the gastric corpus, antrum and duodenum*. Korean J Intern Med 2004; 19: 1-9.
36. Garza-González, E., Bosques-Padilla, F.J., Tijerina-Menchaca, R., Pérez-Pérez, G.L. *Characterisation of Helicobacter pylori isolates from the north-eastern region of Mexico*. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 41-45.
37. Bulent, K., Murat, A., Esin, A. y cols. *Association of cagA and vacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population*. Worl J Gastroenterol 2003; 9: 1580-1583.
38. Pereira-Lima, J.C., Marques, D.L., Pereira-Lima, L.F., Hornos, A.P., Rota, C. *The role of cagA Helicobacter pylori strains in gastro-esophageal reflux disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004; 16: 643-647.
39. Brito, C.A., Silva, L.M., Juca, N. y cols. *Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 817-821.