

## Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico

Mercedes Figueroa<sup>1</sup>, Armando Cortés<sup>1</sup>, Álvaro Pazos<sup>2</sup>, Luis Eduardo Bravo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Universidad del Nariño, Pasto, Colombia

**Introducción.** La infección por *Helicobacter pylori* prevalece en más de la mitad de la población mundial. Es prioritario evaluar la sensibilidad actual *in vitro* de *H. pylori* a los antimicrobianos usados en los protocolos de erradicación, fundamentalmente para determinar los patrones y resolver la infección.

**Objetivo.** Determinar la prevalencia de la infección y la sensibilidad antibiótica de *H. pylori* en biopsias gástricas.

**Materiales y métodos.** Se investigan la prevalencia de la infección y la sensibilidad antibiótica de *H. pylori* de 203 pacientes con gastritis crónica procedentes de Tumaco (Nariño), mediante pruebas histopatológicas (escala Dixon) y microbiológicas (cultivo en agar sangre con suplemento de antibióticos) y, además, su resistencia a amoxicilina y claritromicina mediante el método de dilución en agar.

**Resultados.** La prevalencia de la infección para *H. pylori* con pruebas histopatológicas y microbiológicas es de 88,7 % y 84,7 % respectivamente; la prevalencia de resistencia de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina y a ambos antibióticos, fue de 20,5 %, 19,8 % y 10,96 %, respectivamente.

**Conclusiones.** Los resultados de este estudio indican que es alta la incidencia de *H. pylori* resistente a claritromicina y amoxicilina en pacientes de Tumaco con gastritis crónica. También, se encontraron cepas multiresistentes a claritromicina y amoxicilina.

**Palabras clave:** farmacorresistencia microbiana, *Helicobacter pylori*, gastritis, amoxicilina, claritromicina, omeprazol.

### Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* with chronic gastritis

**Introduction.** Infection by *Helicobacter pylori* is prevalent in approximately half the world's population. However, the susceptibility of *H. pylori* to antimicrobial agents must be evaluated by *in vitro* methods in order to determine the susceptibility levels and to guide treatment regimes.

**Objective.** The prevalence of infection and antibiotic susceptibility was evaluated in gastric biopsies containing *H. pylori*.

**Materials and methods.** The prevalence of infection and antibiotic susceptibility was investigated in 203 patients with chronic gastritis from Tumaco, Colombia. Diagnosis was confirmed by histopathological evidence (Dixon scale) and microbiological (culture on blood agar supplemented with antibiotics). The antibiotic resistance of *H. pylori* was measured by its response to antimicrobial amoxicillin and clarithromycin using the agar dilution method.

**Results.** The prevalence of infection for *H. pylori* with histopathological and microbiological tests was 88.7% and 84.7% respectively. The prevalence of resistance of *H. pylori* to antimicrobial amoxicillin was 20.5%, to clarithromycin 19.8%, and to both antibiotics concurrently, 10.9%.

**Conclusions.** A high incidence of clarithromycin-resistant and amoxicillin-resistant *H. pylori* was discovered in patients from Tumaco with chronic gastritis. Dual drug-resistant strains of *H. pylori* to clarithromycin and amoxicillin were also present.

**Keywords:** Drug resistance, microbial; *Helicobacter pylori*, gastritis, amoxicillin, clarithromycin, omeprazole.

### Contribución de los autores:

Mercedes Figueroa: desarrollo de la prueba piloto y estandarización de los procedimientos de microbiología; aislamiento y pruebas de sensibilidad de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas, transcripción, tabulación de resultados, análisis de resultados y redacción y corrección de artículo de investigación.

Álvaro Pazos: elaboración de protocolos de microbiología, coordinación de la toma de muestras gástricas mediante endoscopia y, en el desarrollo de la prueba piloto, estandarización de los procedimientos de microbiología.

Armando Cortés: análisis de los resultados, redacción y corrección del artículo de investigación.

Luis Eduardo Bravo: análisis y tabulación de los resultados; revisión de la redacción y corrección del artículo de investigación.

El cáncer gástrico es multifactorial, está asociado a alteraciones celulares y microambientales de la mucosa gástrica, como resultado de la persistencia de procesos inflamatorios causados principalmente por señales intracelulares inducidas por proteínas citotóxicas propias de *Helicobacter pylori*.

La infección por *H. pylori* prevalece en más de la mitad de la población mundial; es adquirida durante la niñez y persiste por muchas décadas si no es tratada con antimicrobianos.

Actualmente, se acepta que juega un papel prominente en el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas, como el adenocarcinoma gástrico, como múltiples estudios epidemiológicos lo han indicado (1). Una de las estrategias actuales para evitarlas es administrar tratamiento de erradicación de *H. pylori*, debido a que modifica el curso natural de la enfermedad ulcerosa, al disminuir las recidivas, las complicaciones y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, aún se debate sobre qué paciente infectado con *H. pylori* debe tratarse, particularmente en países donde la prevalencia es alta, considerando el alto costo del tratamiento. Los tratamientos de erradicación recomendados por Maastricht III 2006 (2), como el esquema triple que incluye sales de bismuto con amoxicilina y metronidazol e inhibidores de la bomba de protones y dos antimicrobianos como omeprazol y claritromicina y amoxicilina. Estos esquemas terapéuticos logran erradicar la infección en 75 a 80 % de los casos, respectivamente.

Es claro que la erradicación de *H. pylori* de la mucosa gástrica humana ha sido un reto para la comunidad científica, pues el rol de este patógeno parece cambiar su grado de virulencia, quizá por influencia epigenética aún no clara, como la presión en la bacteria producida por los antimicrobianos, permitiendo relacionar el tratamiento de la infección con el cuadro patológico.

Por lo anterior, es importante evaluar la sensibilidad actual *in vitro* de *H. pylori* a los tratamientos usados en los protocolos de erradicación en zonas de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico. El entendimiento de este fenómeno puede contribuir a aclarar el proceso

de carcinogénesis y al diseño de estrategias para su prevención.

De igual manera, es fundamental determinar los patrones de sensibilidad de los antibióticos más usados en una población, para controlar y resolver la infección por *H. pylori*, lo cual tiene especial trascendencia en zonas de alta prevalencia, dado que constituye una buena herramienta para disminuir las cepas resistentes de *H. pylori* (3), que son el principal inconveniente en la erradicación de la infección con los tratamientos de primera línea (amoxicilina más claritromicina más omeprazol).

En Colombia, la población de Tumaco (Nariño) tiene una de las tasas de prevalencia más altas para *H. pylori*, considerada entre 80 y 90 %, y, a pesar de estar situada cerca de una de las áreas geográficas de mayor incidencia de cáncer gástrico en el mundo, tiene una baja prevalencia de esta neoplasia.

La resistencia bacteriana ha significado un verdadero problema en la práctica clínica. Existen grandes variaciones en la prevalencia de resistencia a claritromicina y metronidazol, y, en menor medida, a amoxicilina y tetraciclina; 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 (3,4). En Colombia, actualmente no se usa un esquema terapéutico ideal (5), ni existen criterios estandarizados para evaluar la CIM de los antibióticos amoxicilina y claritromicina, aunque el método de dilución en agar se esté usando con puntos de corte aceptados en el mundo (6).

Este desconocimiento de los patrones de sensibilidad bacteriana en nuestro país, es una de las razones por las que este estudio se justifica, al tener como objetivo determinar la respuesta antimicrobiana *in vitro* de *H. pylori* obtenido a partir de la mucosa gástrica de pacientes provenientes de zonas con 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.

Ante la pregunta de si en esta población de Tumaco existe alta prevalencia de resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *H. pylori* obtenidos a partir de las biopsias gástricas, nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de la infección y de resistencia de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina, en pacientes con gastritis crónica procedentes de zona de bajo riesgo (Tumaco).

Correspondencia:

Mercedes Figueroa, Edificio116, oficina 4001, Universidad del Valle, sede San Fernando, Calle 4D N° 36-00, Cali, Colombia  
Telefax: (572) 518-5623 y 3212100, extensiones 4126 y 4101  
mercedeslab1@gmail.com

Recibido: 23/02/11; aceptado:15/09/11

## Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo con 203 pacientes de ambos sexos con gastritis crónica, con edades entre los 18 y 65 años, procedentes de Tumaco (Costa Pacífica de Colombia) y de todos los estratos socioeconómicos. Los pacientes de este estudio fueron seleccionados en la consulta externa del Hospital de San Andrés de Tumaco, centro asistencial de nivel II de la Costa Pacífica colombiana a quienes, por padecer síntomas de dispepsia, se les ordenó endoscopia digestiva.

Cada paciente fue registrado en la base de datos con un número de identificación específico. Se le hizo, además, una encuesta que incluía datos sociodemográficos y antecedentes clínicos. Un médico gastroenterólogo experimentado, con la ayuda de personal asistencial, obtuvo siete biopsias de mucosa gástrica mediante endoscopia digestiva: cuatro para análisis histopatológico, conservadas en formol en solución tampón, dos de mucosa gástrica del antro y dos de mucosa del cuerpo gástrico, y tres biopsias de mucosa gástrica para conservar en tioglicolato con glicerol al 25 %, dos de mucosa gástrica del antro y una de mucosa del cuerpo gástrico.

Estas biopsias gástricas fueron enviadas con su forma de remisión respectiva, desde Tumaco al Laboratorio de Microbiología y de Histopatología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, en neveras portátiles y en nitrógeno líquido, respectivamente. Las biopsias gástricas de microbiología fueron congeladas a -70 °C (REVCO, Kendrolab, Product ULT 2586-SA37, NJ, USA).

### Procedimientos de histopatología

Cada biopsia obtenida para evaluación histopatológica fue fijada, procesada y examinada por separado, con un protocolo de deshidratación de dos horas, seguida de inclusión en parafina en bloques individuales en las siguientes 24 horas. Posteriormente, se hicieron tres cortes de 6 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos. Después de la fijación durante toda la noche a 56 °C, se colorearon los cortes con hematoxilina y eosina y con coloración de Giemsa modificada (7), para detectar la presencia de *H. pylori*. Los casos negativos se colorearon con tinción de Steinner modificada (8). Finalmente, se evaluaron individualmente las placas mediante microscopía de luz, siguiendo los criterios diagnósticos descritos por la escala visual análoga de Dixon (9). La evaluación microscópica determinó el tipo de gastritis, la respuesta inflamatoria de la

mucosa gástrica y la presencia de la infección por *H. pylori*. Los resultados se registraron en una base de datos relacional.

### Procedimientos microbiológicos

**Aislamiento de *Helicobacter pylori*.** A partir de las tres biopsias gástricas congeladas a -70 °C, y teniendo en cuenta los protocolos de descongelación y de cadena de frío, se maceraron en solución salina al 0,89 % en un tubo estéril Eppendorf con un bolillo plástico desechable con ayuda de un macerador eléctrico (Peller Pestle–Mott–Kontes, Vineland, NJ, USA). Este macerado de la biopsia se sembró por triplicado en agar Columbia con 10 % de sangre de cordero con suplemento de antibióticos (Oxoid, *H. pylori* Selective Supplement SR0147E: vancomicina 5,0 mg, trimetoprim 2,5 mg, cefsulodin 2,5 mg y anfotericina 2,5 mg, Hampshire, England) por agotamiento con un asa calibrada de 10 µl. Inmediatamente después se incubaron en atmósfera microaerófila (incubadora Shel Lab®, Bogotá, Colombia), a 37 °C; al 10% de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad) (incubadora Shel Lab®), a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 10 % y 90 % de humedad, durante diez días (10-13). Los cultivos se evaluaron a partir del tercer día de incubación y se registraron en un formato específico, que incluía identificación de la muestra, días y calidad del crecimiento, los repiques necesarios, la contaminación, y las pruebas de identificación y de sensibilidad a amoxicilina y claritromicina.

Las colonias pequeñas translúcidas, no hemolíticas, convexas de 1 a 2 mm de diámetro aisladas, se identificaron mediante las pruebas ureasa (en 2 ml de solución de urea al 10% con rojo de fenol), catalasa (con peróxido de hidrógeno al 10 %) y oxidasa (método Difco: P-aminodimetilammina, Oxoid, Bogotá, Colombia) y coloración de Gram.

Los aislamientos con escaso crecimiento se repicaron por triplicado en agar sangre sin suplemento. Cuando no hubo crecimiento o fue muy escaso en la siembra inicial, se optó por sembrar la segunda biopsia correspondiente a la curvatura mayor del antro gástrico del mismo paciente, para un nuevo intento de aislamiento de *H. pylori*. Si la situación persistía, se intentaba de igual manera el aislamiento con una tercera biopsia correspondiente al cuerpo gástrico.

Una vez identificado el aislamiento como *H. pylori*, se le practicaron las pruebas de sensibilidad a amoxicilina y claritromicina, a partir de un cultivo no mayor de 72 horas, mediante el método de

dilución en agar (10), teniendo en cuenta que la CIM fue evaluada según las guías desarrolladas por el comité del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (11). Para cada antibiótico, se utilizaron cinco cajas de Petri (55 x 14 mm) que contenían Mueller-Hinton (Oxoid) con suplemento de sangre sin fibrina de cordero (8 %) y las concentraciones por separado de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 µg/ml de cada antibiótico (amoxicilina y claritromicina) (11).

**Preparación, ajuste y siembra del inóculo bacteriano.** A partir de un cultivo de *H. pylori* con no más de 72 horas de incubación (para evitar usar formas cocoides), se tomaron varias colonias, se suspendieron en un tubo Eppendorff con 300 µl de solución salina al 0,89 % y se ajustaron con la escala de McFarland 2 (1 x 10<sup>7</sup> a 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). La turbidez del inóculo se verificó mediante espectrofotometría a 630 nm (ELX 800 Biotex Instrumental, Winooski, VT, USA). Una vez ajustado el inóculo bacteriano, se agregaron 4,0 µl del mismo en las cajas de Petri con las concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 µg/ml de cada antibiótico, partiendo de la concentración menor (0,25 mg/dl), hasta la concentración mayor (4 mg/dl) para evitar el efecto de arrastre.

Posteriormente, se incubaron en atmósfera microaerofílica, a 37 °C, durante 72 horas. Como control de la preparación de las soluciones de antibiótico y las condiciones de la CIM, se utilizó la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504, considerando los puntos de corte de CIM como resistentes a las cepas que crecieron a concentraciones de los antibióticos de más de 0,12 mg/L, tanto para claritromicina como para amoxicilina.

Los aislamientos se consideraron resistentes a claritromicina y amoxicilina cuando la CIM fue mayor o igual a 1 µg/ml. Los aislamientos clínicos se consideraron sensibles cuando la CIM era menor o igual a 0,5 µg/ml. Se consideraron intermedios, cuando la CIM obtenida estuvo entre 0,5 y 1,0 µg/ml (11).

### **Consideraciones éticas**

La toma de muestras de mucosa gástrica de este proyecto fue avalada por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad del Valle, acta No 023, con código 176-08.

### **Análisis estadístico**

Inicialmente, se hizo un análisis univariado, las variables continuas se describieron como promedios y

las categóricas como proporciones. La significancia se estimó con una prueba de ji al cuadrado o de t, dependiendo del tipo de distribución.

Los aislamientos se clasificaron como cepas sensibles o resistentes. Para examinar la relación de la resistencia bacteriana con los datos demográficos y clínicos, se hizo un análisis bivariado con estratificación por edad y sexo.

Los datos obtenidos se almacenaron en un sistema de base de datos, en la que se incluyeron las tablas con información individualizada para cada conjunto de datos.

### **Resultados**

En el estudio participaron 203 pacientes, 144 mujeres (70,9 %) y 59 hombres (29,1%), con edades comprendidas entre los 19 y los 68 años, con una edad promedio de 40±2 años. Se encontró que 9,4 % de los pacientes poseía un pariente con cáncer de estómago, 45,3 % había sufrido alguna enfermedad, 23,2 % se encontraba en situación de hacinamiento (convivían más de tres personas por cuarto), 66 % había fumado alguna vez tabaco y 88,2 % actualmente fumaba tabaco. También, se halló que 82,3 % no adicionaba sal a los alimentos, 55,7 % tenía un consumo moderado de sal y 60,6 % no consumía alcohol (no se presentan los datos).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* fue de 88,7 % y 84,7 % por histopatología y por cultivo, respectivamente. Al usar ambos métodos diagnósticos, se obtuvo una prevalencia de 94,0 %. La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a amoxicilina, claritromicina y a ambos antibióticos, mediante el método de dilución en agar, fue 20,5 %, 19,8 % y 10,9 %, respectivamente (cuadro 1).

Al asociar la resistencia antimicrobiana con grupo de edad, sexo y tipo de gastritis, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ambos antibióticos (p=0,58 y p=0,35, p>0,05). Igualmente, no se hallaron diferencias al asociar la prevalencia de la infección por *H. pylori* con el sexo, la edad (cuadro 2), el tabaquismo, el consumo de alcohol, ni el hecho de vivir en hacinamiento (no se presentan los datos).

### **Hallazgos histológicos**

En todas las muestras de histopatología se observó gastritis crónica, en 74,9 % hubo gastritis no atrófica y en 88,7 % se detectó infección por *H. pylori* (no se presentan los datos). Al asociar la prevalencia de la infección según el diagnóstico histológico con la resistencia a amoxicilina y claritromicina, no

**Cuadro 1.** Prevalencia de resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* obtenido a partir de las biopsias gástricas

Antimicrobiano	S	R	%R
Amoxicilina	116	30	20,5
Clarithromicina	117	29	19,8

S: sensible; R: resistente; %R: porcentaje de resistencia

se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (cuadro 3).

**Hallazgos de microbiología**

De 203 biopsias gástricas procesadas para aislamiento de *H. pylori*, se obtuvieron 172 cultivos positivos. El éxito del aislamiento de *H. pylori* fue de 48,28 %, procesando sólo la biopsia de antro sobre la curvatura menor, el cual se incrementó a 66,0 % al adicionar la muestra del antro sobre la curvatura mayor. Al sembrar la tercera biopsia correspondiente al cuerpo gástrico, se obtuvieron 33 más, para un total de 172 aislamientos que representaron el 84,7 %.

**Evaluación de aislamientos de Helicobacter pylori**

De los 172 cultivos (84,7 %) que fueron positivos para *H. pylori*, sólo a 146 aislamientos (85 %) se les pudo practicar óptimamente todas las pruebas de identificación y de sensibilidad; 26 de los aislamientos eran muy escasos para cumplir con este

propósito, a pesar de la insistencia con repiques por triplicado. No se obtuvieron aislamientos de *H. pylori* en 36 pacientes (17,7 %), a pesar de haberse hecho varias siembras de las tres porciones gástricas, probablemente por la ausencia real de colonización de *H. pylori* o por la labilidad propia del germen a las condiciones de transporte o manipulación *in vitro* (6). Todos estos inconvenientes constituyen limitaciones para este estudio.

Durante el proceso de aislamiento de *H. pylori*, 79 biopsias (39 %) requirieron sólo una siembra, mientras 93 biopsias (61 %) necesitaron repiques para su aislamiento, debido al escaso crecimiento de *H. pylori* o al insuficiente inóculo requerido para las diferentes pruebas de sensibilidad necesarias para evaluar la resistencia bacteriana. El 80,3 % de los aislamientos se obtuvo a partir de antro gástrico y, el 19,7 %, de cuerpo gástrico.

**Sensibilidad de aislamientos de Helicobacter pylori a amoxicilina y claritromicina**

Con base en los 146 aislamientos en que se determinó la CIM para amoxicilina y claritromicina, se observó una prevalencia de resistencia a amoxicilina, a claritromicina o a ambos antibióticos de 20,5 %, 19,8 % y 10,9 % respectivamente. El 79,5 % de los aislamientos fué sensible a una concentración menor o igual a 0,5 mg/l de amoxicilina y de claritromicina. Ambos antibióticos

**Cuadro 2.** Relación entre datos demográficos y resistencia a claritromicina y amoxicilina de *Helicobacter pylori* aislado a partir de biopsias gástricas de pacientes procedentes de Tumaco

Característica sociodemográfica	n	Resistencia antimicrobiana	
		Amoxicilina (%)	Claritromicina (%)
<b>Edad (años)</b>			
19-35	12	24,0	18,0
36-47	8	16,7	22,9
48-68	11	22,9	22,9
<b>Sexo</b>			
Masculino	11	24,4	22,2
Femenino	20	19,8	20,8

**Cuadro 3.** Prevalencia de *Helicobacter pylori* según diagnóstico histológico y sexo.

Tipo de gastritis	Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i>				Total %
	Hombres		Mujeres		
	n	%	n	%	
Gastritis no atrófica	41	69,49	111	77,1	74,88
Gastritis atrófica sin metaplasia	7	11,86	14	9,72	10,34
Gastritis atrófica con metaplasia	11	18,65	18	12,5	14,29
No evaluable	0	0	1	0,69	0,49
Total	59	100	144	100	100

tuvieron un comportamiento unimodal y ningún aislamiento presentó una CIM a amoxicilina o claritromicina alejada del resto de la población estudiada. Se observó un buen comportamiento de la cepa de control ATCC 43504, la cual no creció a concentraciones del antibiótico superiores a 0,25 mg/L, tanto para claritromicina, como para amoxicilina (11). Al correlacionar la sensibilidad antibiótica con los datos demográficos como edad, sexo y hacinamiento, no hubo diferencias significativas. Igualmente, la asociación entre el tipo de gastritis y la resistencia antimicrobiana a amoxicilina y claritromicina, no resultó significativa ( $p > 0,05$ ) (cuadro 3).

### Discusión

La infección por *H. pylori* prevalece en todo el mundo, principalmente en los países en desarrollo (12), como se confirmó en esta muestra de pacientes de Tumaco, donde se detectó una prevalencia de la infección de 94,0 % utilizando ambos métodos diagnósticos. Al usar sólo el método histopatológico (sensibilidad de 97 % y especificidad de 98 %) (14), se encontró una prevalencia de 88,7 % en todos los fragmentos gástricos analizados. Mediante el cultivo (sensibilidad, 85 a 95 % y especificidad, 96 a 100 %) (10,14), se obtuvieron resultados similares (84,7 %), teniendo en cuenta que para este diagnóstico fue necesario analizar, al menos, tres fragmentos de mucosa gástrica, a diferencia del método histológico. El aislamiento de la bacteria se incrementó de 47,3 % con una sola muestra, a 84,7 % al sembrar tres porciones gástricas (dos biopsias de antro y una de cuerpo gástrico), lo que indica la variabilidad de *H. pylori* para colonizar la diferentes partes de la mucosa gástrica del huésped (14).

En este estudio, el aislamiento de *H. pylori* no fue óptimo en 36 biopsias (17,7 %) debido, principalmente, a la presencia de contaminación por oportunistas ambientales (no se presentan los datos) (14). Además, a 26 de los aislamientos no se les pudo practicar el antibiograma, por los repiques fallidos realizados a partir de una sola colonia obtenida, quizá por la baja densidad de bacterias presentes en el momento de la toma de la muestra gástrica o por la labilidad percibida persistentemente durante todo el proceso del cultivo (13,14) (no se presentan los datos).

A pesar de que el cultivo se considera el método de referencia para determinar la sensibilidad antimicrobiana de *H. pylori* (15), existen limitaciones

que incluyen su alto costo, la preparación laboriosa de los medios de cultivo y la dificultad de obtener valores reproducibles en un mismo laboratorio y entre diferentes laboratorios (6,13,16), por lo cual se mantiene el interrogante sobre cuál es la verdadera resistencia de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos recomendados (6,17,18) para los diversos tratamientos.

*Helicobacter pylori* es sensible a un amplio número de antibióticos (amoxicilina, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, imidazoles); sin embargo, *in vivo* todos fracasan al ser utilizados como monoterapia, debido a múltiples razones, como la falta de actividad del antibiótico con pH bajo, lo que hace que el uso de inhibidores de bomba de protones sea imprescindible para potenciar la acción antimicrobiana (18).

En general, la prevalencia de resistencia antimicrobiana en *H. pylori* registrada en los últimos años en diferentes países del mundo (19,20,21,22) (cuadro 4), ha permitido que se tomen medidas de continua vigilancia de la resistencia antimicrobiana, tanto a nivel regional como nacional, debido a que ha constituido una herramienta útil para disminuir las cepas resistentes a los antibióticos y para determinar los tratamientos de erradicación adecuados en una región específica; teniendo en cuenta, además, que deben conocerse no sólo los perfiles de resistencia antimicrobiana, sino el costo, los efectos colaterales, su fácil administración y su eficacia *in vivo*, para que la dosis del antimicrobiano sea suficiente para neutralizar la concentración bacteriana presente en la mucosa gástrica (19).

*Helicobacter pylori* ha desarrollado otros mecanismos de resistencia para sobrevivir, como la presión por selección generada después de monoterapias utilizadas contra infecciones diferentes a la de *H. pylori*, mecanismo que permite que sobrevivan o se seleccionen en la mucosa gástrica sólo las bacterias con mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana (18). Este mecanismo disminuye al asociar el antibiótico con un inhibidor de la bomba de protones y varía de acuerdo con la prescripción anterior del antibiótico por el médico, debido a que, entre más se use el antibiótico, más presión por selección se observa, como sucede principalmente con los macrólidos. Por el contrario, se ha observado en el mundo que la resistencia de *H. pylori* a amoxicilina es menor, a pesar de que la bacteria se haya expuesto durante mucho tiempo a este antimicrobiano por mecanismos aún no claros (18). Esta puede ser una de las razones por las que en

**Cuadro 4.** Resistencia mundial de *Helicobacter pylori* a claritromicina y amoxicilina

<b>País</b>	<b>Autores</b>	<b>ClaR</b>	<b>AmxR</b>
<b>Norte América</b>			
Alaska	Parkinson, et al., Gut. 1999;45(Suppl.111):A15.	26,3	ND
Estados Unidos	Laine, et al. Am J Gastroenterol. 2000;95:3393-8. 10,6	0,1	
Estados Unidos	Laine, et al. Am J Gastroenterol. 2000;95:3393-8. 10,6	0,1	
Estados Unidos	Duk, Gold, et al. Emerg Infect Dis. 2004;10:1008-94. 12	0,9	
Estados Unidos	Mégraud, et al. Gut. 2004;53:1374-84.	12,2	ND
Canadá	Fallone. Can J Gastroenterol. 2000;14:879-82.	12	0
México	Torres, et al. J Clin Microbiol. 2001;39:2677-80.	24	ND
<b>Centroamérica</b>			
Costa Rica	Riva, 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;53:374-7.	8	ND
<b>Suramérica</b>			
Brasil	Prazeres-Magalhães. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:2021-3.	9,8	29
Brasil	Ortiz, et al. BCM Gastroenterol. 2003;3:1-6.	16	38
Brasil	Vallejos, et al. Rev Méd Chile. 2007;135:287-93.	7	ND
Venezuela	Urrestarazu, et al. Rev Soc Ven Microbiol. 2003;23:14-5.	7	0
Colombia	Yepes, et al. Acta Médica Colombiana. 2008;33:1:11-4.	63,1	9,5
Colombia	Henao, et al. Rev Col Gastroenterol 2009;24:110-4.	15	ND
Colombia	Trespalacios, et al. Rev Col Gastroenterol. 2010;25:32-8.	17,7	3,8
Colombia	Álvarez, et al. Rev Méd Chile. 2009;137:1309-14.	3,8	0
Ecuador	Debets, et al. J Antimicrob Chemother. 2003;51:141-5.	9,5	0
Perú	Vásquez. J Clin Microbiol. 1996;34:1232-4.	50	0
Chile	Vallejos, et al. Rev Méd Chile. 2007;135:287-93.	20	ND
Paraguay	Fariña, et al. Rev Méd Chile. 2007;135:1009-14.	2,2	2,2
Uruguay	Torres et al. Rev Esp Enferm Dig. 2009;101:11:757-62.	12	0
Argentina	Vega, et al. Int J Infect Dis. 2010;14:85-92.	27,8	0
<b>Europa</b>			
España	López-Brea, et al. J Antimicrob Chemother. 2001;48:295-7.	21,1	0
Francia	Birac. Gut. 1999;45(Suppl.111):A107.	15,8	0
Bélgica	Bontems, et al. Pediatr Infect Dis J. 2001;20:1033-8.	16	0
Francia	Birac. Gut. 1999;45(Suppl.111):A107.	15,8	0
Portugal	Cabrera, et al. J Antimicrob Chemother. 2000;46:1029-31.	22	0
Austria	Crone, et al. Gastroenterol Nutr. 2003;36:368-71.	20,3	0
Bulgaria	Fochesatto, et al. Revista de Postgrado Cátedra Medicina. 2004;138:11-7.	11,4	0
Alemania	Dammann, et al. Korean J Gastroenterol. 2004;44:126-35.	4,4	ND
Suecia	Storskurubb, et al. Helicobacter. 2006;11:224-30.	1,5	0
Italia (norte)	Pilotto, et al. Dig Liver Dis. 2000;32:763-8.	1,8	0
Italia (central)	Toracchio, et al. Dig Liver Dis. 2003;35:541-5.	23,5	0,2
Italia	Romano, et al. J Clin Pathol. 2008;61:1112-5.	18	0
Bulgaria	Boyanova, et al. J Med Microbiol. 2006;55:65-8.	12,5	1,5
Polonia	Dzierzanowska-Fangrat. Int J Antimicrob Agents. 2001;18:387-90.	23,5	ND
<b>Asia</b>			
Irán	Kohanteb, et al. Indian J Microbiol. 2007;25:374-7.	20,8	9,4
Japón	Kato, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2214-6..	12,9	0
Japón	Kobayashi I, et al. J 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, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4843.	13,8	18,5
China	Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología, 2010. Acta Gastroenterol Latinoam. 2010;21:165-81.	4	ND
India	Datta, et al. Aliment Pharmacol Ther. 2005;22:51-7.	44,7	32,8
Malasia	Khean-Lee, et al. Helicobacter. 2011;16:241-5.	0	0
<b>África</b>			
Nigeria	Aboderin, et al. Afr Health Sci. 2007;3:143-7.	100	100
Nigeria	Ani AE, et al. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93:659-661	13	0
<b>Oceanía</b>			
Australia	Alarcón, et al. Rev Esp Quimioterap. 2002;15:341-5.	11	ND
Nueva Zelanda	Fraser, et al. Aust N Z J Med.1999;29:512-6.	6,8	ND

ClaR: prevalencia de resistencia a claritromicina; AmxR: prevalencia de resistencia a amoxicilina;  
 ND: no determinado

varios estudios se observa una mayor prevalencia de resistencia a claritromicina que a amoxicilina (6,18).

Las prevalencias de resistencia de *H. pylori* a claritromicina en el mundo, varía entre 1 y 44,7 % (20), aunque existan prevalencias mayores de 58 % (20-22) y hasta de 100 % en Nigeria (23) (cuadro 4). La prevalencia de resistencia *in vitro* a claritromicina encontrada en esta investigación (19,8 %), es similar a la registrada en países europeos, como Italia (18 % y 23,4 %) y Portugal (22 %) (14, 18,19), o parecida a las encontradas en países latinoamericanos como Uruguay, Chile y México, con prevalencias de resistencia de 19,4 %, 20 % y 25 %, respectivamente (17). Otros países, como Ecuador y Brasil, han reportado prevalencias menores de 9,5 % y 9,8 %, respectivamente, lo que permite confirmar que la prevalencia de resistencia a claritromicina depende del área geográfica, como lo refieren estudios previos (6) (cuadro 4).

Estas son razones válidas para justificar la pérdida de eficacia del triple tratamiento con omeprazol, claritromicina y amoxicilina sugerida por el último consenso de Maastricht III, y por las que actualmente se cuestiona su uso en los diferentes esquemas de tratamiento (6,19, 22). Sin embargo, otros autores describen que la resistencia a claritromicina *in vitro* no es el único factor que afecta la erradicación de la bacteria, debido a la influencia de otros factores, tanto del huésped como de *H. pylori*, como la densidad bacteriana en mucosa gástrica, la presencia eventual de bacterias intracelulares, el escaso cumplimiento del tratamiento, la dosis y la duración del tratamiento (1), las propiedades farmacológicas de los antibióticos y la baja reproducibilidad de los resultados *in vitro* (6,14).

Con respecto a los estudios previos realizados en Colombia, nuestros hallazgos de la prevalencia de resistencia a claritromicina de 19,8 %, no se alejan de los encontrados en dos estudios anteriores en adultos en Bogotá (24,25), que reportaron una prevalencia de resistencia a claritromicina de 15 % y 17,7 %, respectivamente, aunque hayan sido practicados con técnicas de sensibilidad similar al método de dilución en agar ó método de referencia (10). Otro estudio en Bogotá registra, por el contrario, una prevalencia alta de resistencia a claritromicina (63,1 %) (26). En un trabajo de investigación llevado a cabo en Armenia mediante el método E-test, se detectó poca resistencia a claritromicina (2,2 %) en 33 aislamientos de *H. pylori* (27). Estas diferencias pueden justificarse probablemente por el uso de

métodos para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana (E-test y difusión de discos o Kirby-Bauer) diferentes al método de referencia de dilución en agar (6,11), usado en este estudio, o, quizá, por la existencia de factores relacionados con la población, como ubicación geográfica, poca vigilancia en el uso de antibióticos, mayor o menor cubrimiento de los antimicrobianos por los planes obligatorios de salud, o por las razones que Castro, *et al.*, mencionan en estudios previos (6).

En este estudio, la mayoría de los aislamientos resistentes a amoxicilina crecieron hasta una CIM de 1,0 ng/ml (60 %), lo que indica un patrón de resistencia *in vitro* homogéneo e intermedio.

Con referencia a la prevalencia global de resistencia de *H. pylori* para amoxicilina, esta varía entre 0 y 41 % (20). Muchos autores refieren que la resistencia *in vitro* a amoxicilina es muy escasa en aislamientos clínicos de *H. pylori* provenientes de pacientes de los países desarrollados (<1 %), como Estados Unidos (1 %), o los países europeos (0 %) (28) (cuadro 4). Resultados similares se han encontrado en Latinoamérica, en Chile y Paraguay (2,2 %) (29). Sin embargo, estos registros son superados por Brasil (38 %) (30) y África (100 %) (23), con prevalencias superiores a nuestros hallazgos en Tumaco (21,2 %). Corea registra una prevalencia similar (18,5 %) (31), detectada mediante el método de dilución en agar. Otros estudios, en los que se usaron otras metodologías (E-test, difusión en disco), difieren de nuestros resultados, probablemente por las razones citadas anteriormente por Mégraud, *et al.* (18) (cuadro 4). La variedad observada en la resistencia a amoxicilina (cuadro 4) permite confirmar los resultados de estudios preliminares (32-33), que se refieren a los múltiples factores que influyen en los perfiles de resistencia antimicrobiana, tanto de la bacteria, intrínsecos (permeabilidad reducida en la membrana bacteriana, causada generalmente por mutaciones específicas del gen *pbp1A* o por bombas de eflujo) y extrínsecos, como del huésped (18,34).

En Colombia, se han registrado diferentes prevalencias de resistencia a la amoxicilina, como las siguientes: 0 % (27), 3,5 % (25), 7 % (26) y 9,5 % (35), que confirman la variabilidad en los registros, por las razones que Castro, *et al.*, refieren en diferentes estudios (6), relacionados con los diferentes factores que influyen en la presencia de resistencia antimicrobiana ya citados anteriormente (6,25), como la diferencia en los métodos feno-

típicos usados para determinar la resistencia antimicrobiana, como el método E-test que, a pesar de tener buena correlación con el método de referencia de dilución en agar, puede incrementar la CIM en algunos antibióticos hasta entre 10 y 20 % (6).

Es importante tener en cuenta que los estudios preliminares refieren que, a diferencia de la claritromicina, aún no existen criterios estandarizados para determinar la CIM de algunos antibióticos como la amoxicilina, las tetraciclinas, la rifabutina y el levofloxacin (6), aunque se admita utilizar el método de dilución en agar como técnica de elección para determinar los puntos de corte (36,37).

Actualmente, no existe un punto de corte o CIM estándar que determine los aislamientos de *H. pylori* resistentes a la amoxicilina, aunque en algunos países, se admitan como resistentes CIM de 0,25 mg/ml o más (38) o de 0,5 mg/ml o más (39). En nuestra población colombiana aún no se ha determinado este rango de la CIM para amoxicilina.

En este estudio, las prevalencias de resistencia a amoxicilina y a claritromicina fueron similares (20,5 % Vs. 19,8 %), posiblemente por la prescripción de estos antibióticos, no controlada ni exclusiva de los médicos, para tratar otras infecciones como las respiratorias. Es importante aclarar que en Colombia la prescripción de la amoxicilina es mayor que la de claritromicina, posiblemente atribuible a su mayor cubrimiento por el Plan Obligatorio de Salud (POS) (18,25). Es relevante, también, tener en cuenta que aparte de la determinación fenotípica de la resistencia *in vitro* de *H. pylori* a amoxicilina y claritromicina, deben realizarse otros estudios genotípicos que puedan dilucidar las posibles causas intrínsecas de la bacteria para que pierda sensibilidad antimicrobiana, como las mutaciones puntuales en diversos genes (*pbp1A*, *23s rRNA*, *marA* y *marB*, *blaTEM-1*) relacionadas con los diferentes mecanismos de resistencia (40,41), adquiridas mediante transferencia horizontal o vertical de genes o por medio de plásmidos (6). En general, los resultados de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* son controversiales, debido a que no se sabe la realidad o verdad específica sobre la resistencia de esta bacteria a los diferentes antibióticos (18,19).

Ante las dificultades para el aislamiento mediante cultivo de *H. pylori*, se ha recurrido al método histopatológico como patrón de referencia para el

diagnóstico de la infección (14). Nuestros hallazgos permiten concluir que el cultivo es igual de eficaz que el método histopatológico, teniendo en cuenta que se deben analizar, al menos, tres fragmentos de mucosa gástrica obtenidos tanto del antro como del cuerpo gástrico.

Es importante expresar que al emplear los dos métodos diagnósticos, la detección de la infección por *H. pylori* en mucosa gástrica es mayor (94 %), lo cual permite concluir que estos dos métodos son complementarios.

La prevalencia de resistencia a amoxicilina, claritromicina y a ambos antibióticos, encontradas en este trabajo, establecen una base fundamental para adoptar nuevos esquemas de erradicación de la bacteria en la población de Tumaco, teniendo en cuenta que son necesarios los ensayos clínicos multicéntricos para definir las CIM indicadas en estas zonas de alta prevalencia de la infección por *H. pylori*. Además, es vital determinar las causas intrínsecas y extrínsecas de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos más usados en esta población. Por estas razones, el conocer las mutaciones puntuales en los genes implicados en la resistencia bacteriana y su relación con factores de virulencia de *H. pylori*, permite conocer las posibles causas de pérdida de sensibilidad antimicrobiana.

Actualmente, para entender mejor estos mecanismos de resistencia, nuestro grupo de investigación complementa este estudio determinando la asociación entre mutaciones puntuales de estos genes y los factores de virulencia de *H. pylori*.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

### Financiación

Agradecemos a los entes financiadores, como Colciencias (Resolución No 1106-408-20549 RC 3012007) y la Universidad del Valle.

### Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, y al Laboratorio de Histopatología del Departamento de Patología de la Universidad del Valle, que permitieron utilizar las instalaciones para desarrollar esta investigación.

Al Hospital San Andrés de Tumaco, que permitió utilizar sus instalaciones para la toma de las muestras clínicas de esta investigación.

## Referencias

1. **Malfertheiner P, 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.
2. **Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M.** Un modelo para la epidemiología del cáncer gástrico. *Lancet*. 1975;ii:58-60.
3. **International Agency for Research on Cancer.** Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 1994. p. 177-24.
4. **Branca G, Spanua T, Cammarota G, Schitoc A, Gasbarrinid A, Gasbarrinib G, et al.** 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;5:433-8.
5. **Lizarazo JI.** Tratamiento del *H. pylori*. *Rev Col Gastroenterol*. 2009;24:2:101-103
6. **Castro M, Vargas J.** Infección por *Helicobacter pylori*. Prevalencia, investigación y repercusión de la resistencia antibiótica. *Rev Esp Enferm Dig*. 2009;101:395-402.
7. **Madan E, Kemp J, Westblom U, Subik M, Sexton S, Cook J.** Evaluation of staining methods for identifying *Campylobacter pylori*. *Am J Clin Pathol*. 1988;90:450-3.
8. **Garvey W, Fathi A, Bigelow F.** Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. *J Histotechnol*. 1985;8:15-7.
9. **Dixon MF, Yardley JH, Correa P.** Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1161-81.
10. **Ramírez-Ramos A, Sánchez-Sánchez R.** *H. pylori* 25 años después (1983-2008): epidemiología, microbiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Rev Gastroenterol Perú*. 2009;29:158-70.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
12. **Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:720-41.
13. **Majalca-Martínez C, Rivera-Cabrera J, Ochoa-Pérez SA, Giono-Cerezo S.** Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*. 2001;26:85-9.
14. **Mégraud F, Lehours P.** *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:280-322.
15. **Pajares JM, Pajares-Villarroya R, Gisbert JP.** *Helicobacter pylori* infection: Antibiotic resistance. *Rev Esp Enferm Diag*. 2007;2:63-70.
16. **Malbrán C.** Manual de procedimientos para la determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires: INEI-ANLIS; 2001. p. 39-66.
17. **Torres ME, Pérez G, Olivares A, Fernández L, Raisler K, González N, et al.** Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* and mechanisms of clarithromycin resistance in strains isolated from patients in Uruguay. *Rev Esp Enferm Diag*. 2009;101:757-62.
18. **Mégraud F, Corti R.** Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2009;39:282-90.
19. **Mégraud F.** *H. pylori* antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004;53:1374-84.
20. **Kohanted J, Bazargani A, Saberi-Firoozi M, Mobasser A.** Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* to selected agents by agar dilution method in Shiraz-Iran. 2007;25:374-7.
21. **van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WG, de Boer AW.** Importance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA status for the efficacy antibiotic treatment. *Gut*. 2000;46:321-6.
22. **Glupczynski Y, Megraud F, López-Brea M, Anderson L.** European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20:820-3.
23. **Aboderin OA, Abdu AR, Odetoyin B, Okeke IN, Lawal OO, Ndububa DA, et al.** Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. *Afr Health Sci*. 2007;7:143-7.
24. **Henao SC, Otero W, Ángel LA, Marín JD.** Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *H. pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2009;24:10-5.
25. **Trespalcios A, Otero W, Mercado M.** Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2010;25:31-8.
26. **Yepes CA, Rodríguez A, Ruiz A, Ariza B.** Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*. 2008;33:11-4.
27. **Álvarez 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.
28. **Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Józwiak P, Celińska-Cedro D, Madaliński K, Dzierzanowska D.** Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from children in Poland. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:387-90.
29. **Fariña N, Kasamatsu E, Samudio M, Morán M, Sanabria R, Laspina F.** Antimicrobial susceptibility of *H. pylori* strains obtained from Paraguayan patients. *Rev Med Chil*. 2007;135:1009-14.
30. **Duk 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.
31. **Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim SG, Jung HC, Song IS.** Comparison of primary and secondary antimicrobial

- minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:6-13.
32. **Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG.** *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:699-709.
  33. **Dore M, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepúlveda AR.** Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43:47-54.
  34. **van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, van der Wouden EJ, Gerrits MM, JG Kusters.** Stable amoxicillin in *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1998;352:1595.
  35. **Gutiérrez O, Otero W.** *Helicobacter pylori* y resistencia al metronidazol en Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol*. 1998;13:31-3.
  36. **Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Davidkov L, Kamburov V, Jevlev C, et al.** Prevalence and evolution of *H. pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60:409-15.
  37. **Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX.** Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:121-3.
  38. **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;59:421-3.
  39. **Han Sr, Bhakdi S, Maeurer MJ, Schneider T, Gehing S.** Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: Should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? *J Clin Microbiol*. 1999;37:2740-1.
  40. **Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC.** Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol*. 2008;14:5217-22.
  41. **Tseng YS, Wu DC, Chang CY, Kuo CH, Yang YC, Jan CM, et al.** Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:807-12.