

Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares

Cristián Vallejos M^a, Oscar Cerda A^a,
Manuel Valenzuela V^a, Héctor Toledo A

Antimicrobial resistance of Helicobacter pylori. Clinical and molecular aspects

Helicobacter pylori is a relevant pathogen for gastroduodenal diseases in human beings. Although its eradication often improves gastroduodenal diseases, *H pylori* is acquiring an elevated rate of resistance to various antimicrobials, such as metronidazole, clarithromycin, tetracycline and amoxicillin. Multi-drug resistance is a major problem to select the appropriate treatment of infectious diseases. To improve our understanding on the complexity of the problem, in this article we review the resistance mechanisms and give an update on *H pylori* antimicrobial resistance (Rev Méd Chile 2003; 131: 1313-20).

(Key Words: Antibiotics, combined; Drug therapy, combinations; *Helicobacter pylori*; Microbial sensitivity tests)

Recibido el 12 de mayo, 2003. Aceptado en versión corregida el 25 de agosto, 2003. Trabajo financiado por el Proyecto AMAYOR 02/4-2 del D.I.D., Universidad de Chile. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

^aEstudiante tesista de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Correspondencia a: Héctor Toledo A, PhD. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina; Universidad de Chile. Casilla 70086, Santiago-7, Chile. Teléfono: (562) 678 6053; Fax: (562) 735 5580. E mail: htoledo@machi.med.uchile.cl.

Helicobacter pylori es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica humana¹, 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 gastroduodenal². Todas las personas infectadas desarrollan una inflamación gástrica crónica que generalmente es asintomática, mientras que en algunas personas provoca úlcera péptica^{3,4}. En otros pacientes se puede observar la aparición de úlcera duodenal en parte mediada por la desregulación 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 idiopáticas⁵. 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 tumores⁶. Ocasionalmente, la reacción del huésped 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 mucosa⁷⁻⁹.

La colonización por *H pylori* es de alrededor de 30 a 50% de las personas en los países desarrollados mientras que en los países en vías de desarrollo puede exceder a 80%¹⁰. Esta condición se atribuye a las pobres condiciones sanitarias existentes en estas sociedades, que determinan frecuentes exposiciones al patógeno. En los países industrializados, en cambio, la prevalencia de la infección es significativamente menor, observándose este cuadro en la mitad de la población de adultos mayores y en alrededor de un décimo de la población joven^{8,10}. La infección se produce inicialmente durante la infancia a partir de otro miembro de la familia.

En Chile, la información recopilada correspondiente al período diciembre 1985 - diciembre

1995, señala que la infección por *H pylori* es bastante frecuente en pacientes con una variedad de patologías gástricas. El 100% de los pacientes con úlcera duodenal y el 86% de los pacientes con gastritis presentaron niveles altos de IgG anti *H pylori*. Entre los adultos asintomáticos, 75% presentó IgG anti *H pylori*¹¹. Sin embargo, de acuerdo a la condición geográfica y socioeconómica, entre 43% y 92% de los adultos y entre 6% y 100% de los niños presentaron IgG anti *H pylori*¹¹.

En la actualidad, instituciones como el *National Institute of Health* de los Estados Unidos, el *Maastricht Consensus* en Europa y el Consenso Canadiense, recomiendan terapia antibiótica en algunas de las patologías gastro-duodenales asociadas a la infección por *H pylori*¹². Los regímenes de erradicación más utilizados hoy en día consideran una combinación de tres drogas, las que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos. Con este esquema terapéutico se consigue una erradicación de 70 al 90%¹³. Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina (Amx), tetraciclina (Tc), metronidazol (Mtz) y claritromicina (Cla).

En los países industrializados, los actuales tratamientos tienen 85-90% de éxito en la erradicación de las cepas sensibles a antibiótico¹⁴. Sin embargo, las causas de los fracasos en la terapia muchas veces no quedan claros, aunque la resistencia a los antibióticos sería el principal factor explicativo. Por otra parte, el origen de la biopsia (antro o cuerpo) para determinar la resistencia a antibióticos puede inducir a error y subestimar la prevalencia de la resistencia a antibióticos, ya que en un mismo paciente se puede obtener aislados de *H pylori* sensibles y resistentes a antibióticos¹⁵. No hay dudas que el mal uso de estas drogas ha contribuido al incremento en la velocidad de resistencia.

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*. 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^{16,17}.

Otro antibiótico en el que se observa un alarmante crecimiento en la velocidad de aparición de resistencia es Cla. Registros anuales en Estados Unidos de Norteamérica señalan entre 7 y 14% de casos resistentes a este antibiótico¹⁸.

Estado de la resistencia a antibióticos en Helicobacter pylori. Existe una creciente preocupación en torno al uso masivo de los antibióticos y a la amenaza de emergencia de organismos patógenos resistentes a los antibióticos disponibles. Es ampliamente aceptado que el tratamiento para erradicar *H pylori* en pacientes con úlcera péptica debidamente diagnosticados, es beneficioso tanto para el paciente como para la sociedad. Sin embargo, aún persiste una gran controversia en relación al beneficio de tratar a los pacientes con dispepsia para erradicar la bacteria^{19,20}. Un argumento en contra del tratamiento de estos pacientes es que el régimen con antibióticos puede tener como consecuencia tanto un aumento en la emergencia y persistencia de cepas resistentes, como el desarrollo de otros microorganismos resistentes en el tracto gastrointestinal²¹.

La recopilación de la información mundial publicada entre los años 1993 y 1997 destaca la influencia de la eficiencia del tratamiento con Mtz, calculándose que la tasa de erradicación es de 90% en cepas sensibles, pero menor a 75% en cepas resistentes a este antibiótico, aunque la elección de otras drogas y la duración del tratamiento influyen en la eficiencia final de éste²². Por otra parte, datos recopilados entre 1983 y 1997, muestran que la resistencia a Mtz reduce el éxito de la terapia en un promedio de

37,7%, mientras que la frecuencia de resistencia en aislados clínicos varía desde 10% en Japón²³ a 90% en India²⁴, alcanzando 50% o más entre las cepas aisladas en Estados Unidos y Europa Occidental^{25,26}. Estudios de González et al²⁷, realizados con cepas aisladas en Concepción, Chile, muestran que la frecuencia de resistencia a Mtz y Cla en esta región son 41,8% y 2,2%, respectivamente. Lo más notable fue encontrar que la resistencia a Cla reduce la efectividad del tratamiento en 55%²⁸. Un estudio reciente realizado en Alemania mostró que 86% de 554 cepas aisladas de pacientes en los cuales una o más terapias de erradicación habían fallado, fueron resistentes a Cla y Mtz simultáneamente²⁹.

La incidencia de resistencia a Mtz generalmente es paralela al nivel de uso de la droga y varía geográficamente, observándose que más de la mitad de las cepas resistentes provienen de los países en desarrollo, mientras que entre 10 y 30% provienen de USA y Europa Occidental.

Mecanismo de resistencia a Claritromicina. La resistencia a Cla se ha podido comprender bien porque se conoce el mecanismo de acción del antibiótico. Este actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse directamente al RNA ribosomal (rRNA) 23S de la subunidad mayor del ribosoma. Análisis genéticos han mostrado que la resistencia se desarrolla debido a la aparición de diversas mutaciones puntuales en el gen del rRNA 23S y, específicamente, en la región de la actividad peptidil-transferasa, en el dominio V^{30,31}. *H pylori* posee dos genes que codifican el rRNA 23S. El mecanismo de resistencia a Cla se debería a una disminución de la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma, de modo que no se afecta la síntesis de proteínas³².

Los ensayos moleculares para detectar la resistencia a Cla están basados en la detección de las mutaciones producidas en los genes del rRNA 23S. El ensayo, descrito por primera vez en 1996³¹, utiliza la reacción de la polimerasa en cadena asociada al análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). En este ensayo, se amplifica la región que contiene la o las mutaciones y luego los fragmentos sintetizados son tratados con

endonucleasas de restricción que reconocen sitios específicos creados por las mutaciones. El tamaño de los fragmentos resultantes indica la presencia o ausencia de la mutación. Por ejemplo, la mutación puntual que reemplaza el residuo de guanina en la posición 2142 del gen por uno de adenina (A2142G) crea un sitio de restricción para la endonucleasa *MboII*, produciéndose con ésta dos fragmentos de 700 pares de bases que comigran. Mientras que, la generación de la mutación puntual A2143G crea un sitio que es reconocido por la endonucleasa *BsaI*. Estudios realizados en mayor detalle señalan que las cepas que portan la mutación A2142G presentan mayor resistencia a Cla^{33,34}, lo que ha concitado un mayor interés en el estudio molecular del mecanismo de resistencia de este antibiótico.

Mecanismo de resistencia a Metronidazol. El mecanismo de acción antimicrobiano del Mtz consiste en la activación reductiva de un grupo nitro de su estructura que lo convierte en una forma activa, hidroxilamina, que termina formando un radical libre. Este radical libre oxida el DNA bacteriano, provocando la ruptura de la doble hélice y la consiguiente muerte celular³⁵. Por otra parte, el grupo hidroxilamina es un potente mutágeno, por lo que se ha propuesto que el Mtz también sería capaz de generar mutaciones puntuales (transversiones y transiciones) en los genes de la bacteria expuesta al antibiótico de modo que la presencia de la droga permitiría la selección del fenotipo resistente a Mtz³⁶. El fenotipo sensible a Mtz resulta de la acción de una o dos nitrorreductasas; RdxA, la cual es abundante en prácticamente todos los aislados clínicos sensibles a la droga y FrxA, que está presente en bajos niveles en muchos aislados, cepas que se designan como de tipo I, mientras que en otros aislados se encuentran altos niveles de FrxA, cepas de tipo II^{37,38}. La resistencia a Mtz en *H pylori* resulta de la generación de diferentes tipos de mutaciones en el gen *rdxA* (designado como *hp0954*, en la secuencia completa del genoma de la cepa 26695)³⁹, el cual codifica una nitrorreductasa

NADPH insensible a oxígeno⁴⁰. Entre estas mutaciones se incluyen: mutaciones sin sentido, inserciones que producen corrimientos en el marco de lectura, deleciones e inserciones de transposones, produciéndose el término prematuro de la síntesis de la proteína RdxA, lo que resultaría en formas incompletas o inactivas de la enzima⁴⁰.

Aunque no existe una completa evidencia, se piensa que otros genes o mecanismos pueden estar involucrados en la generación de resistencia a Mtz. El análisis de la frecuencia de aparición de colonias resistentes a Mtz en cultivos de tipo I, alrededor de 10^{-4} , y de los cultivos de tipo II, 10^{-8} o menos, ha permitido deducir que sólo la inactivación del gen *rdxA* se necesita para obtener el fenotipo resistente a Mtz. Aunque la inactivación de *fdxA* no afecta la sensibilidad a Mtz cuando *rdxA* es funcional, su inactivación en cepas tipo I que presentan el gen *rdxA* mutado generalmente aumenta al doble la resistencia al antibiótico³⁸. Estudios recientes, mediante experimentos de intercambio alélico, muestran que los productos amplificados del gen *rdxA* obtenidos de cepas resistentes, representativas de las poblaciones de Asia, Africa del Sur, Europa y Estados Unidos, son capaces de transformar cepas sensibles en resistentes a Mtz³⁸.

No obstante lo anterior, debido a que el mecanismo molecular de la resistencia a Mtz en *H pylori* no se encuentra completamente identificado y no se puede atribuir a un cambio genético único, no es posible diseñar ensayos de laboratorio directos y rápidos para la detección de la resistencia al antibiótico.

Resistencia a Amoxicilina. La resistencia *in vitro* a Amx es muy escasa en los aislamientos clínicos de *H pylori*. Sin embargo, recientemente se describió que la resistencia a Amx está incrementando en diversas regiones geográficas^{28,41,42}. La Amx es un antibiótico ampliamente usado, por lo que el desarrollo de resistencia en *H pylori* puede tener un efecto dramático en el éxito de los tratamientos de erradicación.

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 no se ha reportado ninguna cepa de *H pylori* que produzca β -lactamasa^{43,44}. Otros mecanismos descritos que explican la resistencia a los β -lactámicos son mutaciones en las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), cambios en la permeabilidad a la droga y alteraciones en las bombas de eflujo multidrogas como también en las porinas. Las PBPs son un grupo de enzimas involucradas en la biosíntesis del péptido glicano de la pared celular de la bacteria. En *H pylori* se han descrito tres PBPs (PBP1, PBP2 y PBP3) 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. Recientemente, Okamoto et al⁴⁴, 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.

Resistencia a Tetraciclina. Del mismo modo, encontramos en la literatura comunicaciones con relación a la aparición de resistencia a Tc. La resistencia a este antibiótico *in vitro* también es muy escasa en aislados clínicos. En este sentido, destaca el estudio de Shanghai, China, donde se describió que 59% de los aislados clínicos presentó resistencia a este antibiótico¹³. Recientemente, Trieber y Taylor⁴⁵ describen que el mecanismo de resistencia a Tc se debe a mutaciones por sustitución y deleciones en el rRNA 16S, las que impiden la unión del antibiótico al ribosoma. Además, los autores señalan que dos de las cepas aisladas que presentaron resistencia a Tc también fueron resistentes a Mtz. Por otra parte, se ha descrito la resistencia a Tc en condiciones en las cuales los pacientes han sido tratados en primera instancia con Mtz^{46,47}, lo que

sugiere una acción mutagénica del Mtz como consecuencia del tratamiento. Recientemente, Dailidene et al⁴⁸ sugieren que además del efecto descrito por Trieber y Taylor⁴⁵, existiría un efecto mutagénico de Mtz sobre genes de porinas, la hipotética bomba de eflujo *tetA* (HP1165), homóloga a las que se presentan en varios plásmidos crípticos de *H pylori*, y sobre los posibles genes de eflujo de la familia *arcB*, identificados como los ORFs HP0607, HP0969 y HP1329, todos ellos no relacionados con *tetA*⁴⁸. Esta observación se basó en el análisis de la secuencia del gen de rRNA 16S, obtenido de una cepa resistente a Tc, que surgió de la incubación de la misma cepa sensible a Tc en un medio suplementado con Mtz el cual no mostró mutaciones que explicaran el surgimiento de la resistencia por alteración del mecanismo de la droga sobre la síntesis de proteínas.

PERSPECTIVAS

En el caso de *H pylori* es necesario desde ya diseñar las estrategias para minimizar el riesgo de esparcir la resistencia a antibióticos en la población. El problema de la resistencia a antibióticos está relacionado con el ecosistema donde los genes de resistencia y las bacterias constantemente fluyen entre diversos ambientes. Tenemos poco conocimiento de los niveles y distribución de los genes específicos relacionados con la resistencia a antibióticos. Los antecedentes recopilados apuntan a la necesidad de mantener una vigilancia permanente en los tratamientos de erradicación de *H pylori* desde el punto de vista clínico y epidemiológico, no sólo para obtener un buen resultado en las terapias de erradicación sino que, además, para conocer las características de las cepas que se encuentran en la población. También, el conocimiento de los mecanismos de resistencia abre la posibilidad de desarrollar métodos de laboratorio que faciliten en forma rápida la detección de la resistencia antibiótica.

REFERENCIAS

1. WARREN JR, MARSHALL B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1273-5.
2. GRAHAM DY. *Helicobacter pylori* is not and never was "protective" against anything, including GERD. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 629-30.
3. GRAHAM DY. Treatment of peptic ulcers caused by *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med* 1993; 328: 349-50.
4. HENTSCHEL E, BRANDSTATTER G, DRAGOSICS B, HIRSCHL AM, NEMEC H, SCHUTZE K ET AL. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993; 328: 308-12.
5. KUIPERS EJ, THUIS JC, FESTEN HPM. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: S59-S69.
6. FORMAN D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: S71-S76.
7. COVER TL, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 1996; 41: 85-117.
8. DUNN BE, COHEN H, BLASER MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-41.
9. VALENZUELA J. *Helicobacter pylori*: la revolución bacteriológica. *Rev Méd Chile* 1999; 127: 891-3.
10. 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.
11. FIGUEROA G, ACUÑA R, TRONCOSO M, PORTELL DP, TOLEDO MS, VALENZUELA J. *Helicobacter pylori* Infection in Chile. *Clin Infec Dis* 1997; 25: 983-9.
12. NIH CONSENSUS CONFERENCE. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994; 272: 65-9.
13. WU H, SHI XD, WANG HT, LIU JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 121-3.
14. PENSTON JG, MCCOLL KEL. Eradication of *Helicobacter pylori*: an objective assessment of current therapies. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 43: 223-43.
15. KIM JJ, KIM JG, KWON DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolated in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter* 2003; 8: 202-6.
16. CHIBA N, RAO BV, RADEMAKER JW, HUNT RH. Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1716-26.
17. GRAHAM DY, LEW GM, KLEIN PD, ALPERT L-C, GENTA RM. Factors affecting the eradication of *Helicobacter pylori* infection with triple therapy. *Gastroenterology* 1992; 192: 163-7.
18. GRAHAM DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. *Gastroenterology* 1998; 115: 1272-7.
19. PANTOFlickOVA D, BLUM AL. Antagonist. Should we eradicate *Helicobacter pylori* in non-ulcer dyspepsia? *Gut* 2001; 48: 758-61.
20. MCCOLL KEL. Protagonista. Should we eradicate *Helicobacter pylori* in non-ulcer dyspepsia? *Gut* 2001; 48: 758-61.
21. ADAMSSON I, NORD CE, LUNQUIST P, LUNDQUIST P, SJOSTEDT S, EDLUND C. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori* infected patients. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 629-40.
22. VAN DER WOUDE EJ, THUIS JC, VAN ZWEL WJ, SLUITER WJ, KLEIBEUKER JH. The influence of *in vitro* nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1751-9.
23. MIYAJI H, AZUMA T, ITO S, SUTO H, ITO Y, YAMAZAKI Y ET AL. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin *in vitro* and in clinical treatment in Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 1131-6.
24. MUKHOPADHYAY AK, KERSULYTE D, JEONG JY, DATTA S, ITO Y, CHOWDHURY A ET AL. Distinctiveness of genotype of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* 2000; 182: 3219-27.

25. GLUPCZYNSKI Y. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: a global overview. *Acta Gastroenterol. Belgium* 1998; 61: 357-66.
26. MEGRAUND F, LEHN N, LIND T, BAYERDORFFER E, O'MORAIN C, SPILLER R ET AL. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: The MACH 2 study. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999; 43: 2747-52.
27. GONZÁLEZ C, GARCÍA A, DAROCH F, KAWAGUCHI F, SOLAR H, RIVERA N ET AL. Susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Helicobacter pylori*: aislamiento de cepas resistentes a claritromicina. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 643-6.
28. DORE MP, OSATO MS, REALDI G, MURA I, GRAHAM DY, SEPÚLVEDA AR. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 47-54.
29. HEEP M, KIST M, STROBEL S, BECK D, LEHN N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 538-41.
30. VANDOORN L-J, DEBETS-OSSSENKOPP YJ, MARAIS A, SANNA R, MEGRAUD F, KUSTERS JG ET AL. Rapid detection, by PCR and Reverse Hybridization, of Mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1779-82.
31. VERSALOVIC J, SHORTRIDGE D, KIBLER K, GRIFFY 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.
32. OCCHIALINI A, URDACI M, DOUCET-POPULAIRE F, BEBEAR CM, LAMOULIATTE H, MEGRAUD F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutation and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2724-8.
33. 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.
34. STONE GG, SHORTRIDGE D, VERSALOVIC J, BEYER J, FLAMM RK, GRAHAM DY ET AL. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rDNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 712-4.
35. EDWARDS DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 9-20.
36. SISSON G, JEONG J-Y, GOODWIN A, BRYDEN L, ROSSLER N, LIM-MORRISON S ET AL. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori* rdxA+ (nitroreductase) gene. *J Bacteriol* 2001; 182: 5091-6.
37. JEONG J-Y, MUKHOPADHYAY AK, AKADA JK, DAILIDIENE D, HOFFMAN PS, BERG DE. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *J Bacteriol* 2001; 183: 5155-62.
38. JEONG J-Y, MUKHOPADHYAY AK, DAILIDIENE D, WANG Y, VELAPATINO B, GILMAN RH ET AL. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000; 182: 5082-90.
39. TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG, FLEISCHMANN RD ET AL. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-47.
40. GOODWIN A, KERSULYTE D, SISSON G, VELDHIJZEN VAN ZANTEN SJ, BERG DE, HOFFMAN PS ET AL. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28: 383-93.
41. HAN SR, BHAKDI S, MAEURER MJ, SCHNEIDER T, GEHRING 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.
42. VAN ZWET AA, VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE, THUIS JC, VAN DER WOUDE EJ, GERRITS MM, KUSTERS JG ET AL. Stable amoxicillin in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998; 352: 1595.
43. SMITH SI, OYEDEJI KS, ARIGBABU AO, ATIMOMO C, COKER AO. High amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* isolated from gastritis and peptic ulcer patients in western Nigeria. *J Gastroenterology* 2001; 36: 67-8.
44. 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.
45. TRIEBER CA, TAYLOR DE. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to Tetracycline. *J Bacteriol* 2002; 184: 2131-40.
46. MILADO PD, KORMAN MG, TURNIDGE JD, LAMBERT JR. *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. *Lancet* 1996; 347: 1194-5.
47. KWON DH, KIM JJ, LEE M, YAMAOKA Y, KATO M, OSATO MS ET AL. Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3203-5.
48. DAILIDIENE D, BERTOLI MT, MICULEVICIENE J, MUKHOPADHYAY AK, DAILIDE G, PASCASIO MA ET AL. Emergence of Tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3940-6.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. V Prado y al Dr. R López por sus valiosos comentarios durante la preparación del manuscrito.