

**PREVALENCIA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
FLUOROQUINOLONAS Y LAS MUTACIONES RELACIONADAS. REVISIÓN
SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

BECERRA BECERRA NANCY ZULIMA



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGIA

Bogotá D.C.

NOVIEMBRE 2011

**PREVALENCIA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
FLUOROQUINOLONAS Y LAS MUTACIONES RELACIONADAS. REVISIÓN
SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

BECERRA BECERRA NANCY ZULIMA

APROBADO

Ingrid Schuler, Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Diana Patiño C., MSc.
Directora Carrera Bacteriología
Facultad de Ciencias

**PREVALENCIA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
FLUOROQUINOLONAS Y LAS MUTACIONES RELACIONADAS. REVISIÓN
SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

BECERRA BECERRA NANCY ZULIMA

APROBADO

Dra. Alba Alicia Trespalacios. MSc, PhD.
Directora

Dra. Marcela Mercado. MEp.
Codirectora

Dra. Azucena Arévalo. MSc
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No13 de Julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra la persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	Pág.
Resumen	
1. Introducción	7
2. Justificación	8
3. Marco Teórico	8
3.1 Helicobacter pylori	9
3.2 Vías de trasmisión	9
3.2.1 Vía de transmisión fecal-oral	9
3.2.2 Vía de transmisión oral-oral	9
3.2.3 Vía de transmisión gástrica- oral	9
4. Pruebas por las cuales se determinan la susceptibilidad y las mutaciones	9
4.1 Dilución en agar	9
4.2 E-test	10
4.3 PCR convencional con secuenciación	10
4.4 RFPL-PCR	10
5. Fluoroquinolonas	10
5.1 Estructura química	10
5.2 Mecanismos de acción de las fluoroquinolonas	11
6. Efectos adversos del uso de las fluoroquinolonas	11
7. Levofloxacin	12
7.1 Levofloxacin en esquemas de primera línea y de rescate en erradicación de h. Pylori.	12
7.2 Levofloxacin en esquemas de segunda línea o rescate resultados	13
8. Revisión Sistemática de la Literatura.	13
9. Objetivos	14
9.1 Objetivo General	14
9.2 Objetivos Especificos	14
10. Metodología de la revisión sistemática de la literatura	14
10.1 Selección de los estudios	14
10.2 Estrategias de búsqueda de artículos	15
11. Evaluación de la calidad metodológica	15
12. Resultados	16
12.1 Evaluación de la calidad metodológica	18
12.2 Prevalencia de la resistencia de H. pylori a fluoroquinolonas reportados por continentes.	19
12.3 Mutaciones relacionadas con la resistencia de H. pylori a fluoroquinolonas reportados por continentes.	20
13. Discusión	22
14. Conclusiones	23
15. Recomendaciones	23
16. Referencias	24

RESUMEN

Objetivo: Describir los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas y las mutaciones relacionadas mediante una revisión sistemática de la literatura.

Metodología: Se realizó una búsqueda de estudios que determinaron la prevalencia de la resistencia de *Helicobacter pylori* a fluoroquinolonas y/o que determinaron las mutaciones relacionadas con la resistencia, se realizó en bases de datos tales como: Medline, Scisearch, Science Direct, Pubmed, Ovid y Cochrane. Dos observadores verificaron los criterios de inclusión en los artículos. La calidad de los artículos también se realizó por dos observadores por medio de la lista de chequeo. El análisis de la información se llevó a cabo en el programa RevMan 5 de la biblioteca de Cochrane.

Resultados: De los 52 artículos obtenidos en la búsqueda primaria, se incluyeron definitivamente 21 artículos. Se observó una alta tasa de resistencia en Europa con una prevalencia en la prueba de E-test 14,9%, mientras que con la prueba de Dilución en agar se observó 17,2%, en Asia se observó una tasa de resistencia igual tanto en dilución en agar como E-test del 31,7%, en Norte América y Centro América se observa una prevalencia de la resistencia baja y solo se ha determinado con la prueba de E-test 8,8% y 5,7%. Se describieron las mutaciones relacionadas con esta resistencia; se presenta con mayor frecuencia las mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR); en *gyrA* los codones N87K y D91G.

Conclusiones: A nivel mundial se observa que la resistencia de *H. pylori* a las fluoroquinolonas es cada vez mayor. Esta descripción manifiesta la necesidad de una vigilancia constante de la resistencia de *H. pylori* a las fluoroquinolonas, por que el uso de este antibiótico participa en los actuales regímenes de erradicación y esta resistencia afecta significativamente la tasa de éxito del tratamiento. La principal resistencia se relaciona sobre todo con las mutaciones en *gyrA* N87 y D91.

PREVALENCIA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A FLUROQUINOLONAS Y LAS MUTACIONES RELACIONADAS. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA

1. INTRODUCCION

La infección por *Helicobacter pylori*, que afecta a más de la mitad de la población mundial, es responsable de la gastritis, úlcera gástrica y la mucosa gástrica asociada a linfoma del tejido linfoide y es unacausa de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (Versalovic J, et.al., 2003), por lo tanto los parámetros ahora recomiendan la erradicación de *H. pylori* en todos los pacientes que han sido diagnosticados (Malfertheiner P, et al.2002).

El tratamiento estándar es una triple terapia que contiene un inhibidor de la bomba de protones, como omeprazol y dos antibióticos, la amoxicilina, claritromicina o metronidazol (Mégraud F. et. al., 2007). Pero este tratamiento estándar ha fracasado principalmente por la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos utilizados (Glupczynski Y, et. Al., 2001).El aumento en la resistencia a la claritromicina y el metronidazol que se han reportado; razón por la cual se hace necesario el uso de otros fármacos eficaces para combinar con la amoxicilina en los casos de fracaso, estos fármacos activos adicionales también son importantes para la terapia estándar alternativa, si se tiene en cuenta que desde el inicio del estudio para la erradicación, se ha reducido en un 90% en la década del '90 y en un 70% en los últimos estudios (Bauernfeind A. et. al. 2001).

Las fluoroquinolonas son antibióticos que muestran una actividad in vitro frente a *Helicobacter pylori* actualmente son el tratamiento de elección en los casos de fracaso (Sánchez JE, et. al. 2000). Entre las fluoroquinolonas de reciente comercialización están levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin se han utilizado en vivo con posibilidad de éxito (Nishizawa T, et. al. 2006). Su actividad antibacteriana ha sido comparada en unos pocos estudios, y rara vez en un gran número de aislamientos clínicos recientes. Estas nuevas fluoroquinolonas incluso han demostrado ser más eficaces que la terapia estándar (Nishizawa T, et. al. 2006), siempre que las cepas no han adquirido resistencia a las quinolonas (Sharara Al, et.al.2004).

Los métodos más utilizados de susceptibilidad in vitro son difusión en disco, dilución en agar y Epsilometro (E-test). Dilución en agar es una prueba útil para confirmar resultados obtenidos por otros métodos y para determinar la resistencia. El método por E-test es una prueba de gran utilidad en el laboratorio de rutina, pero es importante realizar una buena correlación con el método de referencia (Dilución en agar) (Cervantes, 2006).

En conclusión, la importancia de esta revisión es determinar de forma clara los diferentes mecanismos de resistencia y el porcentaje de prevalencia de *Helicobacter pylori* en los contextos donde se presenta, y contribuir a estudios posteriores sobre resistencia de ese microorganismo a los antimicrobianos.

2. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* es una de las enfermedades infecciosas crónicas más frecuentes en la actualidad pudiendo afectar a cualquier estrato social, raza, sexo o grupo etario, aunque evidentemente con distinta frecuencia. Al revisar la prevalencia se puede observar una amplia variación entre las diversas zonas estudiadas, existiendo una clara

diferenciación entre los países desarrollados y aquéllos en vías de desarrollo (Vallejos C., et al.2003).

Los datos recopilados hasta la fecha indican que *H. pylori* tiene una amplia distribución mundial y más del 50% de individuos están infectados. Se considera que la infección es adquirida durante la infancia y que entre los 20 a 40 años de edad la mitad de la población mundial tiene en sus vías digestivas esta bacteria, aunque solo entre 10 a 20% de los infectados desarrollan úlcera duodenal o gástrica; por lo tanto, la infección por *H. pylori* es un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de la úlcera, entre otros factores involucrados están los genes de virulencia bacteriana, el estado socioeconómico, el aporte pobre de agua y de mala calidad, la dieta y la genética del huésped. La tasa de infección aumenta con la edad; así, mientras un 10% de los individuos menores de 30 años están infectados, esta cifra asciende a 60% entre los mayores de 60 años (Figueredo J. 2003).

Las fluoroquinolonas son antibióticos bactericidas cuyo mecanismo de acción son dos enzimas con sus respectivas subunidades topoisomerasa II (ADN girasa) y IV, esenciales para el enrollamiento del ADN bacteriano, la resistencia a las fluoroquinolonas es progresiva y resulta de sustituciones sucesivas de aminoácidos de las subunidades que aumentan la concentración inhibitoria mínima (CIM). La mayoría de las mutaciones se localizan en sitios específicos, regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR) (Ruiz J. 2003).

Por lo tanto, es fundamental realizar una revisión sistemática de la literatura, para analizar los estudios que se han elaborado sobre la prevalencia y los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas; así como las mutaciones relacionadas, los hallazgos y las posibles recomendaciones planteadas a partir de estos. Con el ánimo de aportar a otros estudios en un futuro próximo.

3. MARCO TEORICO

3.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un bacilo gram-negativo, en forma de espiral. Este fue aislado por primera vez en 1983 por *Marshall* y *Warren* y este descubrimiento revolucionó los estudios de las enfermedades gastrointestinales. Posee múltiples flagelos en un polo y con motilidad activa. Cuando se incuba a 37°C en un ambiente microaerofílico crece en 3 a 6 días. Sus colonias son translúcidas y de 1 a 2 mm de diámetro; es oxidasa positiva, catalasa positiva y fuerte productor de ureasa (Jawetz M., et al, 2005).

Helicobacter pylori es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica humana, un medio ambiente extraordinariamente hostil. La bacteria coloniza la capa mucosa y en caso de no ser erradicada, establece infecciones crónicas que frecuentemente perduran toda la vida, a pesar de las respuestas inflamatoria e inmune desarrolladas por el huésped. La infección por *H. pylori* causa cambios estructurales y funcionales en la mucosa gastroduodenal. Todas las personas infectadas desarrollan una inflamación gástrica crónica que generalmente es asintomática, mientras que en algunas personas provoca úlcera péptica. Además, existe evidencia etiológica que el riesgo de cáncer gástrico se incrementa por la infección con *H. pylori*, lo que sugiere su asociación con cáncer gástrico. Por otra parte, la curación de la infección por *H. pylori* se ha asociado con

la regresión del linfoma gástrico del tejido linfoide asociado a mucosas. (Tankovic., et. al. 2003).

3.2 VÍAS DE TRANSMISIÓN

Se considera que la transmisión directa persona a persona es la vía de transmisión más asequible de la infección por *H. pylori*. La transmisión persona a persona puede ocurrir por vía fecal-oral, oral-oral o gástrica-oral. (Cammarota G. et. al.)

3.2.1 Vía de transmisión fecal-oral

Se ha sugerido que el consumo de agua contaminada es una fuente potencial de infección, pero se necesitan estudios adicionales para establecer un posible vínculo con la transmisión por el agua. (Dunn B. et. al. 1999)

3.2.2 Vía de transmisión oral-oral

Se ha descrito la adquisición de *H. pylori* en humanos tras la ingesta, por vía oral, de inóculos del microorganismo con fines experimentales accidentalmente, tras aspirar jugo gástrico infectado, y en casos aislados de resucitación cardiopulmonar mediante la técnica del boca a boca. La saliva podría ser el vector de infección y la placa dental podría actuar como reservorio de la infección. (Dunn B. et. al. 1999)

3.2.3 Vía de transmisión gástrica-oral

Recientemente, se está considerando la posibilidad de que *H. pylori* pase directamente desde el estómago de un paciente infectado, a través de vómito, a la boca de otra persona, sin que sea necesario que exista un reservorio en la cavidad oral. Esta vía de transmisión tendría lugar, fundamentalmente, en la infancia.

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%. Esta condición se atribuye a las pobres condiciones sanitarias existentes en estas sociedades, que determinan frecuentes exposiciones al patógeno. En los países industrializados, por el contrario, 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. La infección se produce inicialmente durante la infancia a partir de otro miembro de la familia.

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%. Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina. (Vallejos Cristián Ma., et al, 2003).

4. PRUEBAS POR LAS CUALES SE DETERMINAN LA SUSCEPTIBILIDAD Y LAS MUTACIONES

4.1 Dilución en agar

En este método el agente antimicrobiano es incorporado en el medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano. Los inóculos pueden ser aplicados rápidamente y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa (Coyle Marie, 2000).

La ventaja de esta prueba es que tiene una gran reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de los organismos de difícil desarrollo; esta prueba

no se hace de rutina en un laboratorio pero son ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que pueden analizar un gran número de cepas (Coyle Marie, 2000).

4.2 E-test

Este método ha sido descrito recientemente y presenta una satisfactoria combinación entre el método de difusión en disco y la dilución en agar. E-test es más simple que otros métodos para obtener una concentración mínima inhibitoria. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico (Coyle Marie, 2000).

4.3 La PCR convencional con secuenciación

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. En general todo este proceso suele durar aproximadamente 24 h (Costa, 2004).

4.4 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR)

Técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos. (Laboratorio Genomik, 08/11/ 2011).

5. FLUROQUINOLONAS

5.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

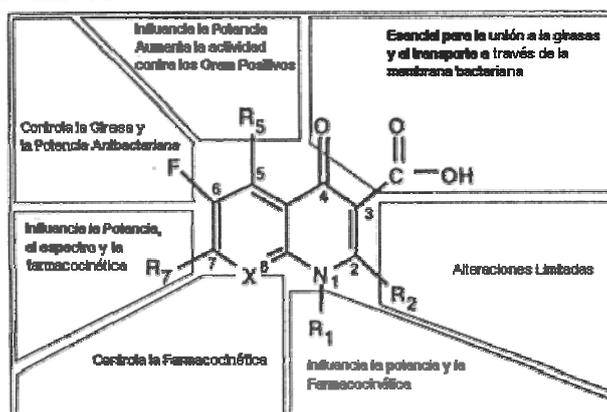


Fig. 1 Relación entre la estructura y la actividad antibacteriana de las Fluoroquinolonas (Tomado del Departamento de Ciencias Fisiológicas, PUJ. 2011).

Todas las quinolonas presentan un anillo estructural básico con un radical de ácido carboxílico en la posición 3. (**Fig.1**) Las fluoroquinolonas presentan un átomo de fluoruro en la posición 6 y algunos de éstos presentan un radical; adicional piperacínico en la

posición 7. La diferencia entre las distintas fluoroquinolonas radica en modificaciones en las posiciones 1, 5,7 y 8.

5.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS FLUOROQUINOLONAS

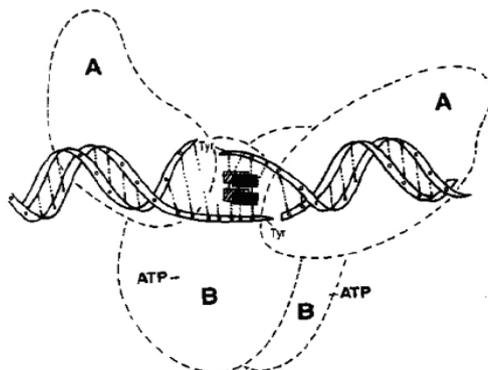


Fig. 2 ADN girasa.

Las fluoroquinolonas son antibióticos cuyo blanco primario son la *ADN girasa* en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos. La *ADN girasa* es un heterotetramero A₂B₂ (Fig. 2) con la subunidad A (*GyrA*, 97kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (*GyrB*, 90kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con *GyrA* y ATP. La *ADN girasa* introduce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción; mientras que la topoisomerasa IV presenta una potente actividad desenrollante. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular. La inhibición de la *ADN girasa* puede categorizarse dentro de los siguientes cinco tipos: mecanismo específico basado en la inhibición de la *GyrA*, mecanismo específico basado en la inhibición de la *GyrB*, intercalación en el ADN, unión al hueco menor del ADN y quelación no específica. (Socorro Leyva, et. al. 2008).

La enzima *ADN girasa* actúa a través del enrollamiento de la doble cadena del ADN alrededor de sí mismo, ruptura del ADN en las dos hebras con la formación de un segmento de apertura a través del cual se pasa el ADN sin cortar y finalmente reunión del ADN. La unión de ATP a *GyrB* captura el segmento de ADN sin cortar y lo dirige a través de la apertura, seguido por la hidrólisis de ATP para permitir que la enzima regrese a su conformación inicial. En un ciclo de reacción de superenrollamientos, la *ADN girasa* une e hidroliza dos moléculas de ATP, con una velocidad intrínseca de hidrólisis de ATP generalmente baja, donde la actividad de ATPasa es estimulada por la presencia de ADN. Las moléculas de quinolona, unidas en complejos tetraméricos, se acoplan a las hebras de ADN y a determinados puntos de las subunidades (A y B) de la *girasa* y estabilizan el complejo ternario de *girasa* ADN-fluoroquinolona-ADN, impidiendo su reversión y poniendo en marcha una serie de procesos, incluso hoy todavía desconocidos, que desembocan en la lisis celular. (Socorro Leyva, et. al. 2008).

6. EFECTOS ADVERSOS DEL USO DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Las Fluoroquinolonas en general son bien toleradas. Existen pequeñas diferencias tanto en la incidencia como en el tipo de reacciones de los fármacos. En su mayoría las manifestaciones son leves y retroceden al suspender el medicamento.

Los efectos adversos más frecuentes son alteraciones gastrointestinales, seguidos de síntomas neuropsiquiátricos y de reacciones cutáneas de hipersensibilidad. (O'Donnell, et. al. 2000)

- Al nivel gastrointestinal pueden observarse náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, pérdida del apetito y malestar abdominal.
- Durante el tratamiento con quinolonas pueden observarse reacciones cutáneas de hipersensibilidad, como rash y prurito. En general son leves o moderadas y ceden al suspender el tratamiento. Se han descrito formas más graves, pero con una baja incidencia. La hipersensibilidad es cruzada entre las diferentes quinolonas.
- Como afectan el desarrollo del cartílago están contraindicadas en los niños, adolescentes, embarazadas y mujeres en lactancia.
- Las fluoroquinolonas causan prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma, por lo que no deben usarse en pacientes con síndromes congénitos o adquiridos de prolongación de QT.
- En hematología puede producir: leucopenia y eosinofilia.
- En química analítica se observa un aumento de transaminasas.
- A nivel renal han sido descritas: hiperazoemia (Existencia de sustancias nitrogenadas en la sangre), cristaluria (presencia de cristales en la orina) y nefritis intersticial (Es un trastorno renal en el cual los espacios entre los túbulos renales resultan inflamados).
- El uso de fluoroquinolonas produce infrecuentemente mialgias y artralgias transitorias durante el tratamiento. Se ha descrito también tendinitis (dolor y edema regional) y la rotura tendinosa (especialmente el tendón de Aquiles), manifestación sumamente rara que, aunque relacionada con ciertos factores (tipo de quinolona, consumo crónico de corticoides, mayor edad) exhibe también cierta predisposición individual. El mecanismo propuesto para los efectos adversos osteoarticulares es la quelación iónica (Ca^{2+} , Mg^{2+}) que afecta la actividad de las moléculas de adhesión celulares sobre el colágeno y la matriz extracelular conectiva o el estrés oxidativo inducido por la quinolona.

7. LEVOFLOXACINA

Es una quinolona de tercera generación con excelente biodisponibilidad, vida media prolongada, amplio espectro antimicrobiano y muy seguro. En los últimos años los esquemas de erradicación del *H. pylori* que contiene levofloxacina demostraron ser útiles tanto en tratamientos de primera línea como en los retratamientos, y son especialmente útiles en las regiones del mundo donde no se comercializa el bismuto. (O'Donnell, et. al. 2000).

Se elimina por vía renal exclusivamente, lo cual determina un ajuste de dosis ante un deterioro de la función renal.

Es muy bien tolerada y segura, con trastornos gastrointestinales inusuales, hepatotoxicidad y fotosensibilidad infrecuente y leve, lo cual determina menos efectos adversos que otras quinolonas de tercera generación (O'Donnell, et. al. 2000).

7.1 LEVOFLOXACINA EN ESQUEMAS DE PRIMERA LÍNEA Y DE RESCATE EN ERRADICACION DE *H. pylori*

En el mundo aún no se ha encontrado el tratamiento óptimo de erradicación del *H. pylori*. Los esquemas cortos a 7 días que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos (amoxicilina y claritromicina o metronidazol) parecían, hasta hace no muchos

años, la mejor opción terapéutica. Sin embargo, la eficacia de la triple terapia estándar está disminuyendo en todo el mundo. La resistencia a claritromicina está incrementando y la misma se correlaciona con una reducción de su eficacia terapéutica. (Corti RE. et. al. 2008).

La constante búsqueda de esquemas terapéuticos, con antibióticos que permitan menos tomas diarias, menos efectos adversos y sin resistencias bacterianas, han determinado que en la última década, se incluya nuevos antibióticos (fluoroquinolonas de tercera generación) reemplazando a los clásicos claritromicina y metronidazol en los esquemas de erradicación. (Corti RE. et. al. 2008).

Con esquemas de primera línea que contienen levofloxacina 500 mgs/ día a 250 mgs en dos tomas diarias durante 7 a 10 días, se lograron tasas de erradicación de entre el 83 y 92%. En esquemas de segunda línea o de rescate de 10 días, se lograron tasas de erradicación de entre 73 y 92%. Los efectos adversos en esquemas que contienen levofloxacina son: diarrea (7%); estomatitis aftosa (3,2%); astenia, anorexia, rash (1.6%). (Corti RE. et. al. 2008).

7.2 LEVOFLOXACINA EN ESQUEMAS DE SEGUNDA LINEA O RESCATE RESULTADOS

Autor	Esquema/ Días	No. Pacientes % Erradicación
A Gasbarrini (2004)	IBPs + LEV + AMOX (10)	26/30 86.6%
P. Orsi (2004)	IBPs + LEV + AMOX (12)	42/ 47 89%
C. Bilardi (2004)	IBPs + LEV + AMOX (10)	31/ 41 76%
E. Nista (2005)	IBPs + LEV + AMOX (10)	42/46 91.3%
R. Saad (2006)	IBPs + LEV + AMOX (10)	- 81%
YK Yee (2007)	IBPs + LEV + AMOX (10)	37/51 73%
JP Gisbert (2007)	IBPs + ScBIs + LEV + AMOX (7)	83/112 74.6%
LG Coelho (2008)	IBPs + LEV + FURAZ (7)	24/ 30 80%

Tomado de RE Corti, 2008

8. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA

Las revisiones sistemáticas son un diseño de investigación observacional y retrospectivo, que recopila y sintetiza los resultados de múltiples investigaciones primarias con el objetivo de realizar una evaluación crítica para obtener conclusiones que resuman el efecto de una intervención clínica o una prueba diagnóstica. Son parte esencial de la medicina basada en la evidencia por su rigurosa metodología, identificando los estudios relevantes para responder preguntas específicas de la práctica clínica. El termino meta-análisis se reserva para la combinación numérica de los datos en revisiones a partir de ensayos clínicos controlados. No todas las revisiones sistemáticas lo incluyen. Las revisiones sistemáticas son tan populares que han tenido crecimiento vertiginoso en los últimos años (Beltrán, 2005).

9. OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GENERAL

Describir la prevalencia y los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas y las mutaciones relacionadas mediante una revisión sistemática.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Describir los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas
- ✓ Describir la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* en diferentes regiones geográficas frente a fluoroquinolonas.

10. METODOLOGÍA DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA

Se realizó una selección de los estudios (criterios de inclusión y de exclusión) y estrategia de búsqueda.

10.1 SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS (Tabla 1.)

Tabla 1. Criterios de Inclusión y Criterios de Exclusión

Criterios De Inclusión	Criterios De Exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Se incluyeron artículos que determinaron la prevalencia de la resistencia de <i>H. pylori</i> a fluoroquinolonas y / o mutaciones relacionadas con la resistencia.• Estudios que presentaron aislamientos clínicos de <i>H. pylori</i> a partir de personas de todas las edades.• Estudios que utilizaron pruebas tales como: E-test, Dilución en agar, PCR convencional con secuenciación y PCR- RFLP.• Se incluyeron artículos en donde fueron evaluados uno o más de este antibiótico aunque evaluara otros que no sean de interés de esta revisión.• Estudios realizados y publicados entre los años 1994 hasta Julio de 2011.• Tipo de estudio: Descriptivo donde se incluyeron las mutaciones relacionadas con las fluoroquinolonas y/o donde determinaron la prevalencia de la resistencia de <i>H. pylori</i> a las	<ul style="list-style-type: none">• Estudios que buscaron resistencia a antibióticos diferente a las fluoroquinolonas.• Artículos en idioma diferente al español o inglés.• Estudios que presentaron variaciones en los resultados.• Artículos que no describan claramente la resistencia a este antibiótico.• Artículos con fecha de publicación anterior a 1994.• Estudios que evaluaron las fluoroquinolonas por pruebas diferentes a las establecidas.

fluoroquinolonas.	
-------------------	--

10.2 ESTRATEGIAS DE BUSQUEDA DE ARTICULOS

- Se realizó una búsqueda electrónica en Medline, Scisearch, Science Direct, Pubmed, Ovid y Cochrane con estudios publicados entre 1994 y julio 2011 y restricción de lengua al español e inglés.
- La estrategia de búsqueda se adaptó a cada base de datos para poder encontrar los estudios que utilizara la prevalencia y mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas y mutaciones relacionadas, que cumplirán los criterios de inclusión y exclusión ya explicados.
- La estrategia de búsqueda se realizó mediante la combinación de los términos (palabras claves) tales como: "Prevalence of resistance or *Helicobacter pylori* a fluoroquinolone", worldwide and resistance and *Helicobacter pylori* a fluoroquinolone, *Helicobacter pylori* and fluoroquinolone, prevalencia, resistencia, *Helicobacter pylori*, resistencia ha fluoroquinolonas a *Helicobacter pylori*, mutations of *Helicobacter pylori* a fluoroquinolone, se observa en la **tabla 2**.
- Artículos que reporten pruebas con E-test, Dilución en agar, PCR convencional con secuenciación y RFLP-PCR.

Tabla 2. Estrategia de búsqueda en Science direct, Medline, Scisearch, Pubmed, Ovid y Cochrane.

#1. Prevalence of resistance <i>Helicobacter pylori</i> a fluoroquinolone #2. Resistance of <i>Helicobacter pylori</i> a fluoroquinolone #3. Fluoroquinolone #4. Resistencia de <i>Helicobacter pylori</i> #5. Worldwide #6. mutations of <i>Helicobacter pylori</i> a fluoroquinolone #7. #5. Or #6. Or #4. Or #3. Or #2. Or #1. Operador booleano: AND Age group: all the groups
--

11. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Para evaluar la calidad de los artículos se realizó una lista de chequeo basándose en los parámetros de la guía para usuarios de la literatura médica (Jaeschke, et.al., 1997). Los ítems de evaluación de la calidad se muestran en la **tabla 3**. Dos observadores realizaron de forma independiente y ciega la evaluación de la calidad de los artículos, asignándole un puntaje final a cada artículo.

Tabla 3. Ítems para evaluación de la calidad metodológica de los artículos.

Ítem 1.	¿Se estableció la resistencia de <i>H. pylori</i> a Fluoroquinolonas o valores para calcular dicha resistencia?
Ítem 2.	¿Se estableció la posible mutación que genera resistencia y fue reportada mediante una técnica adecuada?
Ítem 3.	¿La resistencia reportada fue primaria o posterior a un tratamiento previo?
Ítem 4.	¿Se ha descrito claramente la metodología del estudio?
Ítem 5.	¿Se utilizaron controles estándares para evaluar el método utilizado?
Ítem 6.	¿Se reportaron los criterios de inclusión utilizados?
Ítem 7.	¿Se evitaron los sesgos en la selección de estudios?
Ítem 8.	¿Fueron sustentadas las conclusiones hechas por el autor con todos los análisis reportados en el estudio?

12. RESULTADOS

Después de realizar la búsqueda en las bases de datos teniendo en cuenta los criterios de inclusión y de exclusión, previamente establecidos, se obtuvieron 52 artículos. Posteriormente, tras eliminar aquellos artículos que no trataban estrictamente de reportar la prevalencia y la resistencia de *Helicobacter pylori* a fluoroquinolonas y sus mutaciones, se seleccionaron 46 artículos. La selección de los artículos para ser incluidos (inclusión secundaria) fue realizada con los resúmenes de forma independiente, y sin conocimiento de los artículos seleccionados por el otro, por dos investigadores. De estos 46 artículos se marcaron en base a un título y un resumen teniendo de nuevo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. Entonces se obtuvieron los artículos completos que se consideró podrían cumplir con los criterios de inclusión/ exclusión, para un total de 21, de los cuales 11 artículos presentan tanto resistencia como mutaciones, 6 artículos determinan solo resistencia y 4 artículos determinan solo mutaciones (**Figura 3**).

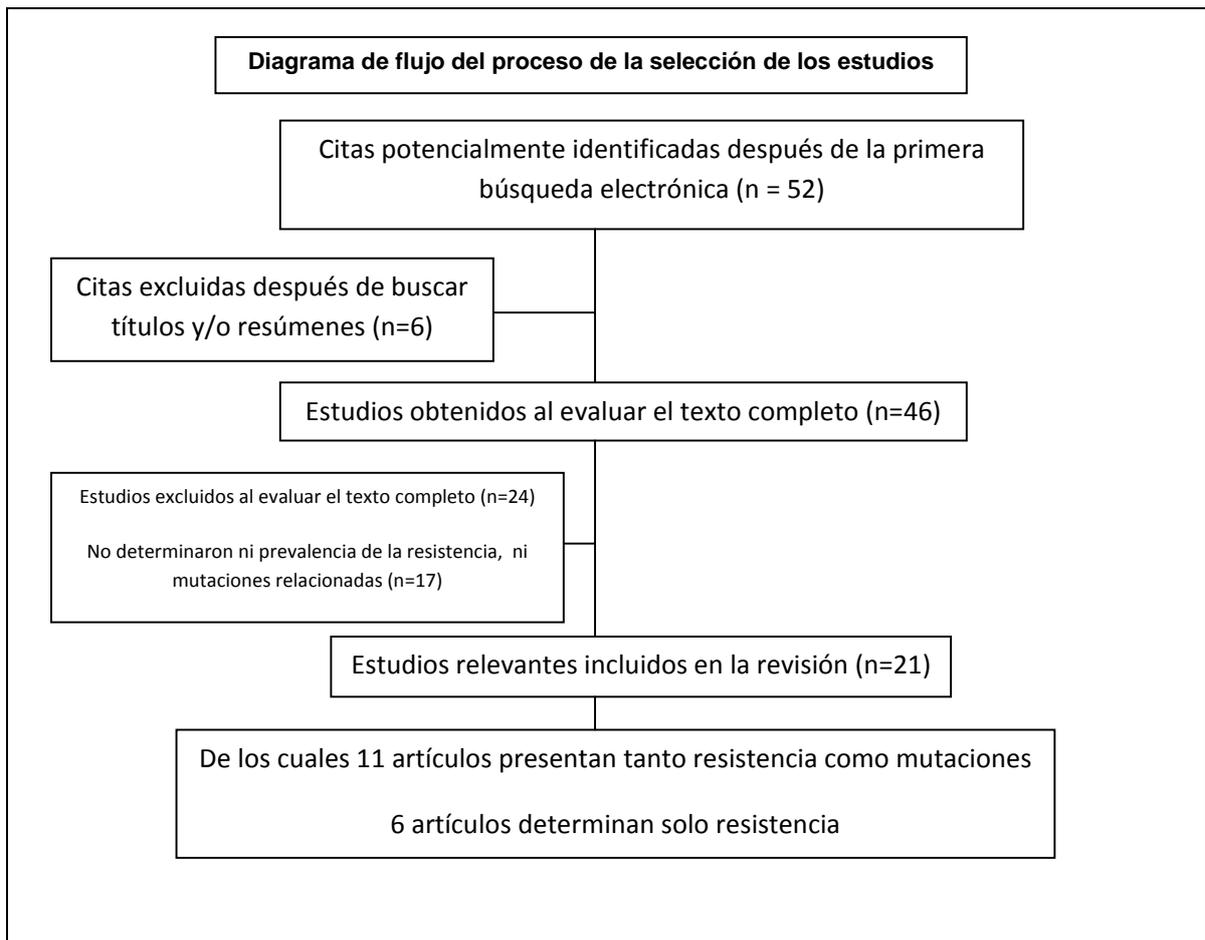


Figura 3. Selección de los estudios para la revisión sistemática de la literatura.

Las características generales de estas referencias se observan en:

Tabla 4. Los artículos que determinaron la prevalencia de la resistencia de *Helicobacter pylori* a fluoroquinolonas.

Tabla 5. Los artículos que determinaron las mutaciones relacionadas con la resistencia de *Helicobacter pylori* a fluoroquinolonas.

Tabla 6. Son las características de los artículos que reportaron tanto la prevalencia de la resistencia como las mutaciones relacionadas.

12.1 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Como se muestra en la **figura 4**, la calidad metodológica de los estudios fue adecuada en la mayoría de los aspectos evaluados: 17 estudios establecieron la resistencia a fluoroquinolonas, 15 estudios establecieron las mutaciones que generan resistencia; 11 reportaron una resistencia previa a un tratamiento y evitaron los sesgos; 20 estudios describieron claramente la metodología a evaluar; 10 estudios utilizaron controles estándares apropiados; todos los estudios reportaron las conclusiones hechas por los autores, cumplían los criterios de inclusión.

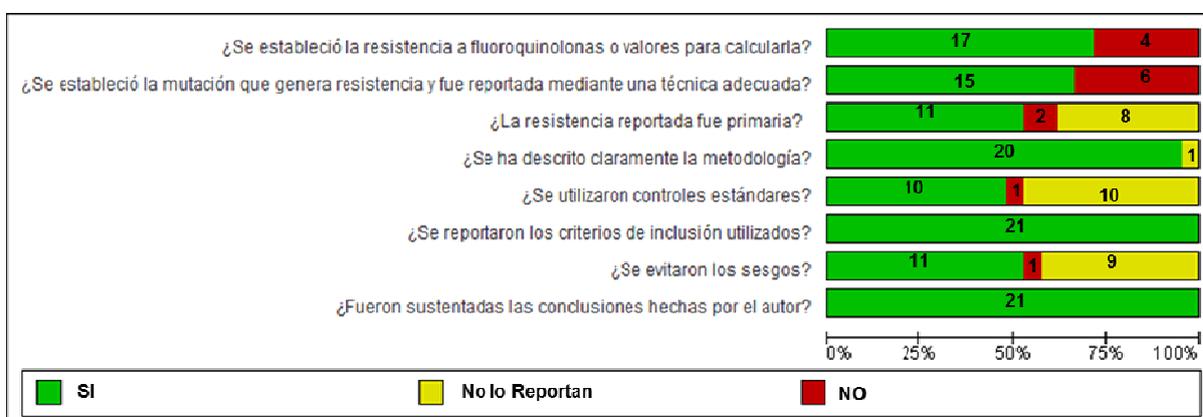


Figura 4. Evaluación de la calidad de los estudios incluidos en la revisión sistemática de la literatura.

12.2 PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A FLUOROQUINOLONAS REPORTADOS POR CONTINENTES

* Prevalencia de la Resistencia

CONTINENTE	Prevalencia de la Resistencia Fluoroquinolonas		Intervalos de Confianza 95%	
	E-test	Dilucion en agar	E-test	Dilucion en agar
America del Norte	8,8%	N	4%-14%	N
America Central	5,7%	N	0.2%-10%	N
America del Sur	N	N	N	N
Europa	14,9%	17,2%	13%-17%	11%-24%
Asia	31,7%	31,7%	29%-34%	28%-35%
Africa	N	N	N	N
Oceania	N	N	N	N

N: No hay estudios reportados

* Mapamundi de prevalencia de la Resistencia de *H. pylori* a Fluoroquinolonas por Continentes:



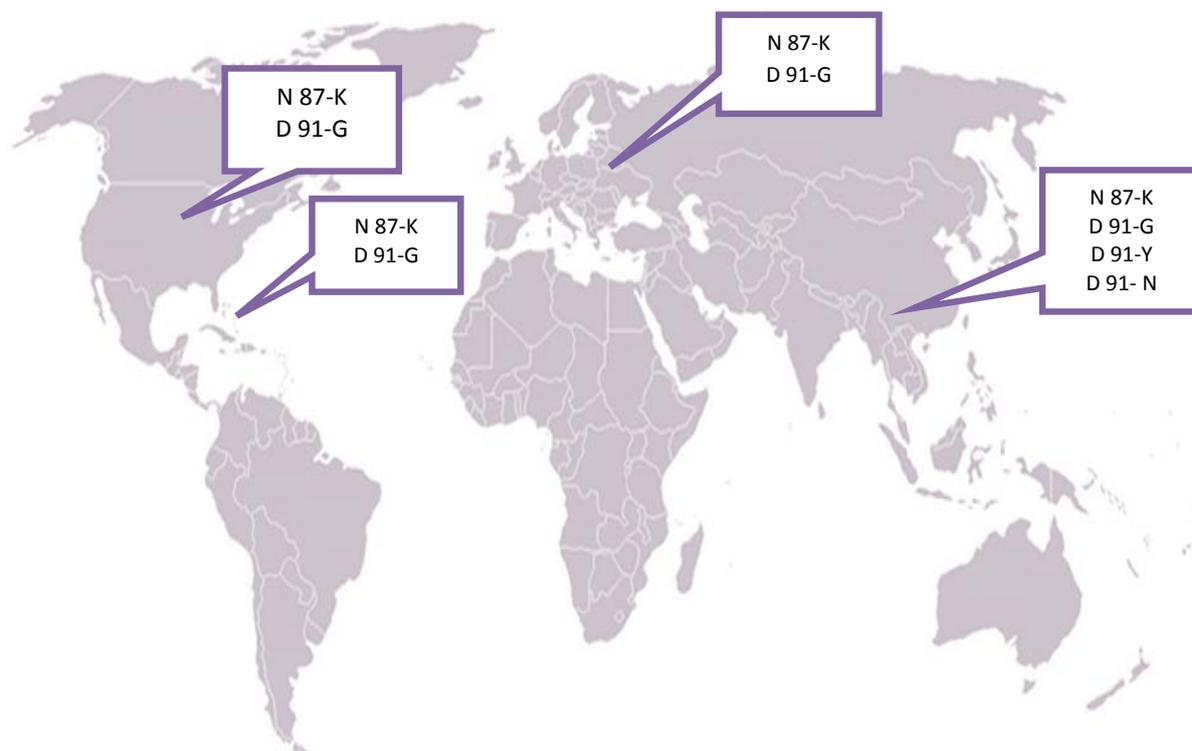
12.3 MUTACIONES RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A FLUOROQUINOLONAS REPORTADOS POR CONTINENTES

* Mutaciones relacionadas

CONTINENTE	Mutaciones de la resistencia <i>H. pylori</i> a fluoroquinolonas
America del Norte	N 87-K D 91-G
America Central	N 87-K D 91-G
America del Sur	N
Europa	N 87-K D 91-G
Asia	N87-K D 91-G D 91-Y D 91-N
Africa	N
Oceanía	N

N: No hay estudios reportados.

* Mapamundi de las mutaciones relacionadas con la resistencia de *H. pylori* a Fluoroquinolonas por Continentes:



13. DISCUSIÓN

La prevalencia de resistencia de *Helicobacter pylori* a las fluoroquinolonas en todo el mundo parece estar en aumento con cifras de 23,7%, esto podría reducir la eficacia de la erradicación del *H. pylori* con los regímenes terapéuticos que incluyen las fluoroquinolonas. Por lo tanto, su uso debe ser reservado como terapia de segunda línea como se sugiere en la actualidad. Las fluoroquinolonas se han empleado en una gran variedad de infecciones como tratamiento de elección o alternativo, tanto a nivel hospitalario como extra hospitalario, teniendo en cuenta el compuesto, se emplean en infecciones del tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual, osteomielitis crónica, infecciones del tracto respiratorio e infecciones sistémicas graves, entre otras. Obteniendo mejores resultados en el tratamiento de episodios de peritonitis en los enfermos renales sometidos a diálisis peritoneal y una mínima actividad contra *Streptococcus pneumoniae* y contra bacterias anaerobias en enfermedades de las vías respiratorias (Cunha, et. al. 2008).

La resistencia a las fluoroquinolonas dependerá del patógeno (que sea más o menos sensible de principio), del antibiótico (que sea más o menos activo), del lugar de la infección y la carga bacteriana (a mayor carga bacteriana, mayor probabilidad de surgimiento y posterior selección de mutaciones resistentes), de la integridad de los mecanismos de defensa del hospedador y de la dosis usada (adecuada o baja), entre otros factores (Alós, et. al. 2003).

La resistencia primaria de *H. pylori* a las fluoroquinolonas es común a nivel mundial, esto se debe al consumo de estos medicamentos para otras infecciones tales como infecciones oftalmológicas, infecciones respiratorias, infección de los huesos y de articulaciones e infecciones urinarias (Francesco, et. al. 2010). La mutación primaria es espontánea ocurre a una frecuencia baja, aunque depende de cada especie. Por tanto, puede predecirse que las resistencias surgirán en tratamiento de infecciones por bacterias que no sean de principio muy sensibles a las fluoroquinolonas usadas y/o que se den en lugares de más difícil acceso del antibiótico.

La resistencia secundaria de *H. pylori* tiene que ver con el uso inadecuado del tratamiento, tales como: las dosis inapropiadas del medicamento y no terminar la terapia de acuerdo a la recomendación médica.

En Europa la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas, de acuerdo a los estudios de esta revisión general es del 15,2%, la resistencia evaluada mediante la prueba de E-test fue 14,9% IC95% (13-17%) y con Dilución en agar de 17,2% IC95% (11-24%); mientras en Asia fue del 31,7% y se observó en relación con la prueba de E-test 31,7% IC95% (29-34%) y con Dilución en agar 31,7% IC95% (28-35%). Según esto podemos decir que la prevalencia en Asia es del doble con respecto a la general.

En el continente Americano se encontraron dos estudios que muestran la resistencia general 7,3%, en norte América con relación a la prueba de E-test evidencio una prevalencia de la resistencia del 8,8% IC 95% (4-14%), mientras que en centro América el estudio realizo la prueba de resistencia por E-test de 5,7% IC95% (0,2-10%), sin embargo, el bajo número de artículos no representa lo que pasa en la región.

En cuanto a lo reportado acerca de las mutaciones una de las causas es la sustitución de los nucleótidos de *H. pylori*, motivo por el cual las fluoroquinolonas no son efectiva en la terapia de rescate.

La metodología utilizada para determinar las mutaciones en todos los estudios fue realizada por PCR convencional con secuenciación y se confirmó la mutación por RFLP-PCR. En general el mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas se debe a mutaciones específicas en los genes que codifican la topoisomerasa II (*ADN girasa*) y/o la topoisomerasa IV, en *H. pylori*, solo las mutaciones en el gen del *ADN girasa* han sido reportadas en la resistencia a las fluoroquinolonas, esta resistencia genotípica de *H. pylori* a las fluoroquinolonas es debido a las mutaciones puntuales en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* en la posición *N87K* (16,2%), *D91G* (13,2%), *D91N* (8,7%), *D91Y* (3,2%); sin embargo. Las mutaciones en la posición *N87* fueron más frecuentes que en el *D91* según lo observado y esta sustitución presenta una alta tasa en el fracaso de erradicación del tratamiento. La mutación en el gen *gyrB* de la resistencia primaria a la fluoroquinolonas por *H. pylori* se informó sólo en Japón. Sin embargo, casi todos los estudios determinaron mutaciones en *gyrA N87* o *D91*.

En muy pocos estudios evidencio la mutación en *gyrB* y cuando se observó estaba relacionada con la mutación en *gyrA N87* esto indica que esta mutación tiene un bajo impacto en la resistencia con las fluoroquinolonas por *H. pylori*. Además las mutaciones tienen relación con la Concentración Mínima Inhibitoria con un punto de corte ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$, la resistencia a las fluoroquinolonas es progresiva y resulta de sustituciones sucesivas de aminoácidos de las subunidades que aumentan la concentración mínima inhibitoria (CIM).

La revisión sistemática es un tipo de estudio que permite llevar a cabo este objetivo por medio de la búsqueda y exploración de estudios realizados con la prevalencia de la resistencia, las mutaciones relacionadas y su análisis estadístico.

Durante la búsqueda de la revisión se observó poca disponibilidad de artículos sobre el tema, se encontró que los artículos determinaban la prevalencia o las mutaciones y en algunos se determinó ambas características.

Una revisión sistemática realizada en Italia en el 2010 da cuenta de los pocos estudios acerca del tema, en ella se describió la prevalencia de la resistencia en diferentes antibióticos por *H. pylori*, en este se determinó que la resistencia a nivel mundial está en aumento. En la presente revisión se evaluó las fluoroquinolonas y las mutaciones relacionadas con esta resistencia, es decir, *H. pylori* es resistente a la mayoría de los antibióticos, esta bacteria genera mutaciones hecho que la hace resistente, y por consecuencia está en aumento a nivel mundial.

14. CONCLUSIONES

- La principal prevalencia de la resistencia a nivel mundial de *H. pylori* a fluoroquinolonas se observó en Europa (E-test de 14,9% y Dilución en agar de 17,2%) y Asia (tanto la prueba de E-test como la Dilución en agar es de 31,7%).
- La tasa de Suramérica no se determinó por pocos estudios.
- Los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fluoroquinolonas son debidos a mutaciones puntuales en el *gen DNA girasa, gyrA*; principalmente en los codones Asn87-Lys, Asp91-Gly, Asn 87-Thr, Ala88-Val y Asp91-Asn.
- Se describió que las mutaciones en la posición N87 es más frecuente que en la posición D91; las mutaciones en N87 están asociadas con un alto nivel de resistencia.
- La mutación en *gyrB* se observaba en relación con la mutación en *gyrA N87* esto indica que esta mutación tiene un bajo impacto por su poca evidencia en la resistencia con las fluoroquinolonas por *H. pylori*.
- Las revisiones sistemáticas requieren esfuerzo considerablemente superior que las revisiones de la literatura convencionales.

15. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para estudios posteriores determinar si existen otros mecanismos en las cepas de *H. pylori* responsables de la resistencia en las que no presentan mutaciones en el QRDR.
- Se recomienda efectuar investigaciones experimentales que permitan realizar nuevas revisiones sistemáticas de la literatura con el objetivo de analizar nuevos métodos.
- También se recomienda realizar estudios que permitan conocer la situación actual de resistencia a los antibióticos usados como tratamiento para *Helicobacter pylori* en Sur América, Centro América y Norte América.

16. REFERENCIAS

1. Cammarota G, Cianci R, Cannizzaro O et al. (2000) Efficacy of two one-week rabeprazole/levofloxacin-based triple therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*; 14: 1339–43.
2. Bauernfeind, A. (1997). Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:639-651.
3. Fujimura, S., S. Kato, K. Inuma, and A. Watanabe. (2004). In vitro activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J. Med. Microbiol.* 53:1019-1022.
4. Heep, M., M. Kist, S. Strobel, D. Beck, and N. Lehn. (2000). Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:538-54.
5. Alarcon Teresa, Domingo Diego, Lopez-Brea Manuel, (1998), Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Rev International Journal of Antimicrobia, I Agents* 12; pag 19–26.
6. Bezmin Abadi Amin Talebi, Mobarez, Ashraf M. Taghvaei Tarang, y Wolfram Lutz, (2010); Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Mazandaran, North of Iran. *Helicobacter* vol. 15, pag 1523-5378
7. Boyanova Lyudmila, Nikolov Rossen, Lazarova Elena, Gergova Galina, Katsarov Nikolai, Kamburov Victor, Spassova Zoya, Derejian Sirigan, Jelevo Christo, Mitov Ivan y Krastev Zacharii, (2006), Antibacterial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Bulgarian children and adult patients over 9 years, *Revista Journal of Medical Microbiology*, Vol 55, pag 65–68
8. Dzieniszewski J, Jarosz M; (2006). Guidelines in the medical treatment of *helicobacter pylori* infection. *Journal of physiology and pharmacology*, Vol 57, pag 143.154
9. Romano M, Iovene M R, Russo M I, Rocco A, Salerno R, Cozzolino D, Piloni A P, Tufano M A, Vaira D, Nardone G, (2008). Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates; *J Clin Pathol* Vol. 61, pag 1112-1115.
10. Marco Berning, Susanne Krasz and Stephan Miehlke, (2011). Should quinolones come first in *Helicobacter pylori* therapy? *Ther Adv Gastroenterol* 4(2) 103_114.
11. Versalovic J, Fox J. *Helicobacter*. In: Murray P, editor. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 2003.
12. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:720–41.
13. Ford AC, Delaney BC, Forman D, et al. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD003840.
14. Kim JM, Kim JS, Jung HC, et al. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4843–7.
15. Kim JM, Kim JS, Kim N, et al. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:6–13.
16. Lee CC, Lee VW, Chan FK, Ling TK. Levofloxacin-resistant *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Chemotherapy* 2008; 54:50-53

17. Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* 2009; 14: 61-65
18. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, and Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-396
19. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, Mitani T, Morita Y, Tamura T, Kinoshita S, Okano Y, Kumagai S, Kasuga M. Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* 2006; 11: 243-249
20. Kim JM, Kim JS, Kim N, Jung HC, Song IS. Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 965-967
21. Carothers JJ, Bruce MG, Hennessy TW, Bensler M, Morris JM, Reasonover AL, Hurlburt DA, Parkinson AJ, Coleman JM, McMahon BJ. The relationship between previous fluoroquinolone use and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis* 2007; 44: e5-e8.
22. Ndip RN, Malange Takang AE, Ojongokpoko JE, et al. *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Trop Med Int Health* 2008; 13: 848-854.
23. Seck A, Mbengue M, Gassama-Sow A, Diouf L, Ka MM, Boye CS. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates in Dakar, Senegal. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3: 137-140.
24. Bruce MG, Bruden DL, McMahon BJ, et al. Alaska sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Alaska native persons, 1999-2003. *Helicobacter* 2006; 11: 581-588.
25. Vallejos C, Garrido L, Cáceres D, et al. Prevalence of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* isolated from Chilean patients. *Rev Med Chil* 2007; 135: 287-293.
26. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 327-332.
27. Caselli M, Zullo A, Maconi G, et al. "Cervia II Working Group Report 2006": guidelines on diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Italy. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 782-789.
28. Chey WD, Wong BC; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-1825.
29. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, et al; Second Asia-Pacific Conference. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1587-1600.
30. Zullo A, De Francesco V, Scaccianoce G, et al. *Helicobacter pylori* eradication with either quadruple regimen with lactoferrin or levofloxacin-based triple therapy: a multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 806-810.
31. Gisbert JP, Bermejo F, Castro-Fernández M, et al; H. pylori Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología. Second-line rescue therapy with

- levofloxacin after *H. pylori* treatment failure: a Spanish multicenter study of 300 patients. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 71-76.
32. Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
 33. Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 59-70.
 34. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384.
 35. Pérez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. *Helicobacter* 2002; 7: 306-309.
 36. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid AJ, Pot RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Vandenbroucke-Grauls CM. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 511-515.
 37. Cabrita J, Oleastro M, Matos R, et al. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 1029-1031.
 38. Pilotto A, Rassa M, Leandro G, Franceschi M, Di Mario F; Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. *GISU. Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer. Dig Liver Dis* 2000; 32: 763-768.
 39. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781.
 40. Boyanova L, Ilieva J, Gergova G, et al. Evaluation of clinical and socio-demographic risk factors for antibacterial resistance of *Helicobacter pylori* in Bulgaria. *J Med Microbiol* 2009; 58: 94-100.
 41. Petersen AM, Gjøde P, Vinge OD, Jensen S, and Kroghfelt KA. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance and risk factors in Denmark 1998-2004: no need for concern? *Helicobacter* 2006; 11: 210-211.
 42. Chisholm SA, Teare EL, Davies K, Owen RJ. Surveillance of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* at centres in England and Wales over a six-year period (2000-2005). *Euro Surveill* 2007; 12: E3-4.
 43. Hooton C, Dempsey C, Keohane J, O'Mahony S, Crosbie O, Lucey B. *Helicobacter pylori*: prevalence of antimicrobial resistance in clinical isolates. *Br J Biomed Sci* 2006; 63: 113-116.
 44. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 783-785.
 45. Huang JQ, Hunt RH. Review article: *Helicobacter pylori* and gastric cancer--the clinicians' point of view. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 3: 48-54
 46. Sipponen P, Kosunen TU, Valle J, Riihelä M, Seppälä K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; 45: 319-323
 47. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
 48. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvenuto YH, Vitiello L, Miranda Mde C, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 20

49. Liang X, Liu W, Xu WW, Xiao SD. Study on the resistance of Levofloxacin to *Helicobacter pylori*. *Weichangbinxue* 2007; 12: 589-592.
50. [26] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388:539-47.
51. Falsafi T, Mobasheri F, Nariman F, et al. Susceptibilities to different antibiotics of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients at the pediatric medical center of Tehran, Iran. *J Clin Microbiol* 2004; 42:387-9.
52. Goossens H, Ferech M, Van der Stichele R, et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365:579-87.
53. Fujimura S, Kato S, Inuma K, et al. In vitro activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J Med Microbiol* 2004; 53:1019-22.
54. Truong QC, Nguyen Van JC, Shlaes D, et al. A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:85-90.
55. Wang G, Wilson TJ, Jiang Q, et al. Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:727-33.
56. Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2241-6.