

La importancia de cultivar *Helicobacter pylori*

The growing importance of *Helicobacter Pylori*

William Otero Regino, MD.¹

¹ Profesor de Medicina, Unidad de Gastroenterología.
Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo
Clínica Fundadores, Bogotá, Colombia

Fecha recibido: 28-02-13
Fecha aceptado: 04-03-13

Evidencias recientes apoyan el concepto de que *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ha colonizado el estómago humano desde hace por lo menos 58.000 años (1); sin embargo, hace solo 30 años (abril 1984) fue definitivamente cultivado por Warren y Marshall y asociado a gastritis crónica y úlceras pépticas (2). Desde ese momento, consistentemente se ha ratificado su papel etiológico en diversas patologías digestivas superiores. Globalmente *H. pylori* infecta por lo menos a la mitad de la población adulta mundial (3, 4) y 80 a 90% de la población de los países en vías de desarrollo (3, 4). Diez años después de su descubrimiento, la agencia internacional para la investigación en cáncer de la OMS (IARC) lo catalogó como carcinógeno tipo I o carcinógeno definido (5). Hoy día es considerado la principal causa demostrada de gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma MALT gástrico y cáncer gástrico (CG) (6-8). En todos los infectados produce gastritis crónica (6), sin embargo, en la mayoría de los pacientes es asintomática y en menos de 20% se produce una entidad clínica: úlceras pépticas en 15-18%, CG en 2-3%, cáncer gástrico y linfoma MALT gástrico en menos de 0,1% (7, 8). Las consecuencias finales de la infección dependen de factores genéticos del individuo infectado, de la virulencia de la bacteria y de factores ambientales (7). Estudios epidemiológicos han estimado que *H. pylori* causa por lo menos 75% de los cánceres gástricos (CG) (8), esto equivaldría a que de los 988.000 casos nuevos de CG ocurridos en 2008, según GLOBOCAN (9), casi 750.000 no hubieran sucedido si *H. pylori* no existiera. Desde cuando la IARC lo consideró un carcinógeno definido, muchos estudios se han realizado para determinar si la erradicación puede contribuir a la disminución del CG. En 2008, Fukase en Japón, lideró un estudio multicéntrico y demostró que después de la resección endoscópica de CG temprano, la erradicación de *H. pylori* redujo la incidencia de CG en una tercera parte (10); otro estudio en una zona de alta incidencia de CG de la China encontró que la erradicación de la infección antes de la aparición de lesiones precursoras como atrofia y metaplasia, disminuyen notablemente el riesgo de CG (11). En la más reciente conferencia de consenso, se concluyó que su erradicación es preventiva para el CG (12). Expertos de Japón, país líder en estrategias preventivas de CG, han introducido la erradicación de *H. pylori* en el proyecto de eliminación del CG al lado de la vigilancia de pacientes de alto riesgo, así como el tratamiento endoscópico del CG temprano (13). De esta manera, la política de solamente prevención secundaria de CG ha sido reconsiderada y se ha combinado con la profilaxis primaria mediante la erradicación de *H. pylori*, y la profilaxis secundaria mediante *screening* endoscópico de acuerdo a la estratificación del riesgo con base en la serología para *H. pylori* y pepsinógenos séricos (14). Este microorganismo también está causalmente relacionado con tres entidades

hematológicas: anemia por deficiencia de vitamina B12, púrpura trombocitopénica inmune y anemia por deficiencia de hierro (12). Con respecto a esta última, la asociación ha sido conclusivamente demostrada en adultos y en niños (15, 16) y la Sociedad Británica de Gastroenterología considera que es tan fuerte la asociación que en pacientes con anemia ferropénica, se debe investigar y erradicar la infección si esta es positiva y la endoscopia negativa para causas de anemia (17). *H. pylori* también puede aumentar el riesgo tanto para pólipos adenomatosos como para cáncer del colon (18-24). La asociación parece ser más fuerte para los cánceres distales (20) y la tendencia observada en la disminución de este último tumor en países industrializados, podría estar relacionada con la disminución de esta infección (23). Por su participación etiológica en diversas entidades clínicas, *H. pylori* genera un enorme impacto en la vida y en los sistemas de salud, por lo cual sigue siendo vigente la necesidad de investigarlo en diferentes aspectos: sus factores de virulencia, la interacción con el hospedero, la respuesta inmune, estrategias para erradicarlo con antibióticos y su prevención mediante el desarrollo de vacunas terapéuticas, que además podrían proteger contra el CG (25). De esta manera, *H. pylori* produce una considerable morbimortalidad y por lo tanto su diagnóstico y su tratamiento son de la mayor importancia. El diagnóstico se puede hacer de manera indirecta o de manera directa (26). La detección indirecta de la infección se puede realizar determinando la actividad de sus enzimas: test de ureasa rápida, sensibilidad en biopsia gástrica 96%, test respiratorio con urea marcada (sensibilidad y especificidad > 95%) o mediante serología que identifica anticuerpos específicos Anti *H. pylori* IgG (sensibilidad 84%) o anti-Cag A o con anticuerpos contra antígenos bacterianos expulsados en las heces (12, 26). De manera directa, demostrando la bacteria en la mucosa gástrica por histología, así como su DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el cultivo. La histología es considerada el estándar de oro en el diagnóstico directo (12,27), con una sensibilidad de 98% (26). La coloración de Giemsa convencional es el método más ampliamente utilizado (27), aunque la inmunohistopatología aumenta tanto la especificidad como la sensibilidad (27). Otro método directo es la detección del DNA por PCR en materia fecal, sensibilidad 94% (26). De todos los anteriores, el cultivo es considerado el método más específico y adicionalmente con múltiples utilidades tales como: clasificación genotípica del microorganismo, pruebas diagnósticas, evaluación de su toxicidad y su virulencia, determinación y monitoreo de la resistencia a los antibióticos, producción de antígenos, así como también para la determinación de los factores de virulencia y algo muy importante, la cepa identificada puede ser preservada para estudios futuros (28, 29). Sin embargo, el cultivo a partir de

biopsias gástricas no es muy popular entre los laboratorios clínicos por múltiples razones: es costoso, consume tiempo, requiere personal experto con "entusiasmo", además, *H. pylori* es exigente para su crecimiento, tiene requerimientos y condiciones especiales para su transporte, procesamiento rápido, medios de cultivo costosos y complicados, con condiciones de incubación específicas, etc. (26-30). La sensibilidad varía de 68 a 98% dependiendo de la experiencia del laboratorio y los medios de cultivo utilizados y la especificidad de 100% (31). *H. pylori* es una bacteria Gram negativa, microaerofílica de difícil crecimiento y para su cultivo hay unanimidad sobre los principios generales que incluyen un medio que contiene sangre o suero, atmósferas microaerofílicas y concentraciones de CO₂ de 10%, alta humedad, temperatura de 37 °C y periodos de incubación que varían de 4 a 10 días (26, 30). Publicaciones recientes, de manera detallada, describen las técnicas exitosamente utilizadas por laboratorios expertos en el cultivo de este microorganismo (32), así como también protocolos específicos y técnicas para la investigación de esta bacteria en el laboratorio (33). No obstante las desventajas mencionadas sobre el cultivo, es imperativo que en nuestro medio, se adquiera la suficiente experiencia en su ejecución, ya que hay situaciones clínicas que lo hacen imprescindible. En este número de la revista, Bayona MA (34) ha publicado una revisión narrativa de generalidades sobre el cultivo de *H. pylori*, que aunque no muestra la experiencia de su grupo, es un esfuerzo loable por llamar la atención sobre la importancia del mismo y la mención que hace a algunos grupos de investigación nacionales con más experiencia en este campo y que merecen ser reconocidos por el aporte sustancial al conocimiento de este microorganismo en nuestro medio (35-47).

Dada la importancia de la identificación de *H. pylori*, es necesario puntualizar algunos aspectos. *H. pylori* es un patógeno que coloniza de manera selectiva y específica el epitelio gástrico que es donde existe el receptor para su ligando (48) y por lo tanto su único reservorio natural es el estómago (49). Por lo anterior, las muestras para su cultivo son la mucosa del estómago obtenidas con biopsias (26, 27, 30, 32) así como también del jugo gástrico ya que por el continuo recambio y descamación del epitelio gástrico puede desprenderse hacia el lumen (26) y por los movimientos peristálticos alcanzar el intestino delgado y finalmente el colon y por ello ocasionalmente también podría cultivarse de las heces o determinar su presencia por técnicas inmunológicas que detectan antígenos de la bacteria y que hoy día son el principio de la prueba de los antígenos (26, 31). Por lo tanto, es incorrecto considerar que la bacteria se puede cultivar a partir de la vejiga, del recto o del esófago, a menos que de manera excepcional existiera mucosa gástrica ectópica en esos epitelios (50) y por curiosidad se

desea investigar la infección en esos sitios. El cultivo de la bacteria ocurre a partir de muestras de estómago, y rara vez es exitoso a partir de materia fecal. Con respecto a la placa dental, lo que más frecuentemente se ha utilizado es identificación de su DNA mediante PCR y muy rara vez a partir de cultivos ya que su presencia en ese sitio probablemente es transitoria y no permanente (51). En pacientes con úlcera péptica sangrante, es imperativo establecer si existe infección por *H. pylori* ya que la erradicación disminuye la recurrencia del sangrado a 2,9% vs. 20% si no se erradica y se continúa tratamiento de mantenimiento con IBP (52). Si la úlcera es producida por *H. pylori*, para evitar su reaparición basta con erradicar la infección sin necesidad de terapia de mantenimiento (52, 53). Sin embargo, el sangrado disminuye la sensibilidad del test de ureasa rápida y del cultivo pero en cambio, la histología no disminuye su rendimiento (54) y la detección del DNA por PCR parece ser superior (55), pero probablemente la serología es el método preferible en esta situación específica, por su mejor exactitud diagnóstica (56). Dada la necesidad de determinar si existe infección por *H. pylori*, de igual manera se puede utilizar el test respiratorio de urea. Por lo beneficios que proporciona su erradicación, el propósito es investigar la presencia de *H. pylori* por los métodos que sean necesarios (57). Cuando se requieren muestras gástricas para su identificación, estas no se toman de la úlcera que sangra, sino de los sitios tradicionales (antro y cuerpo).

Consideramos que el cultivo de *H. pylori* debería implementarse en el mayor número posible de laboratorios ya que en la práctica diaria provee información insustituible. Todos los expertos coinciden en que la limitante para la utilización de este excelente recurso es lo que hemos mencionado, es decir, *H. pylori* es *fastidious*, el cultivo es costoso, se requiere personal altamente entrenado, etc., pero estos inconvenientes se pueden subsanar con interés y perseverancia. En la práctica diaria, la máxima utilidad y aplicaciones del cultivo de *H. pylori* serían fundamentalmente los siguientes:

1. En estudios de intervención realizar pruebas de resistencia pretratamiento para poder determinar al final del estudio el impacto de la resistencia en el éxito de la terapia utilizada y de esa manera planear estrategias terapéuticas futuras (38).
2. Determinar localmente el patrón de prevalencia de resistencia a los diferentes antibióticos, con el fin de investigar esquemas de tratamiento más racionalmente. Al respecto, por ejemplo, con claritromicina y quinolonas hay buena correlación entre la resistencia in vitro y las tasas de erradicación postratamiento, en cambio con metronidazol no sucede así y además se ha demostrado que la resistencia in vitro puede ser superada aumentando la dosis y la duración del tratamiento (58).

3. Persistencia de *H. pylori* después de un tratamiento fallido, si el paciente necesita una endoscopia o después de un segundo tratamiento fallido (12). Una alternativa al cultivo para determinar las resistencias antimicrobianas, con menor costo y mayor rapidez pueden ser la pruebas moleculares (59).

En la actualidad, a nivel mundial la erradicación de *H. pylori* es muy complicada debido a la resistencia a los antibióticos. La terapia triple estándar con un IBP + claritromicina+ amoxicilina, se sigue recomendando como terapia de primera línea; si la resistencia a claritromicina es menor de 20% y si este esquema fracasa, se podría de manera empírica continuar con un segundo esquema que contenga levofloxacina (12). En nuestro medio se ha demostrado una alta tasa de resistencia a claritromicina (16%) y las terapias triples mencionadas, recomendadas por Maastricht IV (12), tienen tasas de erradicación de 74 y 79% respectivamente (41). Con la terapia secuencial hemos obtenido éxito en 62% (60). Si la resistencia a claritromicina es superior a 20% y al metronidazol superior a 40%, el esquema de primera línea podría ser una terapia cuádruple con bismuto, o terapia secuencial, pero si el bismuto no está disponible, terapias concomitantes (cuádruples sin bismuto) (12). En nuestro medio, recientemente Sierra y col ensayaron una terapia empírica durante 15 días, una terapia compleja que denominaron “miscelánea” que incluyó lansoprazol 2v/día, metronidazol en dosis ascendentes, amoxicilina y claritromicina con una tasa de éxito de 91% por intención de tratar (61). De todas maneras, el objetivo es erradicar *H. pylori* y los esquemas que deberían utilizarse son los que localmente hayan demostrado mejor eficacia (> 90 ó 95%), independientemente de las guías o los consensos (62, 63) y en nuestro concepto lo más importante a tener en cuenta es que si se utiliza un primer esquema y este fracasa, el tratamiento debe continuar con un segundo esquema ya que hasta el momento ningún tratamiento es 100% eficaz y por lo tanto con esquemas sucesivos, se puede lograr una eficacia final acumulativa que puede ser cercana a 100% (57, 64, 65). Idealmente, se debería utilizar el esquema con más alta tasa de éxito en la parte inicial de esta estrategia para exponer menos individuos a los antibióticos de un segundo esquema. Además, en el segundo esquema se deberían utilizar antibióticos no manejados en el primer esquema. Aunque no hay estudios en nuestro medio sobre la eficacia acumulativa de esquemas empíricos, podríamos recomendar que si se usa una terapia triple tradicional con tasas de erradicación inferiores a 80%, la próxima terapia podría ser una concomitante durante siete días con levofloxacina (500 mg) una vez al día + nitazoxanida 500 mg dos veces al día + doxiciclina 100 mg dos veces al día + esomeprazol 40 mg dos veces al

día. Utilizando este esquema con dosis menores, recientemente se encontró una tasa de erradicación de 89% (66), o durante 14 días: IBP dos veces al día + amoxicilina 1gr dos veces al día + claritromicina 500 mg dos veces al día + nitroimidazol 500 mg dos veces al día, eficacia 92% por intención de tratar (67), o una híbrida : IBP dos veces al día + amoxicilina 1gr dos veces al día durante 14 días, añadiendo en los últimos siete días claritromicina 500 mg dos veces al día y nitroimidazol 500 mg dos veces al día. Si lo anterior fracasa, ¿se necesita un cultivo con antibiograma!

REFERENCIAS

1. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manic A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915-8.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.
3. Dunn Be, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-41.
4. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-86.
5. International Agency for research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 61. Lyon: IARC 1994.
6. Otero W, Trespalacios AA, Otero E. *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 279-292.
7. Otero W, Gómez M, Castro D. Carcinogénesis gástrica. *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 314-329.
8. Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 971-6.
9. Ferlay J, Shin HR, Bray F. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-17.
10. Fukase K, Kato M, Kikuchi S. Effect of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 392-7.
11. Wong BC, Brown LM, Zhang L. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-94.
12. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664.
13. Asaka A. A new approach for elimination of gastric cancer deaths in Japan. *Int J Cancer* 2013; 132: 1272-6.
14. Kato M, Asaka M. Recent development of gastric cancer prevention. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42: 987-94.
15. Qu XH, Huang XL, Xiong P, et al. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 886-96.
16. Muhsen K, Cohen D. *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter* 2008; 13: 323-40.
17. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB. British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2011; 60: 1309-16.
18. Zumkeller N, Brenner H, Zwahlen M, Rothenbacher D. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Helicobacter* 2006; 11: 75-80.
19. Zhao YS, Wang F, Chang D, et al. Meta-analysis of different test indicators: *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 875-882.
20. Zhang Y, Hoffmeister M, Weck MN, et al. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* 2012; 175: 441-450.
21. Inoue I, Mukoubayashi C, Yoshimura N, et al. Elevated risk of colorectal adenoma with *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis: a population based case-control study. *Int J Cancer* 2011; 129: 2704-2711.
22. Hong SN, Lee SM, Kim JH, et al. *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenomas: cross-sectional study and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2184-2194.
23. Sonnenberg A, Genta R. *Helicobacter pylori* is a risk for colonic neoplasms. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 208-15.
24. Wu Q, Yang ZP, Xu P, Gao LC, Fan DM. Association between *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 2013 May 15 (Epub ahead).
25. Sutton P, Chionh YT. Why can't we make an effective vaccine against *Helicobacter pylori*? *Expert Rev Vaccines*. 2013; 12: 433-41.
26. Mohammadi M, Hashani SS, Garoosi Y, Talebkhan T, Jahangiti S. In vivo measurement of *Helicobacter pylori*. *Meth Mol Biol* 2012; 921: 239-49.
27. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Mefraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2012; 17 (Suppl. 1): 1-8.
28. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. The use of AlbuMAXII as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2011; 17: 68-76.
29. Asaka M, Kato M, Takahashi S, Fukuda Y, Sugiyama T, Ota H, et al. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2009 revised edition. *Helicobacter* 2010; 15: 1-20.
30. Cover TL. Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol* 2012; 921: 11-15.
31. Cutler AF. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterologist* 1997; 5: 202-12.
32. Whitmire JM, Merrell DS. Successful culture techniques for *Helicobacter* Species: general culture techniques for *Helicobacter pylori*. *Meth Mol Biol* 2012; 921: 17-27.
33. Houghton JM (Edit). *Helicobacter Species Methods and Protocols* Springer Science Business Media, 2012.
34. Bayona MA. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 2013; 28: 94-99.

35. Henao S, Otero W, Martínez J, et al. Resistencia primaria de *Helicobacter pylori* a metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 10-15.
36. Henao SC, Quiroga A, Martínez JD, Otero W. Resistencia primaria a claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 110-115.
37. Ávila JM, Rey M, Mercado MM; Villamizar OR, Otero W, Trespalacios AA. Comparación de las pruebas de dilución en agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. *Rev sistemática de la literatura. Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 116-27.
38. Trespalacios AA, Otero W, Mercado Marcela. Resistencia de *Helicobacter pylori* a claritromicina, amoxicilina y metronidazol en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* 2010; 25: 31-8.
39. Trespalacios AA, A. Arévalo, W Otero M, Mercado, E. Caminos, R. Potou, D. Graham, E. Rimbara. Primary Levofloxacin resistance among *H. pylori* in Colombia. *Helicobacter* 2010; 15: 287-8 (Abstract).
40. Arévalo A, Trespalacios AA, Otero W, Mercado M, Potou R. Prevalence of *cagA*, *vacA*, *babA2* and *iceA* Genes in *H. pylori* Strains Isolated from Colombian Patients with Functional Dyspepsia. *Polish Journal of Microbiology* 2012; 61: 33-40.
41. Trespalacios AA, Otero W, Mercado M, et al. Impacto de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos en la eficacia de la terapia triple estándar y en dos triples terapias con levofloxacina en pacientes colombianos. *Gastroenterol Latinoam* 2012; 23: S35.
42. Mercado M, Trespalacios AA, Otero W. Sensibilidad de *Helicobacter pylori* a claritromicina y a levofloxacina y el éxito terapéutico. *Gastroenterol Latinoam* 2012; 23: S35.
43. Duque R, Arévalo A, Poutou R, Trespalacios AA. Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010; 15: 303-12.
44. Citty D, Henao S, Orozco O, Martínez JD. Detección de *Helicobacter pylori* en Colombia: diferentes metodologías aplicadas a su estudio en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. *Rev Col Gastroenterol* 1999; 14: 164-169.
45. Trespalacios AA, Mercado M, Otero W, et al. Prevalencia de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos utilizados en las terapias de primera línea y de rescate en Colombia. *Gastroenterol Latinoam* 2012; 23: S36.
46. Quiroga, A, Citty, D, Bravo, M. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *H. pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica* 2005; 25: 325-334.
47. Navarro J, Perea A, Pineda J, Díez O, Mercado M, Trespalacios A. Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *H. pylori*. *Universita Scientiarum* 2007; 12: 79-86.
48. Basset C, Holton J, Gatta L, Ricci C, Bernavucci V, Liuzzi G, Vaira A. *Helicobacter pylori* infection: anything new should we know? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (Suppl. 2): 31-41.
49. Simoot DT, Resau JH, Naab T, et al. Adherence of *Helicobacter pylori* to culture human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1993; 61: 350-5.
50. Carrigan MA, Shields CJ, Keohane C, Kirwan WO. The immunohistochemical demonstration of *Helicobacter pylori* in rectal ectopic. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2009; 19: 146-8.
51. Al-Ahmad A, Kürschner A, Weckesserv S, Wittmer A, Rauberger H, et al. Is *Helicobacter pylori* resident or transient in the human oral cavity? *J Med Microbiol* 2012; 61: 1146-52.
52. Galindo JV, Otero W, Gómez M. Úlcera duodenal no complicada y complicada con sangrado: ¿cuál es la importancia del tratamiento contra *Helicobacter pylori*? *Rev Col Gastroenterol* 2010; 25: 295-300.
53. Lain L, Jensen DM Management of patients with ulcer bleeding. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 345-360.
54. Choi YJ, Kim N, Lim J, Jo SY, Shin CM, Lee HS, et al. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer peptic bleeding. *Helicobacter* 2012; 17: 77-85.
55. Saez J, Belda S, Santibañez M, Rodríguez JC, Sola-Vera J, Galiana A, et al. Real-Time PCR for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with upper gastrointestinal bleeding: a comparison with other classical diagnosis methods. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3233-7.
56. Stenstrom, B., Mendis, A. Marshall, B. *Helicobacter pylori*—the latest in diagnosis and treatment. *Aust. Fam. Physician* 2008; 37: 608-612.
57. Barkun A, Bardou M, Kuipers E, Sung J, Hunt R, Martel M, et al. International Consensus Recommendations on the Management of Patients With Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding. *Ann Intern Med* 2010; 152: 101-113.
58. Fischbach L, Evans EL. Metanalysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple therapy and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol ther* 2007; 26: 343-57.
59. Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Mercado M, Caminos JE, Reddy R, Graham D. PCR Alelo-Específica para detección de resistencia de *Helicobacter pylori* a claritromicina y fluoroquinolonas en biopsias gástricas de Colombia incluyendo la identificación de una nueva mutación en *gyrA*; manuscrito en preparación.
60. Gómez M, Otero W, Melgar C. Comparación de la Terapia secuencial con la triple terapia estándar en la erradicación de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 2011; 26: 171-7.
61. Sierra F, Forero JD, Botero ML, Cárdenas AC. Pilot study: miscellaneous therapy is highly successful for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 1165-1171.
62. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 2010; 59: 1143-53.

63. Graham DY, Calvet X. Guide Regarding choice of second-line therapy to obtain a high cumulative cure rate. *Helicobacter* 2012; 17: 243-5.
64. Manfredi M, Bazzarri B, D'Angelis GL. *Helicobacter pylori* infection: sequential therapy followed by levofloxacin-containing triple therapy provides a good cumulative eradication rate. *Helicobacter* 2012; 17: 246-263.
65. Gisbert JP, Gisbert JL, Marcos S, Jimenez-Alonso I, Moreno-Otero I. Empirical rescue therapy after *Helicobacter pylori* treatment failure: a 10-year single-centre study of 500 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 346-354.
66. Basu PP, Rayapudi K, Pacana T, Shah NJ, Krishnaswamy N, Flynn M, et al. A Randomized Study comparing Levofloxacin, Omeprazole, Nitazoxanide, and Doxycycline versus Triple Therapy for the Eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1970-75.
67. Molina Infante J, Romano M, Fernández-Bermejo M, Federico A, Gravina AG, Pozzati L, et al. Optimized non bismuth quadruple therapies cure most patients with *Helicobacter pylori* infection in populations with high rates of antibiotic resistance. *Gastroenterology* 2013 online may 16.