



ABRIR 4.2 CARACTERÍSTICAS...

4.3 MÉTODOS DE TIPADO FENOTÍPICO

Considerando las características fenotípicas de *H. pylori* descritas anteriormente, se agruparon los aislamientos en cuanto al antibiotipo y biotipo.

4.3.1 ANTIBIOTIPO

Cuando se estudiaron 31 aislamientos, considerando el primer aislamiento por paciente, se detectaron los 3 antibiotipos con los siguientes porcentajes.

ANTIBIOTIPO	n ^o	%
ANTIBIOTIPO I: MET ^S CLA ^S	24	77.4%
ANTIBIOTIPO II: MET ^R CLA ^S	6	19.3%
ANTIBIOTIPO III: MET ^R CLA ^R	1	3.2%

Cuando se consideraron el total de los 47 aislamientos estudiados, se detectaron los 3 antibiotipos con los siguientes porcentajes.

ANTIBIOTIPO	n ^o	%
ANTIBIOTIPO I: MET ^S CLA ^S	33	70%
ANTIBIOTIPO II: MET ^R CLA ^S	12	25.5%
ANTIBIOTIPO III: MET ^R CLA ^R	2	4.2%

4.3.2 BIOTIPO

En las tablas siguientes se puede observar el número y el porcentaje de aislamientos encontrados con cada biotipo.

Cuando se consideraron los 29 aislamientos obtenidos a partir de pacientes no relacionados (considerando el primer aislamiento por paciente), se obtuvieron los siguientes porcentajes:

BIOTIPOS	nº cepas	%
BIOTIPO I	10	34.5%
BIOTIPO II	12	41.3%
BIOTIPO III	7	24.1%
TOTAL	29	

Cuando se consideraron el total de 38 aislamientos a partir de 29 pacientes pediátricos, se obtuvieron los siguientes porcentajes:

BIOTIPOS	nº cepas	%
BIOTIPO I	12	31.5%
BIOTIPO II	18	47.3%
BIOTIPO III	8	21%
TOTAL	38	

En los 19 aislamientos estudiados que proceden de pacientes no relacionados se detectan los 3 tipos de patrones.

En los 13 aislamientos obtenidos a partir de 6 pacientes, durante diferentes períodos del tratamiento, se observa que: 1 paciente mostró el mismo patrón en los dos aislamientos, mientras que, en los otros 5 pacientes, los patrones eran diferentes. Estos resultados no concuerdan con los métodos moleculares utilizados.

En un paciente, en el que se detectaron dos aislamientos con diferente morfología, se observó el mismo patrón. En un paciente con diferencias en la sensibilidad, el patrón era diferente, resultado que no concuerda con los métodos moleculares utilizados.

En el caso de los aislamientos de dos hermanos, los patrones eran también diferentes, estando en concordancia con los métodos moleculares.

Figura 16. Porcentaje de aislamientos clasificados en cada antibiotipo.

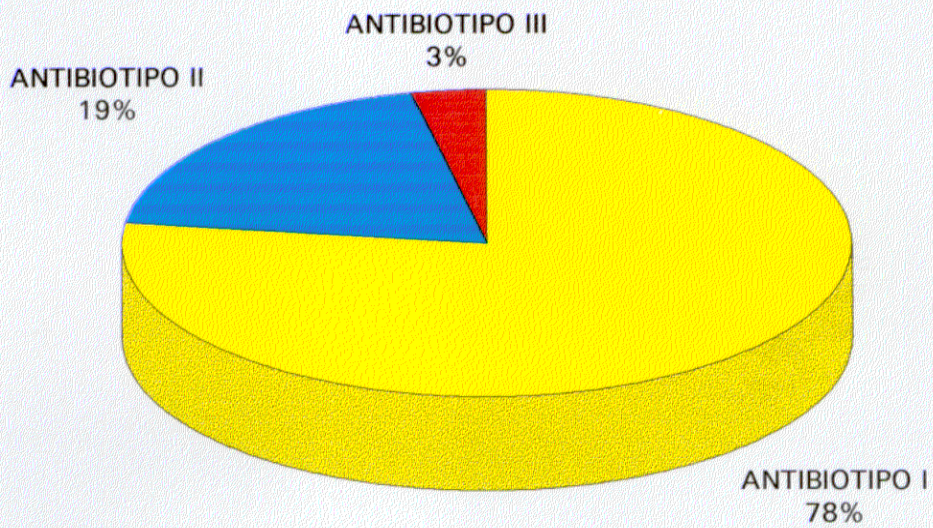
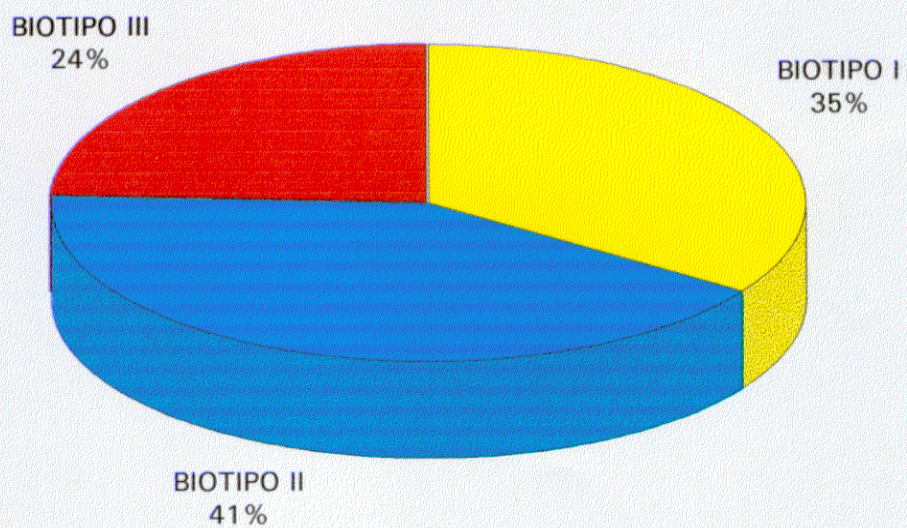


Figura 17. Porcentaje de aislamientos clasificados en cada biotipo.



4.4 MÉTODOS DE TIPADO GENOTÍPICO

4.4.1 ESTUDIO DE PLÁSMIDOS

Se estudiaron un total de 34 aislamientos de *H. pylori* obtenidos a partir de 31 pacientes pediátricos. Los resultados se encuentran en la tabla 31. El resultado de cada aislamiento se puede observar en las tablas 33, 34 y 35.

Tabla 31. Número y porcentaje de aislamientos que muestran 1 ó 2 plásmidos o ninguno. Se ha considerado únicamente 1 aislamiento por paciente, con 3 excepciones en que los patrones de los aislamientos del mismo paciente eran claramente diferentes (6 aislamientos a partir de 3 pacientes).

	nº cepas	%
No plásmidos	25	73.5%
1 plásmido	5	14.7%
2 plásmidos	4	11.7%
Total	34	

Los patrones obtenidos en los aislamientos que poseen 1 ó 2 plásmidos son diferentes con pesos moleculares entre 7.9 y 1 MDa, y se han definido como P1a, P1b, P1c, P1d, P2a, P2b, P2c y P2d. Pero únicamente el 27.2% de los aislamientos poseen plásmidos.

El patrón de plásmidos no fue el mismo en tres casos, en los que se estudiaron aislamientos del mismo paciente:

Caso 1. Tres aislamientos del mismo paciente (179, 283 y 314). Los dos primeros presentan un plásmido de 6.0 MDa, mientras que el tercero no lleva plásmido.

Caso 2. Cepas 301 y 343. En el primer aislamiento no se detectó la presencia de plásmidos y, sin embargo, en el segundo, se observaron dos plásmidos de 5.7 y 3.0 MDa.

Caso 3. Cepas 149G y 149P aisladas de la misma biopsia, pero con diferencias en la morfología, que fueron separadas como grande y pequeña. En el aislamiento 149P no se detectó la presencia de plásmidos, mientras que en el 149G se observó uno de 4.7 MDa.

Patrón	Aislamiento	Plásmidos
P1a	149 G	4.7 MDa
P1b	179/283/197	6.0 MDa
P1c	274	6.9 MDa
P1d	305	7.9 MDa
P2a	106	1.5 MDa / 1 MDa
P2b	343	5.7 MDa / 3.0 MDa
P2c	16	6.9 MDa / 4.1 MDa
P2d	253	3.5 MDa / 2.0 MDa

Figura 17. Gel de electroforesis teñido con Bromuro de Etidio, en el que se observan diferentes aislamientos de *H. pylori* que muestran plásmidos.

Líneas 1, 2, 3 y 9: Aislamientos números 106, 343, 16 y 253, que muestran dos plásmidos cada uno.

Líneas 5, 6, 7, 8, 10 y 11: aislamientos 149G, 179, 283, 197, 274 y 305 que muestran 1 plásmido cada uno.

Línea 4: aislamiento 301 sin plásmidos.

M es el marcador de peso molecular.



4.4.2 ESTUDIO ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se estudiaron un total de 29 aislamientos de *H. pylori* a partir de 19 pacientes pediátricos.

Se probaron dos enzimas de restricción *HindIII* y *HaeIII*. El ADN de todos los aislamientos, excepto uno, pudo ser digerido con un enzima y, en la mayoría de los casos, con las dos enzimas probadas. Cuando un aislamiento se digería con los dos enzimas, los patrones eran diferentes pero concordantes en cuanto al resultado. El aislamiento que no pudo digerirse con *HindIII* ni con *HaeIII* se consideró como un patrón más.

En los 16 aislamientos obtenidos a partir de 6 pacientes se consiguieron determinar un total de 8 patrones diferentes, que se encuentran en las tablas 33 y 34, y se definieron como ER1 al ER8.

De los 5 pacientes en los que se estudió más de un aislamiento en diferentes momentos del tratamiento, se encontraron 3 pacientes en los que los patrones obtenidos eran similares y dos en los que los patrones eran diferentes. En los aislamientos con diferencias en la sensibilidad a metronidazol (el aislamiento normal y la subpoblación resistente) se observó el mismo patrón, por lo tanto, se deduce que las diferencias en el genoma son más pequeñas de las que este sistema de tipado puede detectar.

En los 13 aislamientos de 13 pacientes se detectaron patrones diferentes, aunque era difícil compararlos cuando se encontraban en diferentes geles, por el gran número de bandas próximas que se observaban. Los patrones fueron definidos como ER9 al ER20 (tabla 35).

Figura 18. Patrones de ADN cromosómico digerido con enzimas de restricción en 10 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 3 pacientes pediátricos.

Líneas 1, 8 y 13: Marcador de peso molecular.

Líneas 2, 3, 4 y 5: Aislamientos número 70, 163, 190 y 286 de un paciente digerido con *HaeIII*.

Líneas 6 y 7: Aislamientos 179 y 283 de un paciente digerido con *HaeIII*.

Líneas 9, 10, 11 y 12: Aislamientos 170, 170sp, 193 y 193sp de un paciente digerido con *HindIII*.

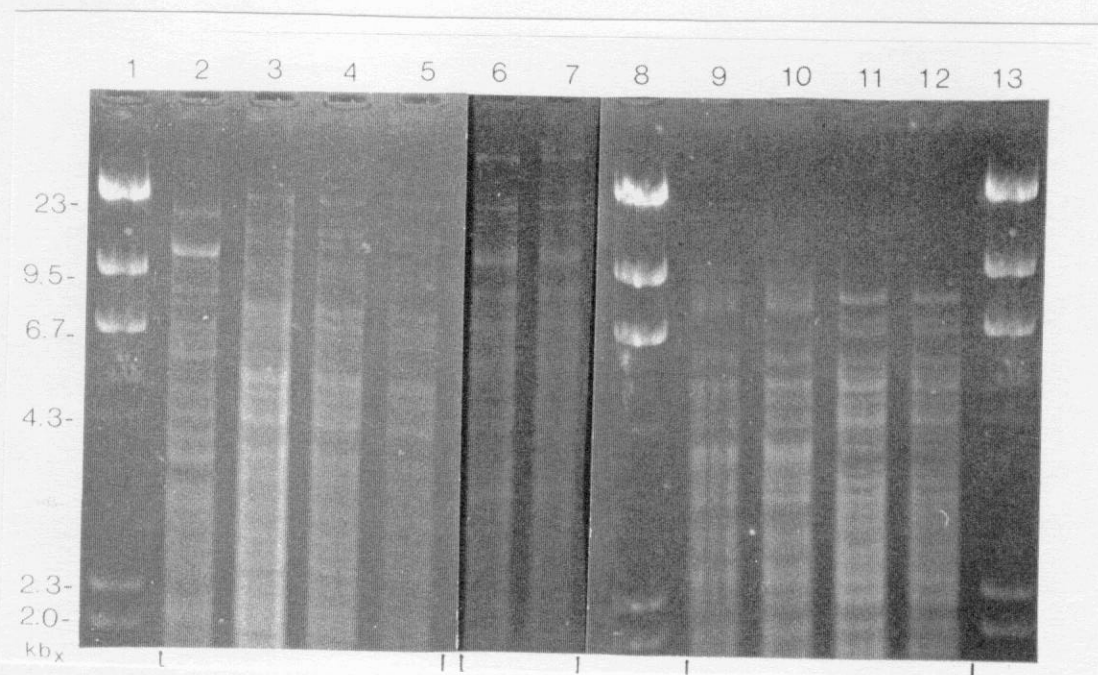


Figura 19. Patrones de ADN cromosómico digerido con enzimas de restricción (*Hae*III) en 10 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 4 pacientes pediátricos.

Líneas A y B: Aislamientos 116 y 188 de un mismo paciente.

Línea C y D: Aislamientos 72 y 222 de un paciente.

Líneas E, F, G, H, I y J: aislamientos normales y con subpoblación resistentes:

170, 170sp, 193, 193sp, 130 y 130sp.

M es el marcador de peso molecular.

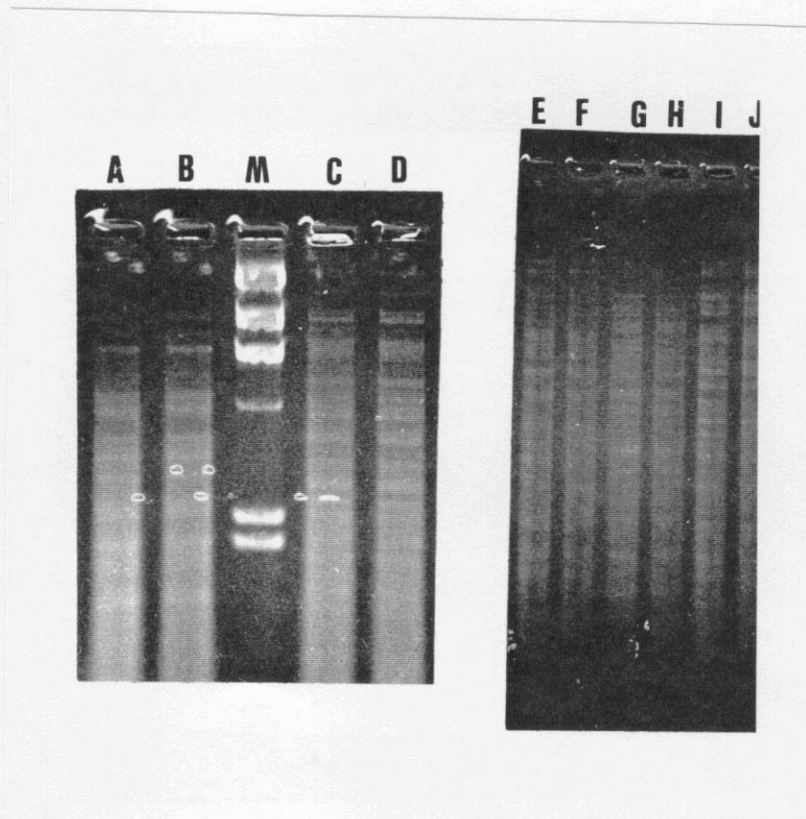


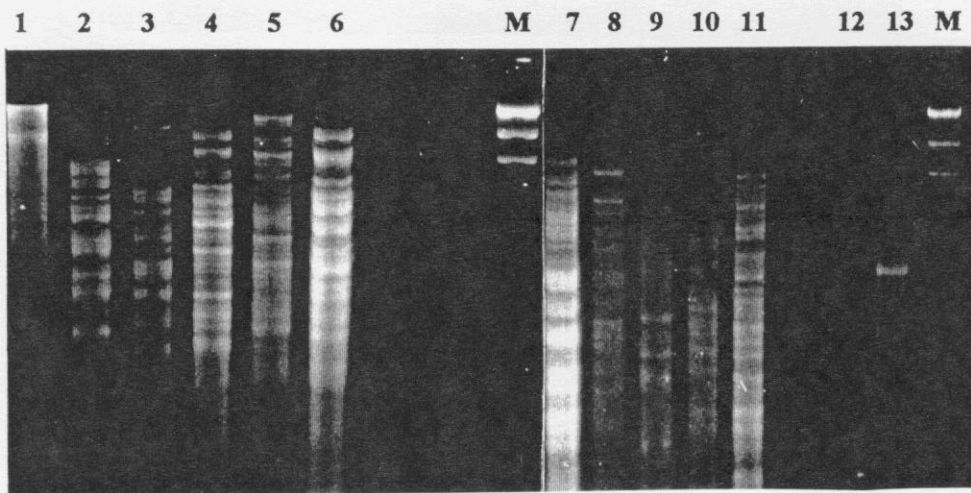
Figura 20. Patrones de ADN cromosómico digerido con enzimas de restricción en 13 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 13 pacientes pediátricos.

Líneas 1 al 13: aislamientos 39, 83, 121, 166, 174, 178, 197, 233, 242, 253, 274, 293 y 305.

M es el marcador de peso molecular.

En la línea 1, el aislamiento número 39 no ha sido digerido con *Hae*III.

Líneas del 1 al 6 han sido digeridas con *Hae*III y del 7 al 13 con *Hind*III.



4.4.3 RCP CON INICIADORES ARBITRARIOS (RCP-IA)

Se estudió un total de 35 aislamientos obtenidos a partir de 26 pacientes pediátricos.

En los 16 aislamientos obtenidos a partir de 7 pacientes se detectaron un total de 9 patrones diferentes, definidos como IA1 al IA9, que se encuentran en las tablas 33 y 34.

En los 12 aislamientos obtenidos en diferentes momentos del tratamiento de 6 pacientes se observaron los siguientes resultados: En 4 pacientes los patrones eran similares en los aislamientos estudiados, mientras que en los otros dos pacientes los patrones eran diferentes.

Los aislamientos con diferencias en la sensibilidad a metronidazol o con diferencias en la morfología produjeron el mismo patrón.

Los 2 aislamientos obtenidos a partir de dos hermanos eran diferentes (patrón IA10 y IA11), indicando la posible colonización de miembros de la misma familia por cepas diferentes.

En los 17 aislamientos, obtenidos a partir de pacientes no relacionados, los patrones obtenidos eran diferentes, aunque los patrones eran más fácilmente comparables cuando se estudiaban en el mismo gel. Se definieron los patrones IA12 al IA28 (en la tabla 35).

Figura 21. Patrones de RCP-IA de 10 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 5 pacientes pediátricos.

Líneas 1 y 2: aislamientos 70 y 190.

Líneas 3 y 4: aislamientos 222 y 468.

Línea 5 y 6: aislamientos 170 y 193.

Líneas 7 y 8: aislamientos 179 y 314.

Líneas 9 y 10: aislamientos 301 y 343.

M es el marcador de peso molecular.

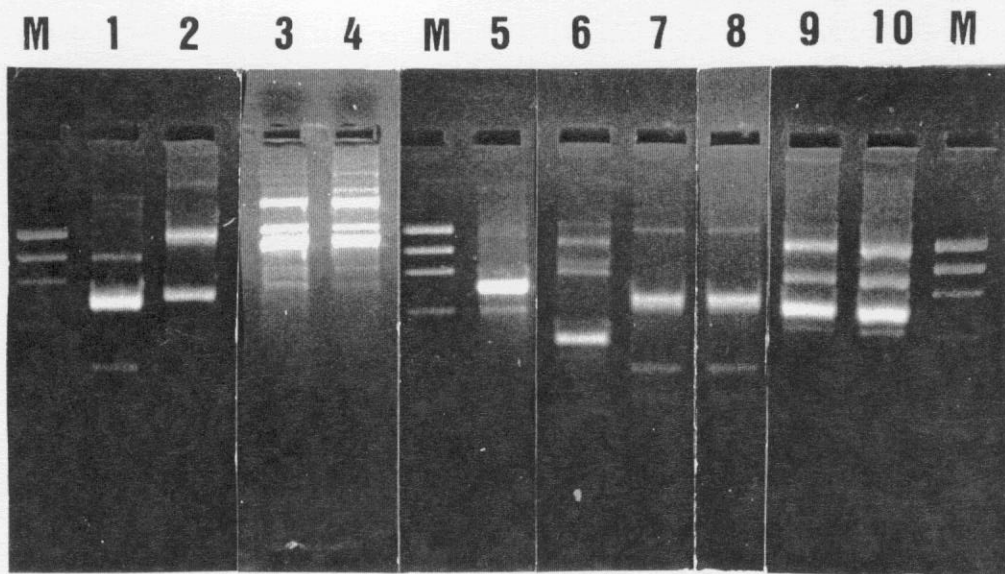


Figura 22. Patrones de RCP-IA de 10 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 5 pacientes pediátricos.

Líneas 11 y 12: aislamientos 255 y 282.

Líneas 13, 14 15 y 16: aislamientos normales y con subpoblación resistente de 170, 170sp, 193 y 193sp.

Líneas 17 y 18: aislamiento 121 con morfología pequeña y grande.

Líneas 19 y 20: aislamientos 188 y 149 obtenidos a partir de dos hermanos.

M es el marcador de peso molecular.

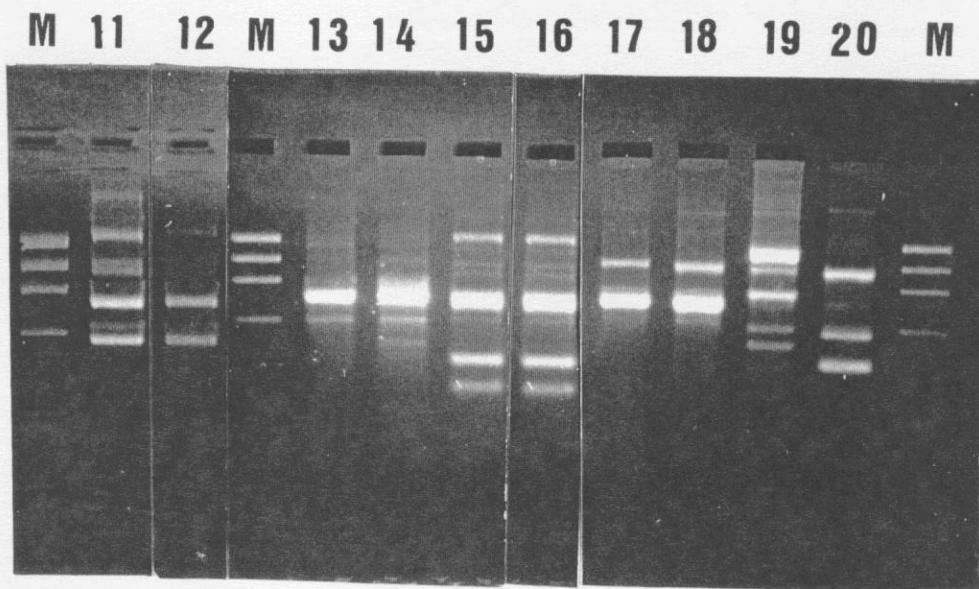


Figura 23. Patrones de RCP-IA de 8 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 8 pacientes pediátricos.

Líneas 21 al 28: aislamientos 83, 106, 130, 166, 233, 248, 253 y 259.

M es el marcado de peso molecular.

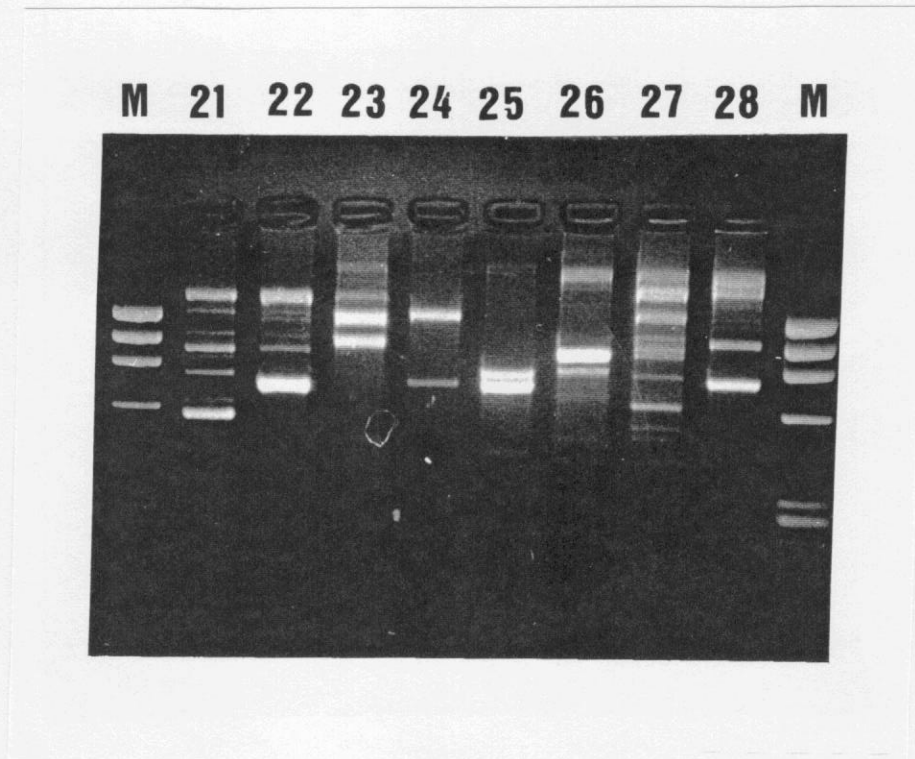
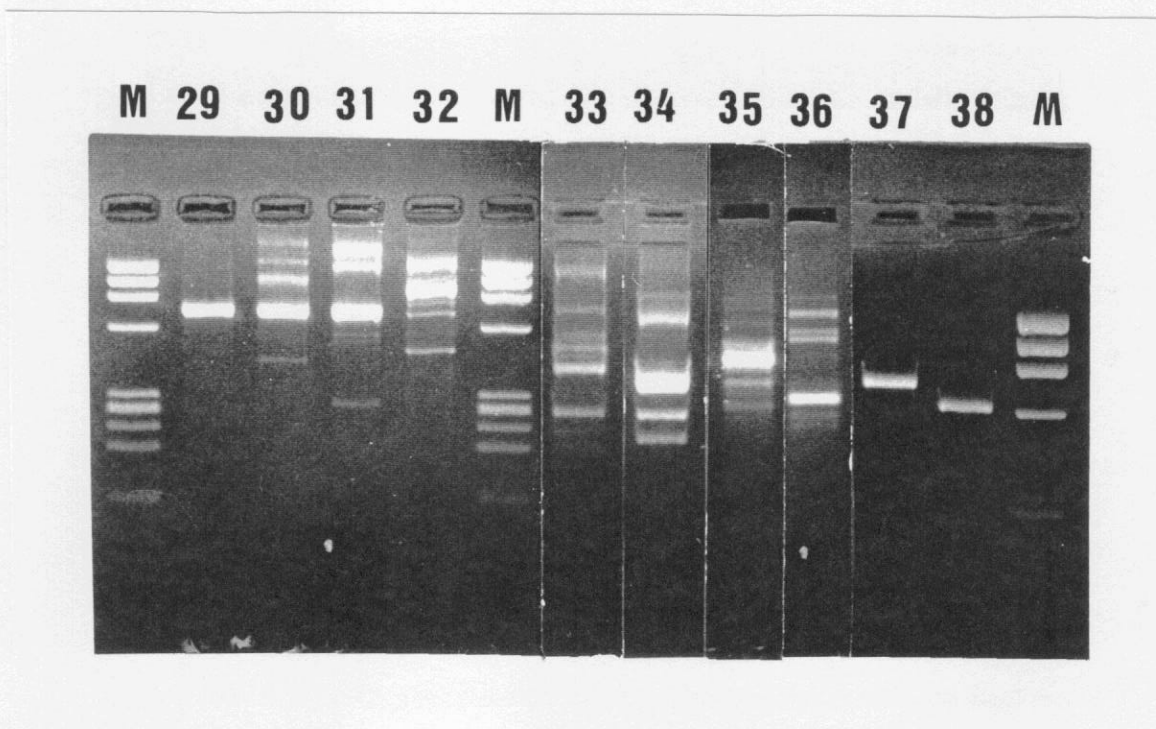


Figura 24. Patrones de RCP-IA de 10 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 10 pacientes pediátricos.

Líneas 29 al 38: aislamientos 441, 444, 463, 504, 392, 274, 293, 325, 387 y 419.

M es el marcado de peso molecular.



4.4.4 FRAGMENTO AMPLIFICADO DIGERIDO CON ER (ER-ureB)

Se estudiaron un total de 20 aislamientos, a partir de 10 pacientes pediátricos.

En 8 aislamientos, obtenidos a partir de 4 de los pacientes, no se obtuvo digestión del fragmento amplificado con este enzima y se consideró como un tipo de patrón. Se obtuvieron un total de 6 patrones diferentes. Los resultados se encuentran en las tablas 33 y 34 y los patrones se definieron como UB1 al UB5, y NO DIG (no digestión).

En los 12 aislamientos obtenidos a partir de 5 pacientes, se observó que en dos pacientes no existen diferencias en los aislamientos porque el enzima no digiere. En otro paciente se detecta el mismo patrón de digestión. En los dos pacientes restantes existen diferencias entre los patrones obtenidos en los aislamientos.

En el caso de los aislamientos que muestran diferencias en la sensibilidad a metronidazol o diferencias en la morfología, no se observaron diferencias en los patrones encontrados.

En los dos aislamientos obtenidos a partir de dos hermanos, los patrones observados eran diferentes.

Uno de los patrones, el UB1, se observó en aislamientos de 4 pacientes diferentes.

Tabla 33. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos fenotípicos y genotípicos de tipado. Grupo I: Cepas del mismo paciente en diferentes momentos del tratamiento.

nº	Paciente	Tratto	AB	BT	PL	ER	RCP-IA	ER- <i>ureB</i>
70	ISS	A	AB1	B1	0	ER1	IA1	UB1
163	ISS	B6	AB1	B1	0	ER2	ND	ND
190	ISS	B12	AB1	BII	0	ER2	IA2	NO DIG
286	ISS	B18	AB2	ND	0	ER2	ND	NO DIG
72	EMG	B1	AB1	BIII	0	ER3	ND	UB1
222	EMG	B12	AB1	BII	0	ER3	IA3	UB1
468	EMG	B18	ND	ND	0	ND	IA3	UB1
116	FP	B6	AB2	BII	0	ER4	ND	ND
188	FP	B12	AB2	BII	0	ER4	IA10	UB1
170	EQC	A	AB1	B1	0	ER5	IA4	UB2
193	EQC	B1	AB1	BII	0	ER6	IA5	UB1
179	ASR	A	AB1	B1	1b	ER7	IA6	NO DIG
283	ASR	B6	AB2	BIII	1b	ER7	ND	ND
314	ASR	B12	AB2	ND	0	ND	IA6	NO DIG
301	JRM	B1	AB3	B1	0	ND	IA7	NO DIG
343	JRM	B12	AB3	ND	2b	ND	IA7	NO DIG
255	JFG	A	AB1	B1	0	ND	IA8	ND
282	JFG	B1	ND	BII	0	ND	IA8	ND
348	JFG	B6	AB2	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 34. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos fenotípicos y genotípicos de tipado. Grupo 2: Cepas de la misma muestra: sensible y subpoblación resistente (sp) o morfología grande (G) y pequeña (P), así como aislamientos de 2 hermanos (FP y LP).

n°	Paciente	Tratto	AB	BT	PL	ER	RCP-IA	ER-ureB
16	GS	A	AB1	B1	2c	ND	ND	UB3
16sp	GS	A	AB1	ND	2c	ND	ND	UB3
72	EMG	B1	AB1	BIII	0	ND	ND	ND
72sp	EMG	B1	AB1	ND	0	ND	ND	ND
170	EQC	A	AB1	B1	0	ER5	IA4	ND
170sp	EQC	A	AB2	BII	0	ER5	IA4	ND
193	EQC	B1	AB1	BII	0	ER6	IA5	ND
193sp	EQC	B1	AB2	ND	0	ER6	IA5	ND
130	RTS	A	AB1	BII	0	ER8	ND	NO DIG
130sp	RTS	A	AB2	ND	0	ER8	ND	NO DIG
121 P	VRM	A	ND	ND	ND	ND	IA9	UB4
121 G	VRM	A	ND	ND	ND	ND	IA9	UB4
149 P	LP	A	AB1	B1	0	ND	ND	ND
149 G	LP	A	AB1	B1	1a	ND	IA11	UB5
116	FP	B6	AB2	BII	0	ER4	ND	ND
188	FP	B12	AB2	BII	0	ER4	IA10	UB1
149 G	LP	A	AB1	B1	1a	ND	IA11	UB5

Tabla 35. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos fenotípicos y genotípicos de tipado. Grupo 3: Cepas de pacientes no relacionados.

nº	AB	BT	PL	ER	RCP-IA
15	AB1	BII	ND	ND	ND
39	AB1	BI	0	NO DIG	ND
73	AB1	BII	0	ND	ND
83	AB1	BIII	0	ER9	IA12
101	AB1	BI	0	ND	ND
106	AB1	BII	2a	ND	IA13
121	AB1	BII	0	ER10	ND
122	AB2	BII	0	ND	ND
125	AB2	BII	0	ND	ND
156	AB1	BII	0	ND	ND
165	AB1	ND	0	ND	ND
166	AB1	BIII	0	ER11	IA14
174	AB1	BII	0	ER12	ND
178	AB1	BIII	ND	ER13	ND
197	AB1	BIII	1b	ER14	ND
233	AB1	BII	0	ER15	IA15
242	AB1	BII	0	ER16	ND
248	AB1	BIII	0	ND	IA16
253	AB1	BII	2d	ER17	IA17
259	AB1	ND	0	ND	IA18
274	ND	ND	1c	ER18	IA19
293	ND	ND	0	ER19	IA20
305	AB2	BI	1d	ER20	ND
325	ND	ND	ND	ND	IA21
387	ND	ND	ND	ND	IA22
392	ND	ND	ND	ND	IA23
419	ND	ND	ND	ND	IA24
441	ND	ND	ND	ND	IA25
444	ND	ND	ND	ND	IA26
463	ND	ND	ND	ND	IA27
504	ND	ND	ND	ND	IA28

4.5 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE TIPADO

4.5.1 TIPABILIDAD

En la tabla 36 se encuentran los resultados de tipabilidad de cada método (el porcentaje de cepas tipadas del total de aislamientos estudiados).

Tabla 36. Tipabilidad de cada método.

Método	Cepas estudiadas	Cepas tipadas	Tipabilidad
Antibiotipo	47	47	100%
Biotipo	38	38	100%
Plásmidos	34	9	26.5%
ER	29	28	96.5%
RCP-IA	35	35	100%
ER- <i>ureB</i>	20	12	60%

4.5.2 REPRODUCIBILIDAD

Para clasificar los aislamientos de un mismo paciente como iguales o diferentes, hemos considerado el resultado obtenido, por al menos, dos métodos de tipado, preferentemente moleculares (tabla 37).

Tabla 37. Resultados obtenidos al comparar los diferentes métodos de tipado estudiados en aislamientos de los mismos pacientes.

Pacientes	Resultado	Métodos	
		Concordantes	Discrepantes
70/163/190/286	diferente	BT/ER/IA/UB	AB/PL
72/222/468	iguales	AB/PL/ER/IA/UB	BT
116/188	iguales	AB/BT/PL/ER	
170/193	diferentes	BT/ER/IA/UB	AB/PL
179/283/314	iguales	ER/IA/UB	AB/BT/PL
301/343	iguales	AB/IA/UB	PL
255/282/348	iguales	PL/IA	AB/BT
170/170sp	iguales	PL/ER/IA	AB/BT
193/193sp	iguales	PL/ER/IA	AB
130/130sp	iguales	PL/ER/UB	AB
121P/121G	iguales	IA/UB	
188/149	diferentes	AB/BT/IA/UB	PL

Hemos calculado el porcentaje de reproducibilidad como el número de pacientes en los que el resultado concuerda con otros métodos con respecto al total estudiados. Es importante considerar que el número de pacientes incluidos es pequeño.

Tabla 38. Reproducibilidad obtenida por cada método de tipado estudiado.

Métodos	Concordantes	Discrepantes	Nº total	Reproducibilidad
Antibiotipo	4 pacientes	7 pacientes	11 pacientes	36.36%
Biotipo	4 pacientes	4 pacientes	8 pacientes	50%
Plásmidos	6 pacientes	5 pacientes	11 pacientes	54.5%
ER	8 pacientes	0 pacientes	8 pacientes	100%
RCP-IA	10 pacientes	0 pacientes	10 pacientes	100%
ER- <i>ureB</i>	8 pacientes	0 pacientes	8 pacientes	100%

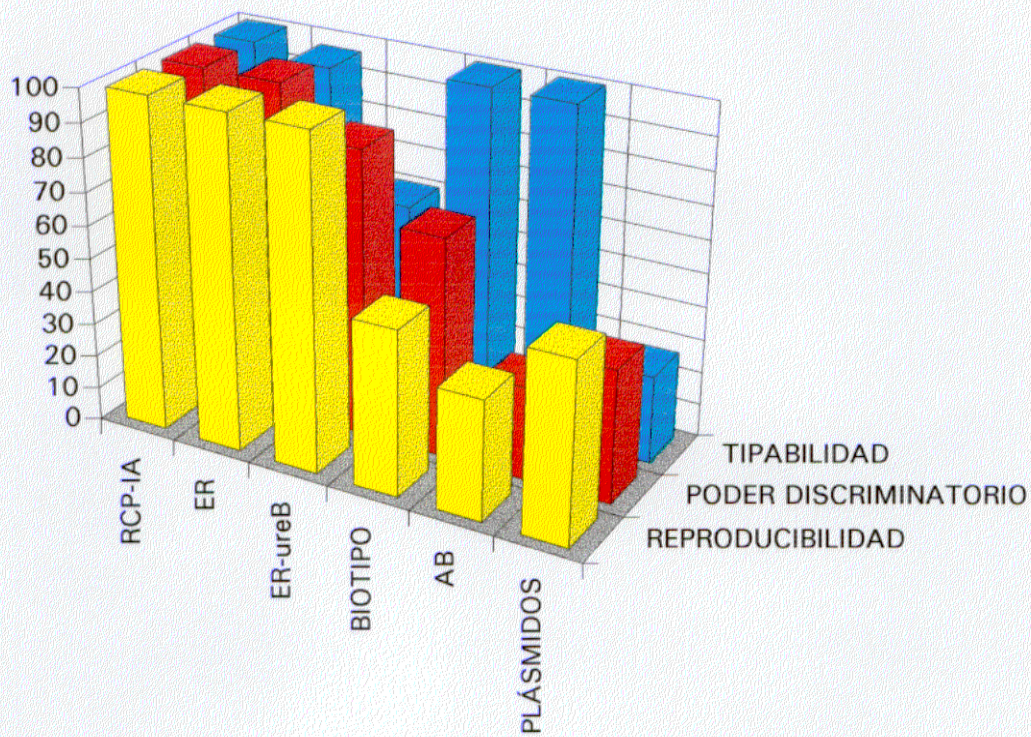
4.5.3 PODER DISCRIMINATORIO

Se han considerado todos los aislamientos estudiados que no tenían relación entre sí y el primero de cada paciente, cuando se obtenían más de uno.

Tabla 39. Índice discriminatorio (ID) de cada método de tipado estudiado.

Método	nº total cepas	Nº total de tipos	ID
Antibiotipo	31	3	0.28
Biotipo	29	3	0.66
Plásmidos	31	7	0.40
ER	19	19	1
RCP-IA	26	26	1
ER- <i>ureB</i>	10	6	0.86

Figura 26. Reproducibilidad, tipabilidad y poder discriminatorio de los diferentes métodos de tipado utilizados (Poder discriminatorio se representa como IDx100).



4.6 ESTUDIO COSTE/BENEFICIO DE LOS METODOS DE TIPADO

Para conocer qué método resultaba más válido en relación al precio y al tiempo necesario para obtener resultados, se realizaron 3 tipos de estudios:

4.6.1 PRESUPUESTO ECONÓMICO DE CADA MÉTODO

1) Presupuesto para 5 métodos de tipado (1 método fenotípico y 4 genotípicos), de acuerdo con los precios especificados anteriormente:

a) BIOTIPADO

Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/ envase	Total/ muestra
TIRA API	1	25 tiras	23.000 pts	920 pts

b) ESTUDIO DEL ADN PLASMÍDICO

Extracción	Electroforesis	Otros gastos	Total/muestra
61.7 pts	90.1 pts	50 pts	202 pts

c) MÉTODO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Extracción	Digestión	Electroforesis	Otros gastos	Total/muestra
61.7 pts	218.1 pts	90.1 pts	50 pts	420 pts

d) PRESUPUESTO MÉTODO DE RCP-IA:

Extracción	Amplificación inespecífica	Electroforesis	Otros gastos	Total/muestra
61.7 pts	83.4 pts	101.4 pts	150 pts	397 pts

e) PRESUPUESTO MÉTODO DE ER-ureB:

Extracción	Amplificación específica	Digestión	Electroforesis	Otros gastos	Total/muestra
61.7 pts	114.5 pts	158.6 pts	115.8 pts	150 pts	601 pts

4.6.2 TIEMPO INVERTIDO POR EL PERSONAL

Se ha calculado el tiempo invertido por el personal en la realización de las técnicas.

MÉTODO	PROCEDIMIENTO		TOTAL (tiempo)
Biotipado	inoculación	10 min	15 min
	lectura	5 min	
Plásmidos	extracción	45 min	1 h 30 min
	electroforesis		
	preparar gel	30 min	
	cargar gel	8 min	
	lectura y foto	7 min	
ER de ADN cromosómico	extracción	1 h 30 min	2 h 30 min
	digestión	15 min	
	electroforesis	45 min	
RCP-IA	extracción	1 h 30 min	2 h 45 min
	amplificación	30 min	
	electroforesis	45 min	
ER- <i>ureB</i>	extracción	1 h 30 min	3 h
	amplificación	30 min	
	digestión	15 min	
	electroforesis	45 min	

4.6.3 TIEMPO NECESARIO PARA OBTENER EL RESULTADO

Se ha calculado el tiempo necesario para obtener el resultado final, considerando tanto el tiempo necesario para la realización de la técnica, como los tiempos de espera de incubaciones, electroforesis o amplificaciones.

MÉTODO	TIEMPO TÉCNICA	TIEMPOS ESPERA		TOTAL (tiempo)
Biotipado	15 min	incubación	4 h	4 h 15 min
Plásmidos	1 h 30 min	extracción	30 min	4 h
		electroforesis	2 h	
ER de ADN cromosómico	2 h 30 min	extracción	1 h	23 h 30 min
		digestión	4 h	
		electroforesis	16 h	
RCP-IA	2 h 45 min	extracción	1 h	9 h 45 min
		amplificación	4 h	
		electroforesis	2 h	
ER- <i>ureB</i>	3 h	extracción	1 h	14 h
		amplificación	4 h	
		digestión	4 h	
		electroforesis	2 h	

4.6.4 RESULTADOS FINALES

Hemos dado una puntuación del 1 al 5 en cuanto a presupuesto, tiempo necesario para la realización de la técnica y tiempo necesario para obtener el resultado final. La puntuación más alta fue para el método más barato, más rápido y en la que el personal invierte menos tiempo.

Método	Precio	Tiempo de trabajo	Tiempo en obtener resultados	Puntos
Biotipado	1	5	4	10
Plásmidos	5	4	5	14
ER en ADN cromosómico	3	3	1	7
RCP-IA	4	2	3	9
ER- <i>ureB</i>	2	1	2	5

5. DISCUSIÓN

5.1 DIAGNÓSTICO

5.1.1 ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA RCP

Existen numerosos trabajos publicados que utilizan la RCP como método de detección de *H. pylori* (Fabre 1994), debido a que es un microorganismo delicado y a que son lentos los métodos de diagnóstico utilizados habitualmente. Cada autor utiliza un protocolo diferente, con los iniciadores diseñados en su grupo de trabajo, y lo recomiendan como muy bueno (Mapstone 1991, Ho 1991, Valentine 1991, Clayton 1991 c, Clayton 1992, Engstrand 1992, Hammar 1992, Bickley 1993, Peek 1995). Sin embargo, existen muy pocos trabajos que comparen los métodos propuestos por diferentes investigadores. Este es un primer problema a la hora de intentar elegir qué protocolo de RCP queremos utilizar para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

En este estudio, después de realizar una amplia búsqueda bibliográfica sobre los protocolos existentes hasta el momento de iniciar el proyecto, elegimos 3 tipos de iniciadores, basados preferentemente en la calidad científica de los grupos de investigación que los proponían, pero siendo conscientes de que la elección podría no ser la más adecuada. El protocolo basado en el gen *ureA*, se eligió también porque existía algún grupo más de investigadores que había utilizado este protocolo propuesto por Clayton (Wang 1993, Van Zweet 1994).

Además, es necesario elegir la casa comercial de la que vamos a obtener los reactivos, que deben ser siempre de buena calidad y que pueden modificar los resultados finales, especialmente en cuanto a la sensibilidad de la técnica.

Otro problema que debemos tener en cuenta, es el método de diagnóstico con el que comparamos los resultados obtenidos. Los que utilizan en los diferentes trabajos publicados son muy diversos. La mayoría de los autores comparan los resultados con cultivo y/o histología (Westblom 1993 b, Lage 1995), otros con serología (Peek 1995), algunos con la prueba del aliento con urea (El- Zaatari 1995) o con la prueba de la ureasa rápida (Fabre 1994), dependiendo de los métodos que estén utilizando en ese momento en su centro de trabajo. En este estudio, hemos comparado los resultados con cultivo e histología.

5.1.2 SENSIBILIDAD DE LA RCP

Una vez elegidos y diseñados los protocolos de RCP que íbamos a utilizar, comprobamos que 25 aislamientos de *H. pylori* eran positivos por esta técnica y determinamos la concentración de ADN con la que se podía diagnosticar la presencia de cada gen.

La RCP fue capaz de detectar hasta 12 pg de ADN con *ureA*, 50 pg con *ureB* y 25 pg con *ARNr*. La sensibilidad de la técnica era diferente en cada cepa estudiada. Hay trabajos descritos que son capaces de detectar cantidades de ADN menores que en nuestro estudio, pero en general necesitan modificar la metodología de RCP para hacerla más sensible. Lage y col. detectan hasta 3,6 fg de ADN de *H. pylori*, utilizando una RCP con iniciadores frente al gen *ureC*, que amplifica un fragmento de tamaño pequeño (294 pb) (Lage 1995). Mapstone y col. detectan hasta 10 fg, pero utilizando una RCP anidada, ya que la RCP en un sólo paso no era lo suficientemente sensible (Mapstone 1993 a). Ho y col. detectan hasta 10 pg en una RCP de 30 ciclos, y son

capaces de aumentar la sensibilidad a 0.1 pg si aumentan a 40 ciclos y a 0.01 pg, utilizando también una RCP anidada (Ho 1991). En la mayoría de los trabajos publicados, se estudia la sensibilidad de la técnica utilizando el ADN de un aislamiento de *H. pylori*. En este trabajo, el nivel de detección varía de forma considerable dependiendo del aislamiento, por lo que no nos parece recomendable sacar conclusiones con los resultados obtenidos en un único aislamiento.

El bajo nivel de sensibilidad de la técnica, en la detección del ADN de los aislamientos de *H. pylori*, podría explicarse por varias razones: la calidad del ADN obtenido, la marca comercial de la Taq polimerasa utilizada o, incluso, la marca del bloque térmico en el que se realiza la amplificación. En un trabajo publicado por Romero López y col. comparan diferentes iniciadores en la técnica de la RCP (*ureA*, *ureA+B* y *ureC*) y dos protocolos de extracción del ADN (ebullición de la muestra que libera el ADN y un protocolo más elaborado para obtener ADN purificado). Llegan a la conclusión de que la sensibilidad del ensayo depende del tamaño del fragmento amplificado, siendo más sensible cuanto más pequeño sea el fragmento, y de que el método de ebullición puede dar lugar a resultados negativos, aunque el ADN se encuentre en la muestra (Romero López 1993). La necesidad de realizar un método de extracción de ADN, que no sea simplemente el de ebullición, sino que permita obtener un ADN aceptable en cuanto a calidad y cantidad, ha sido recomendado también por otros autores (Wang 1993). En nuestro estudio hemos utilizado un protocolo de extracción con el que obtenemos un ADN de muy buena calidad y cantidad. Sin embargo, el tamaño del fragmento amplificado es de 411 pb, usando iniciadores para el gen *ureA*, de 500 pb para el gen *ARNr* y de 933 pb para el gen *ureB*. Estos tamaños

pueden ser excesivamente grandes. La sensibilidad obtenida por otros autores, que han amplificado el fragmento de 411 pb, no es excesivamente buena (Wang 1993, Van Zweet 1994).

Por otra parte, cuando hemos realizado la técnica de la RCP a partir de biopsias, aparece un porcentaje relativamente alto de muestras que, siendo negativas por los métodos de diagnóstico habituales (histología y cultivo), son positivas para *H. pylori*.

5.1.3 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS

Al comparar los resultados obtenidos a partir de muestras de biopsia gástrica, por los tres métodos de diagnóstico utilizados: cultivo, histología y la técnica de RCP, se observó que la RCP fue la que detectó mayor número de biopsias positivas.

5.1.3.1 RCP POSITIVA Y MÉTODOS DE REFERENCIA NEGATIVOS

La RCP fue positiva en 9 pacientes, mientras que los métodos de diagnóstico habituales resultaron negativos. Esto podría explicarse por una mayor sensibilidad de la técnica o por la posible contaminación de las biopsias durante la endoscopia (Roosendaal 1994) o durante el trabajo del laboratorio (Wright 1990), que daría lugar a resultados falsos positivos. En todos los ensayos de RCP se incluyó un control negativo, para confirmar que no se producían contaminaciones cruzadas en la reacción.

Al estudiar de manera detallada los resultados de esos 9 pacientes, se observó que en dos de ellos disponíamos de la información completa, mientras que en los 7 restantes carecíamos de los datos de la histología o el cultivo estaba contaminado. Si dispusiéramos del diagnóstico por los dos métodos, el resultado podría verse

modificado. Además, 3 de los aislamientos eran de muestras de biopsias obtenidas después de 1 mes de tratamiento, y puede indicar que la bacteria ha sido erradicada del estómago, de manera que no se detecta por cultivo ni histología, pero podrían quedar restos de formas cocoides o de ADN que la RCP sí sería capaz de detectar.

5.1.3.2 RCP NEGATIVO Y MÉTODOS DE REFERENCIA POSITIVOS

En 6 pacientes la RCP fue negativa, mientras que la histología fue positiva y en uno de ellos el cultivo también fue positivo. Este hecho podría explicarse de diferentes formas:

a) un mal estado de la biopsia utilizada para RCP. Sin embargo, la RCP que detecta el gen de la β -globina humana fue positiva, indicando que el protocolo de extracción fue adecuado y el ADN se encontraba en buen estado.

b) la utilización de muestras de biopsia gástrica diferentes para el estudio histológico y el microbiológico. Se ha descrito anteriormente que *H. pylori* se puede distribuir en forma de parches en el antro gástrico (Bayerdorffer 1989) y en algunas zonas de las biopsia puede no encontrarse el microorganismo. Debido a la posibilidad de que ocurra esto, se recomienda el estudio de más de una biopsia para el cultivo, especialmente en adultos (Glupzcynski 1995 b); sin embargo en niños este hecho parece ser menos importante y una sola biopsia podría ser suficiente (Gormally 1993).

c) la presencia de resultados falsos positivos por histología, debido a que es una técnica subjetiva y es necesario tener experiencia en la interpretación de las imágenes microscópicas.

d) la posibilidad de que algún aislamiento de *H. pylori* presente una secuencia

ligeramente diferente del gen *ureA*. Esta posibilidad no ha sido descrita hasta el momento por ningún autor, aunque sí se ha publicado que el microorganismo puede producir menor cantidad de ureasa cuando se encuentra "in vivo" que "in vitro" (Peek 1995).

Otros autores han descrito también la posibilidad de que una muestra de biopsia sea positiva por cultivo e histología, y sin embargo, la RCP sea negativa, aunque se repetía el experimento al menos dos veces (Westblom 1993 b).

5.1.3.3 SENSIBILIDAD DEL CULTIVO

La mayoría de los trabajos publicados, presentan la RCP como un método directo y más sensible que los métodos de diagnóstico habituales (cultivo/histología). Sin embargo, existe al menos un trabajo en el que se indica que la RCP es tan sensible como el cultivo para el seguimiento del tratamiento (Van Zweet 1993).

En este estudio, el 31.5% de las biopsias fueron positivas utilizando el método de cultivo, mientras que un 58.1% lo fueron por histología y un 59.6% por RCP. El bajo porcentaje de cultivos positivos puede explicarse por varias razones:

a) las muestras se obtienen en el Servicio de Digestivo del Hospital del Niño Jesús y se envían lo más rápidamente posible al Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa, donde se procesan para su cultivo. Normalmente los porcentajes de aislamiento son más elevados, y en determinados casos incluso más fiables, que los resultados de la histología, que puede identificar falsos positivos.

b) la contaminación de la solución salina, en la que se transportaban las muestras, con *P. aeruginosa*.

c) la falta de medio selectivo durante una parte del estudio.

Diversos autores indican que el cultivo, realizado en las condiciones óptimas, especialmente en cuanto a la rapidez en la siembra de la muestra, puede llegar a ser tan sensible como la realización de una técnica de RCP, que es más compleja y probablemente más cara. En los casos en los que el cultivo no se puede sembrar rápidamente, estaría indicada la realización de esta técnica (Van Zweet 1993).

En un trabajo publicado recientemente, se observa que la técnica que detectó el porcentaje más alto de muestras positivas fue la RCP (38.5%), seguida del cultivo (36.5%), prueba de ureasa rápida (34.6%), y por último, la tinción histológica (33.7%) (Lage 1995). Fabre y col. publican un trabajo en el que encuentran un 53% de muestras positivas por RCP, seguido de un 50% de positivos por histología, un 48% por cultivo y un 43% por prueba de ureasa rápida (Fabre 1994).

Parece que la tecnología de la RCP puede tener un gran interés utilizándola en muestras obtenidas de forma no invasiva (saliva, placa dental y/o heces), en las obtenidas a partir de animales domésticos, así como en muestras de agua, tanto fecales como de bebida, en las que no son fácilmente aplicables las técnicas de cultivo habituales. La utilización de la metodología molecular nos ayudará a obtener mejores conocimientos sobre la epidemiología, la transmisión y los posibles reservorios de la infección producida por *H. pylori*.

5.2 CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

5.2.1 SENSIBILIDAD

Los datos de sensibilidad obtenidos en este estudio, concuerdan con los observados en un mayor número de aislamientos, estudiados recientemente en nuestro Departamento (Alarcón 1995).

Se confirma la buena actividad "in vitro" de amoxicilina, para la que no se ha encontrado ninguna cepa resistente en el mundo hasta el momento.

Hemos encontrado un 20.7 % de resistencia a metronidazol, resultado similar a los obtenidos por otros autores. Sin embargo, este porcentaje ha aumentado con respecto a los datos de nuestro hospital en 1991 (López-Brea 1991). La tasa de resistencia publicada en diferentes países es muy variable, dependiendo además de la población estudiada (European Study Group 1992).

El porcentaje de resistencia a claritromicina es del 3.8% y, aunque todavía es muy bajo, es necesario llamar la atención sobre la aparición de cepas resistentes a este nuevo macrólido, puesto que hasta hace poco tiempo no se habían descrito en aislamientos españoles (López-Brea 1993 c). Otros autores observan un aumento de la resistencia a claritromicina en países europeos en los últimos años (Cayla 1993, Glupzcynski 1995 a), quizá debido al uso abusivo de nuevos macrólidos para un gran número de infecciones, especialmente en niños.

5.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Todos los aislamientos produjeron oxidasa, catalasa y ureasa en el momento de su aislamiento en el laboratorio. Se ha descrito la existencia de cepas catalasa negativas en el laboratorio, debido probablemente a la pérdida de esta enzima después de largos períodos de conservación (López-Brea 1993 b). Se ha descrito también la existencia de cepas ureasa negativas (Cover 1991), aunque son extremadamente raras.

En cuanto a la presencia de diferentes enzimas preformadas, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y naftol fosfohidrolasa, estuvieron presentes en todos los aislamientos estudiados, por lo que podrían ser utilizadas como pruebas bioquímicas de diagnóstico, especialmente ante la posibilidad de encontrar algún aislamiento que pudiera ser catalasa o incluso ureasa negativas. Fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina han sido anteriormente descritas en todos los aislamientos de *H. pylori*. La presencia de naftol fosfohidrolasa puede depender del aislamiento estudiado y se ha descrito en un porcentaje alto de los aislamientos (Goodwin 1990). En nuestro caso, en todos los aislamientos encontramos naftol fosfohidrolasa. La presencia de esterasa lipasa y leucina arilamidasa se encontró en un 37.9% y en un 72.4%, respectivamente.

5.2.3 CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA

Entre los parámetros que se han considerado relacionados con virulencia, hemos estudiado la presencia o no de movilidad, de citotoxina y de una proteína de 128 kDa, codificada por el gen *cagA*. En diferentes trabajos publicados se indica que los aislamientos más móviles, citotóxicos y que presentan la proteína CagA, parecen estar implicados en procesos clínicos más graves (Figura 1989, Cover 1990, Eaton 1992, Covacci 1993, Crabtree 1993), aunque se necesitan todavía muchos estudios que permitan sacar conclusiones.

En nuestro caso, un 87.4% de los aislamientos estudiados eran móviles o muy móviles lo que indica la presencia de microorganismos probablemente más patógenos. En un estudio reciente, el 57.8% (22 de 38 aislamientos) eran no móviles (Owen 1991 a); sin embargo, los aislamientos de *H. pylori* se describieron en un principio como móviles (Goodwin 1989). En este trabajo no se encontró relación entre las cepas más móviles y la presencia de citotoxina o del gen *cagA* detectado mediante RCP. Sin embargo, la metodología de detección de este parámetro, aunque recomendado por otros autores, es bastante subjetiva y sería conveniente utilizar, además, otro tipo de método.

La detección del efecto vacuolizante se ha podido determinar en un número pequeño de aislamientos, por lo que es difícil sacar conclusiones. El 35.7% de los aislamientos producían efecto vacuolizante, un porcentaje más bajo que el 47.2% detectado por otros autores (Owen 1991 a). Sin embargo, nuestro estudio se ha realizado en aislamientos clínicos procedentes de niños, mientras que la mayoría de los

estudios publicados son en aislamientos de adultos y de pacientes con úlcera (Figura 1989, Cover 1990). El porcentaje de niños con úlcera es muy bajo, por lo que si la citotoxicidad está relacionada con la úlcera, se espera que exista un porcentaje más bajo de cepas citotoxina positivas en niños.

El 40% de los aislamientos presentan el gen *cagA* detectado por RCP. No se conoce la función biológica de la proteína CagA, pero parece más frecuente en enfermos con úlcera duodenal y con cáncer gástrico que en pacientes con gastritis (Covacci 1993, Crabtree 1993). Este gen se encuentra en el 91.7% de los que padecen úlcera duodenal y en el 73% de los afectados por gastritis (Lage 1995). Existen muy pocos datos en cuanto a la presencia de este gen en niños. Doermann y col. lo detectan en un 47.5% de aislamientos procedentes de niños (Doermann 1995), porcentaje ligeramente más alto que el encontrado en nuestros aislamientos. En este caso, como en el del efecto vacuolizante, se puede esperar un menor número de aislamientos *cagA* + que en adultos, porque la úlcera y/o el cáncer no es frecuente en niños.

La proteína CagA se ha considerado como una proteína necesaria para la producción de citotoxina; sin embargo, recientemente se ha visto que estos dos parámetros no se encuentran siempre asociados y que la proteína CagA no es necesaria para la expresión de la citotoxina (Schmitt 1994, Tummuru 1994). En nuestro estudio, solamente en 8 aislamientos se pudieron determinar los dos parámetros. En 4 de ellos los resultados fueron positivos o negativos, pero iguales por los dos métodos. Tres aislamientos presentaban el gen *cagA* con efecto vacuolizante negativo y uno no presentaba el gen y, sin embargo, producía efecto vacuolizante. Estos datos concuerdan con los de trabajos publicados recientemente, que indican la presencia de diferentes

tipos entre los aislamientos de *H. pylori*, basados en el sub-tipo de *vacA cagA*. Los aislamientos de *H. pylori* se pueden clasificar en el tipo I (65% *vacA+* *cagA+*), tipo II (19% *vacA-* *cagA-*) y el resto de los aislamientos (16%) presentan un fenotipo relacionado con el tipo I que expresan el gen *cagA* o el *vacA*, pero no los dos (Telford 1994 a, Xiang 1995). Este 16% corresponde a aislamientos que pueden producir el efecto vacuolizante "in vitro" pero no tienen la proteína CagA, o que presentan la proteína CagA sin producir el efecto vacuolizante (Xiang 1995). En nuestro caso, una cepa pertenecería al tipo I, tres cepas al tipo II y cuatro cepas se encontrarían en el fenotipo relacionado con el I, que expresan el gen *cagA* o el *vacA* pero no los 2. Sin embargo, es necesario realizar estudios con mayor número de aislamientos que permitan confirmar estos resultados preliminares.

El determinar los aislamientos clínicos de *H. pylori* que pueden estar implicados en la úlcera o, incluso, en el cáncer gástrico, puede tener un importante impacto en la decisión terapéutica. Las pautas de tratamiento que se utilizan en la erradicación del microorganismo son muchas veces complejas, con múltiples dosis, un moderado nivel de efectos secundarios y frecuentemente no se completa el tratamiento por parte del paciente. La identificación de los pacientes que están infectados por aislamientos que pueden dar lugar a cuadros más graves, permitirá a los clínicos insistir más en la terapia erradicadora.

5.3 TIPADO FENOTÍPICO

Las diferentes características de *H. pylori* se han intentado utilizar como posible método de tipado de este microorganismo. Se intentó realizar un esquema de tipado en cuanto a antibiotipo y biotipo.

El antibiotipo sólo clasificaba los microorganismos en 3 grupos, siendo uno de ellos muy poco frecuente, por lo que no parece útil como método de tipado. Además, los aislamientos de un mismo paciente obtenidos a lo largo del tratamiento, en nuestro caso con metronidazol, amoxicilina y sales de bismuto, pueden modificar la sensibilidad a metronidazol sin detectarse ningún otro cambio fenotípico ni genotípico. El que la mayoría de los aislamientos de *H. pylori* presenten patrones de sensibilidad a antibióticos muy similares, ha sido descrito también por otros autores (Morgan 1987 b).

La utilización del biotipado se consideró al principio como un método válido para diferenciar entre aislamientos de *H. pylori*; sin embargo, actualmente no parece recomendable. En los aislamientos incluidos en este estudio hemos encontrado 3 biotipos. El más frecuente fue el biotipo II, que produce leucina arilamidasa y naftol fosfohidrolasa pero no esterasa (en 41.3% de los aislamientos). Estos resultados coinciden con los de otros autores (Owen 1991 a), en los que el biotipo II era también el más frecuente (87% de los aislamientos). Este método no resultó suficientemente válido, porque, al considerar aislamientos del mismo paciente, los resultados no eran concordantes con los métodos moleculares.

5.4 TIPADO GENOTÍPICO

En la infección por *H. pylori* se han aplicado numerosos métodos genotípicos con diferentes objetivos:

a) analizar aislamientos obtenidos a partir del mismo paciente a lo largo del tratamiento (Akopyanz 1992, Moore 1993, Fujimoto 1994, Rautelin 1994, Owen 1994), para intentar diferenciar entre re-infecciones y recaídas,

b) estudiar aislamientos de la misma biopsia pero con diferentes morfologías (Langenberg 1986),

c) estudiar aislamientos de biopsias de diferentes zonas del estómago durante la misma endoscopia (Owen 1993),

d) comparar aislamientos obtenidos a partir de miembros de la misma familia (Tee 1992, Nwokolo 1992, Bamford 1993), o

e) intentar agrupar por homologías los aislamientos que proceden de pacientes con diferente patología digestiva y pacientes asintomáticos (Desai 1994).

No existe un esquema de tipado bien definido para *H. pylori*. Los métodos fenotípicos utilizados no han demostrado utilidad. Los métodos genotípicos parecen los más adecuados, aunque existen numerosas posibilidades (estudio de plásmidos, patrón de restricción del ADN cromosómico, hibridación con sondas universales o específicas, electroforesis en campos pulsados, métodos de RCP, etc) y cada autor puede tener sus preferencias.

5.4.1 PLÁSMIDOS

En un 26.4% de los aislamientos estudiados, se observaban 1 ó 2 plásmidos de peso molecular comprendido entre 7.9 y 1 MDa.

Diversos autores han publicado la presencia de plásmidos en aislamientos clínicos de *H. pylori* procedentes de pacientes adultos, con porcentajes que varían entre el 35 y el 50%. En nuestro estudio el porcentaje es más bajo, quizá porque son aislamientos procedentes de niños (los datos publicados se basan en aislamientos de adultos) o por la posibilidad de que los aislamientos puedan perder los plásmidos debido a su conservación en el laboratorio.

En cuanto al tamaño que presentan los plásmidos encontrados en este estudio, concuerdan con otros autores que detectan plásmidos menores de 8 MDa (Simor 1990 b), menores de 5.9 MDa (Majewski 1988), menores de 7.9 MDa (Clayton 1991 a) o menores de 10 Kpb (Owen 1991 a). En muy pocos casos se publica la presencia de plásmidos de peso molecular de gran tamaño (96 MDa) (Penfold 1988) o de 63 Kpb (Stanley 1992). En nuestro estudio, el número de plásmidos encontrados en los aislamientos de *H. pylori* ha sido 1 ó 2. La mayoría de los autores encuentra también este número, pero existe un trabajo en el que detectan hasta 4 plásmidos en algún aislamiento (Xiang 1995).

Es importante tener en cuenta que cuando los aislamientos presentan plásmidos, los patrones son muy variables, mostrando cada aislamiento casi un único patrón. Esto podría ser útil como método de tipado si un mayor porcentaje de aislamientos incluyera ADN extra-cromosómico.

Se observaron diferencias, en cuanto a la presencia de plásmidos, en los aislamientos de tres pacientes. Este hecho podría explicarse por la existencia de más de un tipo de cepa en el mismo paciente o por la pérdida de plásmidos en alguno de los aislamientos; por lo tanto, el patrón plasmídico no es válido para diferenciar entre aislamientos de *H. pylori*, usado como único método de tipado.

5.4.2 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El método de digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción ha sido ampliamente utilizado para éste y otros microorganismos. Presenta como inconveniente la gran cantidad de bandas que se pueden observar, por lo que es difícil realizar una comparación de resultados de forma visual. Debido a esto, se han utilizado métodos informatizados para comparar los resultados (Owen 1989 c) o métodos de hibridación, que permiten disminuir el número de bandas y facilitan la lectura; sin embargo, estos métodos de hibridación aumentan de forma considerable el gasto, no solamente económico sino también de tiempo de realización de la técnica. La utilización de métodos no manuales para comparar patrones puede ser útil, pero es necesario disponer de los medios que, en muchos casos, no está al alcance de los Laboratorios de Microbiología Clínica. También se han utilizado métodos de digestión con endonucleasas, que cortan el ADN en pocos puntos y los fragmentos obtenidos se separan posteriormente por electroforesis en campos pulsados, pero puede ser difícil disponer del equipo para la realización de esta técnica.

En nuestra experiencia, el método de digestión con enzimas normales ha sido útil para comparar pocos aislamientos de *H. pylori*. Además es un método barato, no muy difícil de realizar técnicamente y para ponerlo en práctica es suficiente con los aparatos mínimos de un Laboratorio de Biología Molecular. En nuestro estudio elegimos dos enzimas de restricción ampliamente utilizadas (*HindIII* y *HaeIII*). Probablemente las más recomendadas para estudiar el ADN de este microorganismo (Simor 1990, Oudbier 1990, Owen 1991 a, Costas 1991, Rautelín 1994).

Este método podría no ser útil para comparar un gran número de aislamientos de *H. pylori* (más de 9 ó de los que se puedan incluir en un mismo gel de electroforesis). En general, para diferenciar entre re-infecciones o recaídas, es suficiente comparar los aislamientos del mismo paciente, que suelen ser dos o tres aislamientos, y en cualquier caso un número pequeño de ellos.

En nuestro trabajo, todos los aislamientos, menos uno, se digirieron bien con los dos enzimas probados. En cuanto a relación coste/beneficio de este método, podría recomendarse, en primer lugar, el uso de *HindIII* por su menor precio, y si el ADN no se digiere, repetir el experimento con *HaeIII*.

Los patrones fueron fácilmente comparables en el mismo gel. En el estudio de aislamientos no relacionados entre ellos, los patrones parecen diferentes de unos a otros, lo que indica una gran diversidad genómica.

5.4.3 RCP-IA

Este método puede ser recomendado por rápido, además de ser técnicamente fácil de realizar y barato. Todos los aislamientos fueron tipables por este método, produciendo patrones de bandas claras y en un número suficientemente pequeño, de manera que se podían comparar visualmente.

En algunos trabajos realizados con este o con otros microorganismos, se indica la posibilidad de que no sea un método completamente reproducible, por ser un proceso de amplificación arbitrario.

Es importante utilizar siempre las mismas condiciones de la reacción, los mismos reactivos, el mismo bloque térmico y la misma concentración de ADN, que debe ser de buena calidad.

Este método está siendo recomendado por muchos autores por su rapidez y por su gran utilidad práctica, pues se puede realizar en cualquier laboratorio que disponga de un bloque térmico (Akopyanz 1992 b). El ADN se puede obtener por ebullición, en lugar de usar un método complejo de purificación como el del CTAB, de forma que el método es todavía más rápido y barato. Este ADN no es de buena calidad y los resultados pueden verse modificados, teniendo en cuenta que la reacción que se produce es arbitraria. Sin embargo, en manos de personas con experiencia este método puede ser tan válido como el del CTAB (Owen 1990 a, Owen 1991 b, Kansau I, comunicación personal).

5.4.4 ER-*ureB*

Este método de tipado puede aplicarse en aislamientos puros del microorganismo, pero también podría tener utilidad en muestras de biopsia gástrica o en muestras obtenidas de forma no invasiva (Akopyanz 1992 a). En un primer paso, se podría realizar la amplificación del fragmento adecuado y posteriormente, digerirlo con enzimas de restricción para diferenciar aislamientos. Los iniciadores utilizados en este estudio se eligieron por haber sido recomendados por otros autores (Clayton 1993) y disponer de ellos en nuestro laboratorio.

El problema encontrado usando este método de tipado es el gran número de aislamientos en los que el fragmento amplificado no se digiere con el enzima probado. Este problema podría solventarse de diferentes formas:

a) Amplificación de un fragmento de mayor tamaño. Los trabajos publicados amplifican fragmentos de gran tamaño, como 1.5 Kb a 2.5 Kb del gen *ureA-B*, *ureC-D* o *flaA* (Akopyanz 1992 a), un fragmento de 2.4 Kb del gen *ureA-B* (Foxall 1992, Romero López 1993), o un fragmento de 1.1 Kb del gen *ureC* (Moore 1993).

b) Utilización de otros enzimas de restricción que tienen mayor probabilidad de cortar dentro del fragmento amplificado. En el estudio de Clayton utilizan *Sau3A* o incluso dos enzimas de manera simultánea (*HaeIII* + *AluI*), obteniendo buenos resultados (Clayton 1993).

Este método es técnicamente sencillo, tiene la ventaja de no encontrarse sometido a la arbitrariedad de la RCP-IA y los patrones que se obtienen son mucho más fáciles de comparar que los obtenidos de digestiones de ADN completo. Está siendo recomendado como muy útil por diferentes autores (Foxall 1992, Akopyanz 1992 a, Moore 1993, Fujimoto 1994, Owen 1994, Hurtado 1994 c), aunque se ha descrito la posibilidad de encontrar aislamientos no relacionados entre ellos que, sin embargo, presentan el mismo patrón (Foxall 1992, Romero López 1993, Moore 1993). En nuestro estudio el patrón UB1 se encontró en aislamientos de 4 pacientes no relacionados.

5.5 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE TIPADO

En este trabajo se han intentado comparar diferentes métodos, que pueden ser realizados en los Laboratorios de Microbiología Clínica sin grandes equipos o importantes medios económicos. Se requiere, como material inventariable, un bloque térmico para la RCP, una cubeta y una fuente de electroforesis, una centrífuga para tubos pequeños de uso en biología molecular, un transiluminador de luz ultravioleta y una cámara fotográfica. Este equipo se encuentra cada vez con mayor frecuencia en los Laboratorios Clínicos o es relativamente posible compartirlo con otros departamentos dentro del mismo centro.

Para determinar la utilidad de los métodos de tipado incluidos en este estudio, los hemos comparado en cuanto a su tipabilidad, la reproducibilidad y el poder discriminatorio. La definición de reproducibilidad que hemos utilizado no es quizá la más correcta, pero ha sido válida para el estudio de nuestros pacientes.

Los métodos fenotípicos utilizados (antibiotipo y biotipo), aunque se encuentran disponibles en cualquier Laboratorio Clínico y son capaces de tipar el 100% de los microorganismos probados, presentaron un bajo poder discriminatorio (0.28 y 0.66 para antibiotipo y biotipo respectivamente). La detección de plásmidos no mostró buenos resultados en cuanto a tipabilidad ni poder discriminatorio.

Los métodos moleculares basados en el estudio del ADN completo presentaron muy buena reproducibilidad (100%). RCP-IA mostró los valores más altos de tipabilidad (100%) y poder discriminatorio ($ID = 1$) de manera simultánea. ER, aunque

presentó un ID = 1, mostró una tipabilidad de 96.3%. El que presentó peor ID y tipabilidad fue ER del fragmento *ureB*; sin embargo, esta técnica podría verse mejorada por la utilización de iniciadores que amplifiquen un fragmento más grande.

Se observó que todos los métodos moleculares eran concordantes a la hora de definir como iguales o diferentes los aislamientos relacionados (del mismo paciente o de familiares).

Se pudieron estudiar dos o más aislamientos del mismo paciente obtenidos a lo largo del tratamiento (en 7 pacientes): En dos de ellos el primero era diferente de los demás y en los 5 restantes, los aislamientos eran iguales.

Diferentes autores han estudiado aislamientos de *H. pylori* obtenidos a partir del mismo paciente antes y después del tratamiento. El número de pacientes estudiados suele ser pequeño, pero en la mayoría se observa un recaída con la misma cepa (se observan patrones similares) (Akopyanz 1992, Moore 1993, Clayton 1993). Algunos de los resultados publicados son: 10 pacientes con patrones iguales cuando estudian aislamientos de 11 pacientes (Rautelin 1994), 14 pacientes con patrones iguales de 15 estudiados (Tee 1992), 8 pacientes con patrones iguales cuando estudian múltiples aislamientos de 9 pacientes (Owen 1994) ó 5 pacientes con patrones idénticos entre los 8 pacientes estudiados (Fujimoto 1994). Estos trabajos sugieren que pudieran tratarse de recaídas, debido a la no curación, o que puedan ser re-infecciones con la misma cepa porque se contaminen a partir de la misma fuente de contagio (Clayton 1993).

Al estudiar los aislamientos con diferencias en cuanto a la morfología o la sensibilidad a metronidazol observamos que, aunque fueron fenotípicamente diferentes, genotípicamente mostraban los mismos patrones. Otros autores ya habían descrito la

posibilidad de encontrar variabilidad, en cuanto a la apariencia de las colonias, dentro del mismo cultivo (Langenberg 1986) y en un estudio, en el que se utiliza la ribotipia para diferenciar entre morfologías, se observa que no existen diferencias en cuanto al patrón de tipado (Tee 1992).

Pudimos estudiar dos aislamientos obtenidos a partir de dos hermanos y, en este caso, los métodos fenotípicos y moleculares (con la excepción del patrón plasmídico) coinciden en definirlos como diferentes. En los pocos trabajos publicados sobre aislamientos de diferentes miembros de la misma familia, no se encuentran resultados claramente concluyentes. Nwokolo y col. estudian 6 miembros de la misma familia y encuentran en tres miembros cepas relacionadas entre ellas, mientras que los otros 3 son aislamientos independientes (Nwokolo 1992). Bamford y col. estudian 4 familias infectadas y detectan la misma cepa en, al menos, dos miembros en 3 de las 4 familias estudiadas (Bamford 1993). Tee y col. estudian un total de 7 familias y encuentran patrones idénticos en los miembros de dos de ellas, mientras que en las demás los aislamientos era diferentes (Tee 1992).

En los trabajos publicados, en los que se estudian aislamientos recogidos de diferentes zonas del estómago, observan que eran idénticos en todos los pacientes estudiados (Tee 1992), en 83.3% de los estudiados (Fujimoto 1994), o en 2 pacientes de 13 estudiados (Owen 1993).

5.6 VALORACIÓN COSTE/BENEFICIO

En los últimos años se acrecienta la necesidad de reducir gastos, en muchos de los centros públicos de diagnóstico e investigación. Aunque los criterios económicos no deberían retrasar los avances científicos, sí que es necesario conocer los gastos que conlleva la realización de las diferentes técnicas, para utilizar la más adecuada si con ello se obtiene el mismo beneficio científico. Por este motivo, realizamos un estudio coste/beneficio de los métodos de tipado empleados.

Hemos puntuado de mayor a menor los métodos, en cuanto a precio/muestra (5 el más barato y 1 el más caro), tiempo de dedicación de personal técnico (5 el que consume menos y 1 el que consume más) y tiempo necesario para obtener resultados (5 el más rápido y 1 el más lento). Considerando la suma de los puntos de cada parámetro, observamos que la puntuación más alta es para el análisis de plásmidos, seguido del biotipado, el patrón de RCP-IA, las enzimas de restricción del ADN cromosómico y, por último, las enzimas de restricción del fragmento amplificado. Sin embargo, el estudio de plásmidos y el biotipo no han sido eficaces en cuanto a tipabilidad, reproducibilidad o poder discriminatorio. Teniendo en cuenta este estudio, nosotros recomendamos, por su relación calidad/precio el método de RCP-IA, seguido de ER. Existe un trabajo publicado por Swaminathan y col. en el que comparan 4 métodos de tipado moleculares, en cuanto a coste de material y tiempo de trabajo, y concluyen que el más barato es ER-RCP, seguido de ER del ADN genómico, PFGE y por último ribotipia (Swaminathan 1993).

6. CONCLUSIONES

- 1.- La utilización de una técnica de RCP con iniciadores específicos del gen *ureA*, para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, mostró mejores resultados, en cuanto a la detección del nivel más bajo de ADN, que los iniciadores dirigidos frente al gen *ureB* o *ARNr*.
- 2.- La técnica de RCP realizada a partir de muestras de biopsia gástrica, como método de diagnóstico, detectó un 59.6% de resultados positivos, aunque la presencia de posibles resultados falsos positivos o falsos negativos la convierten en metodología que debe mejorarse.
- 3.- Los resultados de la actividad "in vitro" de los antibióticos probados indican ausencia de resistencia a amoxicilina, un 3.8% de resistencia a claritromicina y un 20.7% de resistencia a metronidazol.
- 4.- El 100% de los aislamientos presentó ureasa, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y naftol fosfohidrolasa. El 37.9% produjo esterasa lipasa y el 72.4% leucina arilamidasa.
- 5.- Un alto porcentaje de los aislamientos (87.4%) presentó movilidad moderada o alta, parámetro que se ha considerado presente en las cepas más patógenas.

-
- 6.- Se detectó, en un 35.7% de los aislamientos, un efecto vacuolizante en cultivos celulares y, en un 40%, el gen *cagA*.
 - 7.- Los métodos fenotípicos empleados como tipado (antibiotipo y biotipo) no parecen ser útiles para diferenciar entre aislamientos clínicos del mismo paciente a lo largo del tratamiento, ni para distinguir entre aislamientos de *H. pylori* con diferencias en la morfología o en la sensibilidad a metronidazol.
 - 8.- Entre los métodos genotípicos empleados, la detección de plásmidos no fue útil como método de tipado, presentaba una baja reproducibilidad y un bajo poder discriminatorio.
 - 9.- La digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción fue un buen método de tipado, además de presentar una buena reproducibilidad y un alto poder discriminatorio. Los patrones obtenidos a partir del mismo paciente, estudiados en el mismo gel, fueron fáciles de ser comparados visualmente.
 - 10.- La técnica de RCP-IA mostró los mejores resultados en cuanto a poder discriminatorio, tipabilidad y reproducibilidad, entre los métodos estudiados, tanto fenotípicos como genotípicos.

- 11.- La técnica de ER-*ureB* mostró una buena reproducibilidad, pero la tipabilidad fue baja y, por lo tanto, también el poder discriminatorio. Sin embargo, modificando el tipo de iniciadores o las enzimas de restricción utilizadas, puede ser un método muy útil y podría usarse directamente a partir de muestras clínicas.
- 12.- Teniendo en cuenta el parámetro coste/beneficio, el método más barato, más rápido y que consume menos gasto de tiempo técnico resultó ser el análisis de plásmidos, seguido del biotipo, la RCP-IA, la digestión con ER del ADN cromosómico y, por último, la digestión con enzimas del fragmento amplificado mediante RCP. Sin embargo, los dos primeros métodos han demostrado no ser útiles para el tipado de estos microorganismos; por lo tanto, la RCP-IA sería el método más recomendado en cuanto a su valoración coste/beneficio.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akopyanz NS, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nucleic. Acid. Research. 1992 a; 20: 6221-6225.
- 2.- Akopyanz NS, Bukanov O, Westblom TU, Kosovick S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic. Acid. Research, 1992 b; 20: 5137-5142.
- 3.- Akopyantz NS, Kersulyte D, Berg DE. *CagII*, a new multigene locus associated with virulence in *Helicobacter pylori*. Gut 1995 a; 37 (suppl 1): A1.
- 4.- Akopyantz NS, Eaton KA, Berg DE. Adaptative mutation and colonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 1995 b; 63: 116-121.
- 5.- Alarcón T. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Enf. Inf. Microb. Clin. 1994; 12 (suppl 1): 23-27.
- 6.- Alarcón T, Sánchez I, Domingo D, Martínez MJ, Sanz JC, López-Brea M. Resistance to several antibiotics in *H. pylori* Spanish clinical isolates. 35th ICAAC, San Francisco 17-20 Septiembre 1995, Abstract C135.
- 7.- Alpert LC, Graham DY, Evans DJ JR, Yoshimura HH, Hazell SL, Evans DG, Klein PD. Diagnostic possibilities for *Campylobacter pylori* infection. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1989; 1: 17.
- 8.- Andreica V, Dumitrascu D, Sasca N, Toganel E, Sucin A, Draghici A, Pascu O, Sasca C, Sucin M, Andreica M. *Helicobacter*-like organisms in gastroduodenal diseases. Gastroenterol. Clin. Biol. 1990; 14: 437.
- 9.- Anglada L, Márquez M, Sacristán A, Ortíz JA. Inhibitors of gastric acid secretion N-sulphonyl formamidines in a serie of new histamine H₂ receptor antagonists. Eur. J. Med. Chem. 1988; 23: 97-100.
- 10.- Anssorg R, Von Recklinghausen G, Pomarius R, Schmid EN. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 51.
- 11.- Armstrong JA, Wee SH, Goodwin CS, Wilson DH. Response of *Campylobacter pyloridis* to antibiotics, bismuth and an acid-reducing agent "in vitro"- an ultrastructural study. J. Med. Microbiol. 1987; 24: 343-350.
- 12.- Armstrong JA, Cooper M, Goodwin CS, Robinson J, Wee SH, Burton M, Burke V. Influence of soluble haemagglutinins on adherence of *Helicobacter pylori* to HEp-2 cells. J. Med. Microbiol. 1991; 34: 181.

- 14.- Ashorn P, Lahde PL, Ruuska T, Makiperna A. Gastric lymphoma in an 11-year boy: a case report. *Med. Pediatr. Oncol.* 1994; 22: 66-67.
- 15.- Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Blaser MJ, Cover TL. Specific *Helicobacter pylori vacA* genotypes are associated with presence of duodenal and gastric ulceration and degree of gastric inflammation. *Gut* 1995; 37 (suppl 1): A3.
- 16.- Axon AT. *Campylobacter pylori*- therapy review. *Scand. J. Gastroenterol.* 1989; 24 (suppl 160): 35-38.
- 17.- Bamford KB, Bickley J, Collins JS, Johnston BT, Potts S, Borton V, Owen RJ, Sloan JM. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut.* 1993; 34: 1348-1350.
- 18.- Barthel JS, Everett ED. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: the gold standard and the alternatives. *Rev Infect Dis.* 1990; 12 (supl 1): 107.
- 19.- Baskerville A, Newell DG. Naturally occurring chronic gastritis and *C. pylori* infection in the Rhesus monkey: a potential model for gastritis in man. *Gut* 1988 a; 29: 465-472.
- 20.- Baskerville A, Newell DG. Gastritis associated with experimental *Campylobacter pylori* infection in the Rhesus monkey: a model for human infection?. In: *Campylobacter IV, Proc. IVth Int. Workshop Campylobacter infection*, Kaijser B, Falsen E, Eds, University of Göteborg, Sweden 1988 b, 438.
- 21.- Bauer HM, Manos MM. PCR detection of genital human Papillomavirus. En: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Persing DM, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds). ASM, Washington, 1993. p.407-413.
- 22.- Bayerdörffer E, Oertel H, Lehn N, Kasper G, Mannes GA, Sauerbruch T, Stolte M. Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonization. *J. Clin. Pathol* 1989; 42: 834.
- 23.- Becc MC, Janssen AJ, Clasener HA, De Koning RW. Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990; i: 539-540.
- 24.- Beil W, Birkholz C, Wagner S, Sewing KF. Interaction of *Helicobacter pylori* and its fatty acids with parietal cells and gastric H⁺/K⁺ ATPases. *Gut* 1994; 35: 1176-1180.
- 25.- Bell GD, Weil J, Harrison G, Morden A, Jones PH, Gant PW, Trowell JE, Yoong AK, Daneshmend TK, Logan RFA: ¹⁴C-urea breath test analysis, a non-invasive test for *Campylobacter pylori* in the stomach. *Lancet* 1987; i: 1367-1368.

- 26.- Bell GD, Powell K, Burridge SM, Palleceros A, Jones PH, Gant PW, Harrison G, Trowell JE. Experience with triple anti-*H. pylori* eradication therapy: side effects and the importance of testing the pre-treatment bacterial isolate for metronidazole resistance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1992; 6: 427-435.
- 27.- Benhamou PH, Kalach N, Raymond J, Abdallah C, Dupont C. *Helicobacter pylori* gastric infections in children. *Presse Med.* 1994; 23: 461-463.
- 28.- Berkowicz J, Lee A. Person to person transmission of *C. pylori*. *Lancet* 1987; ii: 6800-681.
- 29.- Bernander S, Dalen J, Gastrin B, Hodenborg L, Lamke LO, Ohrn R. Absence of *Helicobacter pylori* in dental plaques in *Helicobacter pylori* positive dyspeptic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 282-285.
- 30.- Best LM, Veldhuyzen van Zanten SIO, Sherman PM, Bezanson GS. Serological detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children and their parents. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1193-1196.
- 31.- Biasco G, Miglioli M, Barbara L, Corinaldesi R, di Febo G. Omeprazole, *Helicobacter pylori*, gastritis and duodenal ulcer. *Lancet* 1989; ii: 1403.
- 32.- Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the PCR for detecting the urease C gen of *H. pylori* in gastric sample and dental plaque. *J. Med. Microbiol.* 1993; 39: 338-344.
- 33.- Birkholz S, Knipp U, Lemma E, Kroger A, Opferkuch W. Fumarate reductase of *Helicobacter pylori* an immunogenic protein. *J. Med. Microbiol.* 1994; 41: 56-62.
- 34.- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acid. Res.* 1979; 7: 1513-1523.
- 35.- Bizzozero G. Ueber die schlachformigen Druesen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberfachenepithels der Schleimhaut. *Arch. F. Mikr. Anat.* 1893; 42: 82-152.
- 36.- Blecker U, Lanciers S, Hauser B, Vandenplas Y. The prevalence of *Helicobacter pylori* positivity in a symptom-free population, aged 1 to 40 years. *J. Clin. Epidemiol.* 1994; 47: 1095-1098.
- 37.- Blanchard A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes: use of a UGA tryptophan codon. *Mol. Microbiol.* 1990; 4: 669.
- 38.- Blaser M. Comunicación oral en el VIII International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*, Edimburgo 1995.

- 39.- Bode G, Malfertheiner P, Nilius M, Lehnhardt G, Ditschuneit H. Ultrastructural localisation of urease in outer membrane and periplasm of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42 (7): 778-779.
- 40.- Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*: criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 1993; 111: 483-490.
- 41.- Boixeda D. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos. *Enf. Inf. Microb. Clin.* 1994; 12 (suppl 1): 41-47.
- 42.- Bölin I, Lönroth H, Svennerholm AM. Identification of *Helicobacter pylori* by immunological dot blot method based on reaction of a species-specific monoclonal antibody with a surface-exposed protein. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 381-384.
- 43.- Bronsdon MA, Schoenknoecht FD. *Campylobacter pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemestrina*. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1725-1728.
- 44.- Buck GE, Gourley WK, Lee WK, Subramanym K, Latimer JM, DiNuzzo AR. Relation of *C. pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. *J. Infect. Dis.* 1986; 153: 664-669.
- 45.- Buck GE, Smith JS. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 597-599.
- 46.- Buck G.E. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3: 1-12.
- 47.- Burnei JP, Lee W, Dent JC, McNulty CAM. Immunoblot fingerprinting of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1988; 27: 153.
- 48.- Burnett RA, Brown IL, Findlay J: Cresyl violet staining method for *Campylobacter* like organisms. *J. Clin. Pathol* 1987; 40: 353.
- 49.- Butler GD, Butler modified Wright stain for demonstration of *Campylobacter pylori*. *J. Histotechnol.* 1990; 13: 109.
- 50.- Cadranel S, Goosens H, De Boeck M, Malengreau A, Rodesch P, Butzler JP. *Campylobacter pyloridis* in children. *Lancet* 1986; i: 735.
- 51.- Cantor CR, Smith CI, Mathew MK. Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1988; 17: 287-304.
- 52.- Cave DR, Vargas M. Effect of a *Campylobacter pylori* protein on acid secretion by perietal cells. *Lancet* 1989; ii: 187-189.

-
- 53.- Cayla R, Lamouliatte HC, Brugmann M, Megraud F. Pre-treatment resistance of *H. pylori* to metronidazole and macrolides. Act. Gastroenterol. Belg. 1993; 56 (suppl): 65.
- 54.- Censini S, Luzzi I, Rappuoli R, Covacci A. DNA probes and the diagnosis of *H. pylori* infection. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1993; 5 (suppl 2): S44-S45.
- 55.- Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the stomach. Am. J. Clin. Pathol. 1994; 102: 503-507.
- 56.- Chen MH, Hazell S, Hu PJ, Li YY. Immunisation against gastric infection with *Helicobacter* species- first step in the prophylaxis of gastric cancer?. Int. J. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. 1993; 280: 155-165.
- 57.- Cheng S, Sanderson C, Waters T, Goodwin C. *Campylobacter pyloridis* in patients with gastric carcinoma. Med. J. Austral. 1987; 147: 202.
- 58.- Chodos JE, Dworkin BM, Smith F, van Horn K, Weiss L, Rosenthal WS. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease: a prospective endoscopic study and comparison of diagnostic tests. Am. J. Gastroenterol. 1988; 83: 1226-1230.
- 59.- Clayton CL, Wren BW, Mullany P, Topping A, Tabaqchali S. Molecular cloning and expression of *Campylobacter pylori* species-specific antigens in *Escherichia coli* K-12. Infect. Immun 1989; 57 (2): 623-629.
- 60.- Clayton CL, Kleanthous H, McNulty CAM, Dent J, Tabaqchali S. Evaluation of fingerprinting methods for identification of *Helicobacter pylori*. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 1991 a; 10: 1040-1047.
- 61.- Clayton CL, Kleanthous H, Morgan DD, Puckey L, Tabaqchali S. Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Ital. J. Gastroenterol. 1991 b; 23 (suppl 2): 29.
- 62.- Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S. Detection and identification of *H. pylori* by the PCR. J. Clin. Pathol. 1991 c; 44: 515-516.
- 63.- Clayton C, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 192-200.
- 64.- Clayton CL, Kleanthous H. Molecular studies on the epidemiology and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Goodwin CS and Worsley BW (eds). CRC Press, Florida. 1993. p. 143-159

-
- 65.- Corthésy-Theulaz I, Vaney AC, Haas R, Saraga E, Kraehenbuhl JP, Blum AL, Michetti P. *H. pylori* urease B subunit as a therapeutical vaccine against *H. felis* infection. *Gastroenterol.* 1994; 106: 668A.
- 66.- Costas M, Owen RJ, Bickley J, Morgan DR. Molecular techniques for studying the epidemiology of infection by *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; 26 (suppl. 181): 20-32.
- 67.- Costas M. Microcomputers in the comparative analysis of one-dimensional electrophoretic patterns. En: *Microcomputers in Biochemistry. A practical approach.* Bryce CFA (ed). IRL. Oxford University Press, 1992.
- 68.- Coudron PE, Kirby DF. Comparison of rapid urease tests, staining techniques and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol* 1989; 27: 1527.
- 69.- Coughlan JG, Gilligan D, Humphries H, McKenna D, Dooley C, Sweeney E, Keane C, O'Morain C. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers a 12 month follow up study. *Lancet* 1987; ii: 1109.
- 70.- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 5791-5795.
- 71.- Covacci A, Rappuoli R. PCR amplification of gene sequences from *Helicobacter pylori* strains. Protocolo nº 5. En: *Laboratory Manual. 1st International Technical Course on H. pylori.* Megraud F. University of Bourdeaux, 1994; p.28-33.
- 72.- Cover, T.L., Dooley, C.P., Blaser, M.J. Characterization of an human serologic response to protein in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* 1990; 58: 603.
- 73.- Cover TL, Purtear W, Pérez-Pérez G, Blaser MJ. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *H. pylori* cytotoxin. *Infect. Immun.* 1991; 59: 1264.
- 74.- Cover TL, Blaser MI. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *H. pylori*. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 10570-10575.
- 75.- Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 10566-10573.
- 76.- Crabtree JE, Wyatt JI, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 1993; 34: 1339-1343.

- 77.- Crabtree JE, Farmery SM, Lindley IJD, Figura N, Peichl P, Tompkins DS. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin 8 in gastric epithelial cell lines. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 945-950.
- 78.- Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM; Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJD, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* induced interleukin 8 expression in gastric epithelial cells associated with CagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 41-45.
- 79.- Czinn SJ, Dahms BB, Jacobs GH, Kaplan B, Rothstein FC. *Campylobacter* like organisms in association with symptomatic gastritis in children. *J. Pediatr.* 1986 a; 109: 80.
- 80.- Czinn S, Carr H, Aronoff S. Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to three macrolide antibiotics (erythromycin, roxithromycin (RU 28965) and CP 62,993) and rifampicin. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 1986 b; 30: 328-329.
- 81.- Czinn SJ, Nedrud. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 1991; 59: 2359.
- 82.- Czinn SJ, Cai A, Nedrud JG. Protection of germ-free mice from infection by *H. felis* after active oral or passive IgA immunization. *Vaccine* 1993; 11: 637-642.
- 83.- Danielsson D, Blomberg B, Järnerot G, Kosunen TU. Heterogeneity of *C. pylori* as demonstrated by coagglutination testing with rabbit antibodies. *Scand. J. Gastroenterol.* 1988; 3 (suppl 14): 58-63.
- 84.- Dal Bo N, Ferrana M, Salandro S, Dotto P, Del Bianco T, Vianello F, Plebani M, Vigneri S, Rugge M, Grasso GA, Battaglia G, Di Mario F. Comparison of two different triple therapies with clarithromycin for *H. pylori* eradication. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89: 1368.
- 85.- Debonjie JC, Pauwels S, Raat A, de Meeus Y, Haot J, Mainguet P. Quantification of *H. pylori* infection in gastritis and ulcer disease using a simple and rapid ¹⁴C urea breath test. *J. Nucl. Med.* 1991; 32: 1192-1198.
- 86.- De Giacomo C, Fiocca R, Villani L, Lisato L, Licardi G, Diegoli N, Donadini A, Maggiore G. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis, clinical serological and histologic correlations in children treated with amoxicillin and colloidal bismuth subcitrate. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1990; 11: 310.
- 87.- Dehesa M, Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Perez-Perez GI, Blaser MJ. High prevalence of *Helicobacter pylori* infections and histologic gastritis in asymptomatic hispanics. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 1128.

-
- 88.- Deltenre M, Glupczynski Y, De Prez C, Nyst JF, Burette A, Labbe M, Jonas C, DE Koster E. The reliability of urease tests, histology and culture in the diagnosis of *Campylobacter pylori* infection. Scand. J. Gastroenterol. 1989; 24 (Suppl 160): 19-24.
- 89.- Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL. Spiral organisms in the gastric antrum. Lancet 1987; ii: 96.
- 90.- Dent JC, McNulty CAM. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1988; 7: 555-558.
- 91.- Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, Prabhu SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*?. Scand. J. Gastroenterol. 1991; 26: 1205.
- 92.- Desai M, Linton D, Owen RJ, Stanley J. Molecular typing of *H. pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. Epidemiol. Infect. 1994; 112: 151-160.
- 93.- Dettmer A. Double-blind comparative trials of ranitidine plus amoxycillin in patients with *H. pylori* positive duodenal ulcer. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1369.
- 94.- Dick E, Lee A, Watson G, O'Rourke J. Use of the mouse for the isolation and investigation of stomach associated, spiral-helical shaped bacteria from man and animals. J. Med. Microbiol. 1989; 29: 55-62.
- 95.- Doenges JL. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. Proc. Soc. Exp. Med. Biol. 1939; 38: 536-538.
- 96.- Doermann HP, Birac C, Lamireau T, Megraud F. Distribution of the *cagA* gene in *H. pylori* strains isolated from children. Gut. 1995; 37 (suppl 1): A25.
- 97.- Doidge C, Gust I, Lee A, Buck F, Hazell S, Manne U. Therapeutic immunisation against *Helicobacter* infection (letter). Lancet 1994; 343: 914-915.
- 98.- Dovan GH, Dickel DN, Ballinger WE, Agee OF, Laipis PJ, Hauswirth WW. Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-yr-old human brain tissue from the Windover archeological site. Nature 1986; 323: 803.
- 99.- Dunn BE, Blaser MJ, Snyder EL. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membranes proteins. Infect. Immun. 1987; 55: 1564-1572.
- 100.- Dunn BE, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter pylori* proteins. Infect. Immun. 1989; 57 (6): 1825-1833.

- 101.- Dunn BE. Proteins, antigens and typing methods for *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Goodwin CS and Worsley BW (eds). CRC Press, Florida. 1993. p. 191-208.
- 102.- Drumm B, O'Brien A, Cutz E, Sherman P. *Campylobacter pyloridis* associated primary gastritis in children. *Pediatrics*. 1987 a; 80: 192.
- 103.- Drumm B, Sherman P, Cutz E, Karmali M. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. *N. Engl. J. Med.* 1987 b; 316: 1557.
- 104.- Drumm B, Sherman P, Chiasson D, Karmali M, Cutz E. Treatment of *Campylobacter pylori* associated antral gastritis in children with bismuth subsalicylate and ampicillin. *J. Pediatr.* 1988 a; 113: 908.
- 105.- Drumm B, Rhoads JM, Stringer DA, Sherman PM, Ellis LE, Durie PR. Peptic ulcer disease in children: etiology, clinical findings and clinical course. *Pediatrics*. 1988 b; 82: 410.
- 106.- Drumm B. *Helicobacter pylori*. *Arch Dis. Child.* 1990 a; 65: 1278.
- 107.- Drumm B, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ, Sherman PM. Intrafamilial clustering of *H. pylori* infection. *N. Engl J. Med.* 1990 b; 322: 359-363.
- 108.- Dworkin BM, Chodos JE, Fernández ME, Van Horn K, Cabello F, Wormser GP. Use of plasmid profiles in the investigation of a patient with *H. pylori* infection and peptic ulcer disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1991; 86: 354-356.
- 109.- Dwyer B, Kaldor J, Tee W, Marakowski E, Raios K. Antibody response to *C. pylori* in diverse ethnic groups. *Scand J. Infect. Dis.* 1988 a; 20: 349-350.
- 110.- Dwyer B, Nanxiong S, Kaldor J, Tee W, Lambert J, Luppino M, Flannery G. Antibody response to *C. pylori* in an ethnic group lacking peptic ulceration. *Scand J. Infect. Dis.* 1988 b; 20: 63-68.
- 111.- Eaton KA, Morgan DR, Krakowska S. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1992; 37: 123-127.
- 112.- Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter*. *Infect. Immun* 1994; 62: 3604-3607.
- 113.- El Nujumi, A.M., Dorrian, C.A., Chittajallu, R.S., Neithercut, W.D., McColl KEL. Effect of inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by acetohydroxamic acid on serum gastrin in duodenal ulcer subjects. *Gut* 1991; 32: 866-870.

- 114.- El-Zaatari FA, Nguyen AM, Genta RM, Klein PD, Graham DY. Determination of *H. pylori* status by reverse transcription-PCR. Comparison with urea breath test. *Dig. Dis. Sci.* 1995; 40: 109-113.
- 115.- Engstrand L, Pahlson C, Schwan A, Gustavsson S. Monoclonal antibodies for detection of *Campylobacter pylori* in biopsy smears and frozen sections. *Scand. J. Gastroenterol* 1988; 23 (supl 142): 50-52.
- 116.- Engstrand L, El-Zaatari FAK, Graham DY. RNA reverse transcription and PCR amplification for the detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2543.
- 117.- Engstrand L, Nguyen AMH, Graham DY, El-Zaatari FAK. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. *J. Clin. Microbiol* 1992; 30: 2295-2301.
- 118.- Euler AR, Zurenko GE, Moe JB, Ulrich RG, Yagi Y. Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 2285.
- 119.- Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341: 1359-62.
- 120.- European Study Group on antibiotic susceptibility of *H. pylori*. Results of a multicentre european survey in 1991 of metronidazole resistance in *H. pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11: 1-5.
- 121.- Evans Jr DJ, Evans DG, Graham DY. A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterol* 1989; 96: 1004-1008.
- 122.- Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ Jr, Graham DY, Lee CH. Cloning nucleotide sequence and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 674-683.
- 123.- Fabre R, Sobhani I, Laurent Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, Rodde I, Potet F, Migrnon M, Etienne JP, Braquet M. PCR assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test and histopathological tests. *Gut* 1994; 35: 905-908.
- 124.- Faulde M, Putzker M, Mertes T, Sobe D. Evaluation of an immunofluorescence assay for specific detection of immunoglobulin G antibodies directed against *Helicobacter pylori* an antigenic cross-reactivity between *H. pylori* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol* 1991; 29: 323-327.
- 125.- Ferguson D, Li C, Patel N, Mayberry W, Chi D, Thomas J. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 2802-2804.

-
- 126.- Ferrero RL, Hazell SL, Lee A. The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium. J. Med. Microbiol. 1988; 27: 33-40.
- 127.- Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Humphrey CL, Casteel HB, Evans DJ Jr, Graham DY. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. Pediatrics. 1991; 88: 578.
- 128.- Fiese FF, Steffen SH. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin. J. Antimicrob. Chemother 1990; 25 (suppl A): 39-47.
- 129.- Figura N, Guglielmetti P, Rossalini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA. et al. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. J. Clin. Microbiol. 1989; 27 (1): 225-26.
- 130.- Fitzgerald D, Murphy P. Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach. Irisch. J. Med. Sci. 1950; 292: 99-153.
- 131.- Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJE, Warren JR, Christiansen KJ, Marshall BJ, Collins BJ. Duodenal ulcer treated with *H. pylori* eradication- 7 year follow up. Lancet 1994; 343: 258-260.
- 132.- Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. J. Antimicrob. Chemother 1990; (suppl A): 73-82.
- 133.- Fox JG, Chilvers T, Goodwin CS, Taylor NS, Edmons P, Sly LI, Brenner DJ, *Campylobacter mustelae* a new species resulting from the elevation of *C. pylori* subesp. *mustelae* to species status. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39: 301-303.
- 134.- Fox JG, Correa P, Taylor NS, Lee A, Otto G, Murphy JC, Rose R. *Helicobacter mustelae* associated gastritis in ferrets. Gastroenterol. 1990; 99: 352.
- 135.- Fox JG, Perkins S, Yan L, Taylor N, Attardo L, Pappo J. Public health implication of *H. pylori* in cats presence of *H. pylori* in cat saliva, gastric juice and feces. Gut 1995; 37 (suppl 1): A10.
- 136.- Foxall PA, Hu L, Mobley HTL. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 739-741.
- 137.- Freedberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am. J. Dig. Dis. 1940; 7: 443-445.

-
- 138.- Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 331-334.
- 139.- Fujiyama K, Fujioka T, Kodama R, Nasau M. Effect of E3810, a novel proton pump inhibitor against *H. pylori*. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1371.
- 140.- García Rodríguez JA, García Sánchez JE, García García MI, García Sánchez E, Muñoz Bellido JL. "In vitro" activities of new oral betalactams and macrolides against *Campylobacter pylori*. Antimicrob. Agent. Chemother. 1989; 33: 1650-1651.
- 141.- Gasperoni S, Tucci A, Varoni O, Corinaldesi R, Stanghellini V, Paparo GF, Franceschini A, La Placa M, Barbara L. Antimicrobial susceptibility of 135 clinical isolates of *H. pylori*. Ital J. Gastroenterol. 1991; 23 (suppl 2); 39.
- 142.- Ge Z, Hiratsuka K, Taylor DE. Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation binding protein associated with copper transport. Mol. Microbiol. 1995; 15: 97-106.
- 143.- Ghiara P, Michetti P. Development of a vaccine. Curr. Op. Gastroenterol. 1995; 11 (suppl 1): 52-56.
- 144.- Glassman MS, Schwartz SM, Medow MS, Benech D, Halata M, Berezin S, Newman LJ. *Campylobacter pylori* related gastrointestinal disease in children. Dig. Dis. Sci. 1989; 34: 1501.
- 145.- Glupczynski Y, Labbé M, Thibaumont F. Comparative evaluation of a new selective medium for improved isolation of *Campylobacter pylori* from gastric biopsy specimens. En: Gastrodoudenal pathology and *Campylobacter pylori*. Mégraud F, Lamouliatte H (eds). Amsterdam: Excerpta Médica 1988 a, pp 3-6.
- 146.- Glupczynski Y, Delmee M, Bruck C, Labba M, Avesani V, Burette A. Susceptibility of clinical isolates of *C. pylori* to 24 antimicrobial and anti-ulcer agents. Eur. J. Epidemiol. 1988 b; 4: 154-157.
- 147.- Glupczynski Y, Burette A, De Koster E, Nyst JF, Deltenre M, Cadranel S, Bourdeaux L, De Vos D. Metronidazole-resistance in *H. pylori*. Lancet 1990; i: 976-977.
- 148.- Glupczynski Y, Burette A, Goossens H, De Prez C, Butzler JP. Effect of antimicrobial therapy on specific serologic response to *H. pylori* infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992 a; 11: 583-588.
- 149.- Glupczynski Y, Burette A. Eradicating *H. pylori*. Lancet 1992 b; 239: 54-55.

-
- 150.- Glupczynski Y, Gouter S, Van den Burre C, Butzler JP, Burette A. Surveillance of *H. pylori* resistance to antimicrobial agents in Belgium from 1989 to 1994. *Gut* 1995 a; 37 (suppl 1): A56.
- 151.- Glupczynski Y. Diagnóstico microbiológico de la infección por *H. pylori*. En: *H. pylori: Microbiología, Clínica y Tratamiento*. López-Brea M (ed). Mosby Doyma Libros. 1995 b. p. 54-72.
- 152.- Gobert B, Labigne A, De Korwin JD, Conroy MC, Bene MC, Faure GC. Polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori*. *Rev. Esp. Enf. Dig.* 1990; 78 (suppl 1): 3.
- 153.- Goldie J, Jabali S, Hunt RH, Richardson H. Study of media and pH requirements for the growth of *C. pylori*. *Gastroenterol.* 1988; 94: A150.
- 154.- Goodwin CS, Blincow ED, Warren JR, Waters TE, Sanderson CR, Easton L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pylori* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 1985 a; 38: 1127-1131.
- 155.- Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*C. pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 1985 b; 19: 257-267.
- 156.- Goodwin CS, Collins MD, Blincow E. The absence of thermoplasmaquinones in *C. pyloridis* and its temperature and pH growth range. *Microbios Letters* 1986 a; 32: 137-140.
- 157.- Goodwin CS, Blake P, Blincow E. The minimum inhibitory and bactericidal concentration of antibiotics and anti ulcer agents against *C. pyloridis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986 b; 17: 309-314.
- 158.- Goodwin CS, Armstrong JA, Wilson DH. Differences between "in vitro" and "in vivo" sensitivity of *Campylobacter pylori* to antibacterials. En: *Campylobacter pylori*. Menge H, Gregor M, Tytgat GNJ, Marshall BJ (eds). Springer-Verlag, Berlin 1988 a, 29.
- 159.- Goodwin CS, Marshall BJ, Blincow ED, Wilson DH, Blackburn S, Phillips M. Prevention of nitroimidazole resistance in *Campylobacter pylori* by coadministration of colloidal bismuth subcitrate: clinical and "in vitro" studies. *J. Clin. Pathol.* 1988 b; 41: 207.
- 160.- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov. respectively. *Int. J. Syst. Bact.* 1989; 39: 397.

-
- 161.- Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1990; 9: 1-13.
- 162.- Goodwin CS. Overview of *Helicobacter pylori* gastritis, peptic ulcer and gastric cancer and the possible development of an *H. pylori* vaccine. En: *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Goodwin CS and Worsley BW (eds). CRC Press, Florida. 1993 a. p. 431-444.
- 163.- Goodwin CS. The susceptibility of *Helicobacter pylori* to antibiotics. En: *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Goodwin CS and Worsley DW (eds). CRC Press Florida. 1993 b, p 343-349.
- 164.- Goossens H, Glupzcynski Y, Burette A, Van den Borre C, Butzler JP. Evaluation of a commercially available second generation immunoglobulin G enzyme immunoassay for detection of *H. pylori* infection. J. Clin. Microbiol 1992; 30: 176-180.
- 165.- Gormally S, Sherman P, Drumm B. Clinical syndromes of *Helicobacter pylori* infection in children. En: *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Goodwin CS and Worsley BW (eds). CRC Press Florida. 1993. p. 85-93.
- 166.- Graham DY, Klein PD, Evans Jr DJ, Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW. *Campylobacter pylori* detected non invasively by the ¹³C- Urea Breath test. Lancet 1987; i: 1174-1177.
- 167.- Graham DY, Klein PD, Opekun AR, Boutton TW, Evans Jr DJ, Evans DG, Alpert LC, Michaletz PA, Yoshimura HH, Adam E. Epidemiology of *C. pylori* infection: ethnic considerations. Scand. J. Gastroenterol 1988; 23 (suppl 142): 9-13.
- 168.- Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. Gastroenterol 1989; 96: 615-625.
- 169.- Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans Jr DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *H. pylori* in an asymptomatic population in the United States. Gastroenterology 1991; 100: 1495-1501.
- 170.- Gray SF, Wyatt JI, Rathbone BJ. Simplified techniques for identifying *Campylobacter pyloridis*. J. Clin. Pathol 1986; 39: 1279.
- 171.- Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol 1986; 137 B: 165-175.
- 172.- Haas CE, Nix DE, Schentag JJ. "In vitro" selection of resistant *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agent. Chemother. 1990; 34: 1637-1641.

- 173.- Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 54-58.
- 174.- Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, Rozmariekk H, Rufo R, Stalis JH. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. Infect. Immun. 1994; 62: 2367-2374.
- 175.- Hänenin ML, Jalava K, Kaartinen M, Happonen I, Saari S. Culture and characterization of a new *Helicobacter sp* resembling *H. heilmanni* isolated from gastric biopsies of dogs. Gut 1995; 37 (suppl 1): A49.
- 176.- Hassall E, Dimmick JE. Unique features of *Helicobacter pylori* disease in children. Dig. Dis. Sci. 1989; 36: 417.
- 177.- Hawrylik SJ, Wasilko DJ, Haskell SL, Gootz TD, Lee SE. Bisulfite or sulfite inhibits growth of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 790-792.
- 178.- Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pylori* and gastritis association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. J. Infect. Dis. 1986; 153: 658.
- 179.- Hazell SL, Borody TS, Gal A, Lee A. *Campylobacter pyloridis* gastritis. I: Detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. Am. J. Gastroenterol. 1987; 82: 292-296.
- 180.- Hazell SL, Markesich DC, Evans DJ, Evans DG, Graham DY. Influence of media supplements on growth and survival of *Campylobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989; 8: 597-602.
- 181.- Hazell SL, Evans DJ, Graham DY. *H. pylori* catalasa. J. Gen. Microbiol, 1991; 137: 57.
- 182.- Hazell SL, Mendez GL. The metabolism and enzymes of *Helicobacter pylori*: Function and potential virulence effects. En: *Helicobacter pylori*: Biology and Clinical practice. Ed. Goodwin CS, Worsley BW. 1993; 115-141.
- 183.- Hentscheld E, Brandstatter G, Dragosics B, Hirschl AM, Nemeč H, Schutze K, Taufer M, Wurzer H. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *H. pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. N. Engl. J. Med. 1993; 328: 308-312.
- 184.- Hill R, Pearman J, Worthy P, Caruso V, Goodwin S, Blincow E. *Campylobacter pyloridis* and gastritis in children. Lancet 1986; i: 387.

-
- 185.- Hirschl AM, Pletschette M, Hirschl MH, Berger J, Stanek G, Rotter ML. Comparison of different antigen preparations in an evaluation of the immune response to *Campylobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1988 a; 7: 570-575.
- 186.- Hirschl AM, Hentschel E, Schütze K, Nemeč H, Pötzi R, Gangl A, Weiss W, Pleschette M, Stanek G, Rotter ML. The efficacy of antimicrobial treatment in *Campylobacter pylori* associated gastritis and duodenal ulcer. Scand. J. Gastroenterol. 1988 b; 23 (suppl 142): 76.
- 187.- Hirschl AM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Berger J, Rotter ML. Comparison of ELISA antigen preparation alone or in combination for serodiagnosing *Helicobacter pylori* infections. J. Clin. Pathol. 1990; 43: 511-513.
- 188.- Hirschl AM, Richter M, Makristathi A, Puückl PM, Willinger B, Schütze K, Rotter ML. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. J. Infect. Dis. 1994; 170: 473-475.
- 189.- Hirschowitz BL, Mohnen J, Shaw S. High recurrence rate of duodenal ulcer despite *H. pylori* eradication in a clinical subset- rapidly recurring peptic ulcer. Gastroenterology 1994; 106,4 (2suppl): 94.
- 190.- Hogley HL, Hu LT, Foxal PA. *H. pylori* urease: properties and role in pathogenesis. Scand J. Gastroenterol. 1991; suppl 187: 39-46.
- 191.- Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, Dixon MF, Wyatt JJ, Tompkins DS, Taylor GR. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in human and animals. J. Clin. Microbiol 1991; 29: 2543-2549.
- 192.- Hoshima S, Kahn SM, Jiang W, Green PH, Neu HC, Chin N, Morotomi M, LoGerfo P, Weinstein IB. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1990; 13: 473.
- 193.- Howden A, Boswell P, Tovey F. "In vitro" sensitivity of *Campylobacter pyloridis* to furazolidone. Lancet 1986; i: 1035.
- 194.- Hultén K, Han SW, El-Zaatari FAK, Evans DG, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Graham DY, Engstrand L. Detection of *Helicobacter pylori* in peruvian water sources by two PCR assays based on independent genes. Gut 1995; 37 (suppl 1): A10.

-
- 195.- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 2465-2466.
- 196.- Hupertz V, Czinn S. Demonstration of a cytotoxin from *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988; 7: 576-78.
- 197.- Hurtado A, Owen RJ, Desai M. Flagellin gene profiling of *Helicobacter pylori* infecting symptomatic and asymptomatic individuals. *Res. Microbiol.* 1994 a; 145: 585-594.
- 198.- Hurtado A, Chahal B, Owen RJ, Smith AW. Genetic diversity of the *Helicobacter pylori* haemagglutini/ protease (hap) gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994 b; 123: 173-178.
- 199.- Hurtado A, Owen RJ. Identification of mixed genotypes in *Helicobacter pylori* from gastric biopsy tissue by analysis of urease gene polymorphisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1994 c; 8: 307-313.
- 200.- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342: 571-574.
- 201.- Husson MO, Leclercq H. Detection of *Helicobacter pylori* in stomach tissue by use of a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2831-2834.
- 202.- Isaacson PG. Extranodal lymphomas: the MALT concept. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 1992; 76: 14-23.
- 203.- Iwahi T, Satoh H, Nakao M, Iwasaki T, Yamazaki T, Kubo K, Tamura T, Imada A. Lansoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor, and its related compounds have selected activity against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1991; 35: 127-133.
- 204.- Jablonowski H, Hengels KJ, Kraemer N, Geis G, Opferkuch W, Strohmeyer G. Effects of *Helicobacter pylori* on histamine and carbachol stimulated acid secretion by human parietal cells. *Gut* 1994; 35: 755-757.
- 205.- Jaskiewicz K, Louw JA, Marks IN. Local cellular and immune response by antral mucosa in patients undergoing treatment for eradication of *H. pylori*. *Dig. Dis. Sci.* 1993; 38: 937-943.
- 206.- Jiang SJ, Liu WZ, Zhang DZ, Shi Y, Xiao SD, Zhang ZN, Lu DY. *Campylobacter*-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. *Scand J. Gastroenterol.* 1987; 22: 553-558.

-
- 207.- Jones DM, Lessells AM, Eldridge J. *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol* 1984; 37: 1002-1006.
- 208.- Jones DH, Curry AA, Fox AJ. An ultrastructural study of the gastric *Campylobacter*-like organisms "*C. pyloridis*". *J. Gen. Microbiol.* 1985; 131: 2335-2341.
- 209.- Jones DM, Eldridge J, Fox AJ, Sethi P, Whorwell PJ. Antibody to the gastric *Campylobacter*-like organism *Campylobacter pyloridis*, clinical correlations and distribution in the normal population. *J. Med. Microbiol.* 1986; 22: 57-62.
- 210.- Jones DM, Curry A. Ultrastructural study of gastric *Campylobacter*-like organisms from man, baboon, pig and ferret. En: *Campylobacter IV: Proceedings of the 4th International Workshop on Campylobacter Infections*. Kaijser B, Falsen E (ed). University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden 1988, p.109.
- 211.- Jones BD, Mobley HLT. *Proteus mirabilis* urease, nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. *J. Bacteriol.* 1989; 171: 6414.
- 212.- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145: 1365-1373.
- 213.- Kaihovaara P, Salmela KS, Roine RP, Kosunen TU, Salaspuro M. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. *Alcoholism (NY)* 1994; 18: 1220-1225.
- 214.- Kang JY, Tay HH, Wee A, Guan R, Math MV, Yap I. Effect of colloidal bismuth subcitrate on symptoms and gastric histology in non-ulcer dyspepsia. A double blind placebo controlled study. *Gut* 1990; 31: 476-480.
- 215.- Kangatharalingam N, Amy PS. *Helicobacter pylori* comb. nov. exhibits facultative acidophilism and obligate microaerophilism. *Appl. Environm. Microbiol.* 1994; 60: 2176-2179.
- 216.- Kansau I, Thiberge JM, Ferrero RL, Suerbaum S, Labigne A. Immunological and functional properties of the HspA and HspB heat shock proteins of *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89: 1326-1320.
- 217.- Karita M, Tummuru MKR, Blaser MJ. Growth phase and pH-related regulation of *cagA*, *cagC* and *ureA* expression in *H. pylori*. *Gut* 1995; 37 (suppl 1): A1.
- 218.- Kasper G, Dickgiensser N. Isolation of *Campylobacter*-like bacteria from gastric epithelium. *Infection* 1984; 12: 179-180.

- 219.- Kehler EG, Midkiff BR, Westblom TU. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1597-1598.
- 220.- Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM; Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterol. 1994; 107: 1671-1674.
- 221.- Kilbridge PM, Dahms BB, Czinn SJ. *Campylobacter pylori* associated gastritis and peptic ulcer disease in children. Am. J. Dis. Child. 1988; 142: 1149.
- 222.- Kjölher M, Fisher A, Justesen T. Transport conditions and number of biopsies necessary for culture of *Helicobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 1991; 10: 166-167.
- 223.- Kleanthous H, Clayton CL, Tabaqchali S. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in Gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 1991; 5: 2377-2389.
- 224.- Klein PD, Gilman RH, Leon-Barua R, Diaz F, Smith EO, Graham DY. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in peruvian children between 6 and 30 months of age. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 2196-2200.
- 225.- Konturek SJ, Brozowski T, Drozdowicz D, Majka J. Ebrotidina, a novel H₂ receptor antagonist with local gastroprotective activity. Eur. J. Gastroenterol Hepat. 1991; 3: 941-947.
- 226.- Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ. Molecular characterization of a conserved 20 KDa membrane associated lipoprotein antigen of *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. 1994; 176: 5938-5948.
- 227.- Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Siponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *H. pylori*. Lancet 1992; 339: 893-895.
- 228.- Kotiainen S, Seppala I, Miettinen A, Kosunen TU, Verkasalo M, Maenpaa J. Antibodies against some bacterial antigens in children. Acta Paediatr. 1994; 83: 1137-1142.
- 229.- Krajden S, Bohnen J, Anderson J, Kempston J, Fuksa M, Matlow A, Marcon N, Haber G, Kortan P, Karmali M, Corey P, Petrea C, Bibida C, Hayman S. Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 1117-1118.

- 230.- Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A, Petre C, Babida C, Karmali M, Penner JL. Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *C. pylori*. J. Clin. Microb. 1989; 27: 1937-38.
- 231.- Kreintz W. Ueber das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei "carcinoma ventriculi". Dtsch. Med. Wochenschr. 1906; 32: 872.
- 232.- Kristiansen JE, Justesen T, Hvidberg EF, Andersen LP. Trimipramine and other antipsychotics inhibit *C. pylori* "in vitro". Pharmacol. Toxicol. 1989; 64: 386-388.
- 233.- Kung JSL, Lo B, Chan SH. Biotyping of *Campylobacter pylori*. J. Med. Microbiol. 1989; 29: 203.
- 234.- Labenz J, Rühl GH, Stolte M, Bertrams J, Börsch G. Efficacy of low -dose one week triple therapy to cure *H. pylori* infection. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1376.
- 235.- Labigne A, Lamouliatte H, Birac C, Sedallian A, Megraud F. Distribution of the *cagA* gene among *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer (Abstract). Am J. Gastroenterol. 1994; 89: 1326.
- 236.- Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of *H. pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2752-2756.
- 237.- Lamouliatte H, Cayla R, Bernard PH, Quinton A. Metaanalysis of randomized trials of *H. pylori* associates non-ulcer dyspepsia. Rev. Esp. Enf. Digest. 1990; 78 (suppl 1): 67.
- 238.- Lambert T, Megraud F, Gerbaud C, Courvalin P. Susceptibility of *Campylobacter pylori* to 20 antimicrobial agnts. Antimicrob. Agent. Chemother. 1986; 30: 510-511.
- 239.- Langenberg ML, Tytgat GN, Schipper ME, Rietra PJG, Zanen HC. *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. Lancet 1984; i: 1348-1349.
- 240.- Langenberg W, Rauws EAJ, Widjojokusumo A, Tytgat GNJ, Zanen HC. Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 1986; 24: 414-417.
- 241.- Langenberg W, Rauws EAJ, Oudbier JH, Tytgat GNJ. Patient to patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodendoscopy and biopsy. J. Infect. Dis. 1990; 161: 507.

-
- 242.- Last JM (Eds). A dictionary of epidemiology, 2nd ed, Oxford University Press, New York, 1988.
- 243.- Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J. A small model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterol.* 1990; 99: 1315.
- 244.- Lee A. Spiral organism: what are they?. A microbiologic introduction to *H. pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; suppl 187: 9-22.
- 245.- Lee A, Fox J, Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immunit.* 1993; 61: 1601-1610.
- 246.- Leunk, R.D., Johnson D.T., David, B.C., Kraft, W.G., Morgan, D.R. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1988; 26: 414-17.
- 247.- Leverstein van Hall MA, van der Ende A, van Milligen de Wit M, Tytgat GNJ, Dankert J. Transmission of *Helicobacter pylori* via faeces. *Lancet* 1993; 342: 1419-1420.
- 248.- Leying H, Suerbaum S, Geis G, Haas R. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* flagellin genes. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 2863-2874.
- 249.- Lian JX, Carrick J, Lee A, Daskalopoulos. What is the role of metronidazole resistance in the eradication of *H. pylori*. *Act Gast. Enterol. Belg.* 1993; 56 (suppl): 126.
- 250.- Lindberg T. Recurrent abdominal pain in childhood. *Act. Pediatr.* 1994; 83: 775-776.
- 251.- Lingwood CA, Wasfy G, Han H, Huesca M. Receptor affinity purification of a lipid binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 1993; 61: 2474-2478.
- 252.- Lior H. Serological characterization of *Helicobacter pylori* a provisional typing scheme. *Ital. J. Gastroenterol.* 1991; 23 (suppl 2): 42.
- 253.- Loffeld RJLF, Vriese WTJ, Stobberingh EE. Usefulness of several commercial enzymelinked immunoassays for detection of *H. pylori* in clinical medicine. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol* 1993; 5: 333-337.
- 254.- Logan RPH, Dill S, Bauer FE, Walker MM, Hirschl AM, Gummett PA et al. The European ¹³C urea breath test for the detection of *H. pylori*. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991 a; 3: 915-921.
- 255.- Logan RPH, Gummett PA, Misiewicz JJ, Karin QN, Walker MM, Baron JH. One week eradication regimen for *H. pylori*. *Lancet* 1991 b; 338: 1249-1252.

- 256.- Logan R. Urea breath tests for the detection of *H. pylori* infection. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1993; 5: (suppl 2): S46-S49.
- 257.- Loo VG, Sherman P, Hatlow AG. *Helicobacter pylori* infection in a pediatric population. "In vitro" susceptibilities to omeprazole and eight antimicrobial agents. Antimicrobial. Agent. Chemother. 1992; 36: 1133-1135.
- 258.- López-Brea M, Jiménez ML, Blanco M, Pajares JM. *Campylobacter* en muestras de biopsias gástricas. Rev. Esp. Microbiol. Clin. 1985; 3: 232.
- 259.- López-Brea M, Pajares JM, Blanco M, Jiménez ML. Ethidium bromide stain to identify *Campylobacter pyloridis* in gastric biopsies. IV International Workshop on *Campylobacter* infections. Goteborg 1987. Abstracts nº 98.
- 260.- López-Brea M, Martín E, López-Lavid C, Sanz JC. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991; 10: 1082-1083.
- 261.- López-Brea M. *Helicobacter pylori*. Enf. Inf. Microb. Clin. 1992 a; 10: 360-365.
- 262.- López-Brea M, Alarcón T, Sanz JC, López-Lavid C, Martín E. Actividad "in vitro" de metronidazol y amoxicilina frente a *H. pylori*. Rev. Esp. Quimioterap. 1992 b; 5 (supl1): 233-234.
- 263.- López-Brea M, Martín E, Alarcón T, Acuña MD, Gimeno D, Sanz JC. Seguimiento de la respuesta serológica cuantitativa al tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. Enfer. Infec. Microb. Clín. 1993 a; 11: 33-35.
- 264.- López-Brea M, De Pedro S, Domingo D, Sanz JC, Alarcón T. Pérdida de catalasa en cepas de *Helicobacter pylori* conservadas durante largos periodos de tiempo. V Reunión Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Valladolid, Septiembre 1993 b. Abstract nº 16.
- 265.- López-Brea M, Martín E, Sanz JC, Moreno MJ, Martínez MJ, Alarcón T. "In vitro" susceptibility of *Helicobacter pylori* Spanish clinical isolates to clarithromycin. Act. Gastroenterol. Belg. 1993 c; 56: 126.
- 266.- López-Brea M, Díaz de Rojas F, Alarcón T, Sanz JC, De Pedro S, Moreno MJ. "In vitro" activity of omeprazole against *Helicobacter pylori*. Act. Gastroenterol. Belg. 1993 d; 56: 127.
- 267.- López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Sánchez Romero I, Sanz JC, Alarcón T. Evolution of the resistance to several antibiotics in *H. pylori* over a 4 year period. Gut 1995 a; 37 (suppl 1): A97.

- 268.- López-Brea M, Alarcón T. Sensibilidad antimicrobiana en la infección por *H. pylori*. En: *H. pylori: Microbiología, Clínica y Tratamiento*. López-Brea M. (ed). Ed Mosby Doyma. 1995 b. p.32-53.
- 269.- Louw JA, Jaskiewicz K, van Rensburg C, Lucke W, O'Keefe S, Marks IN. The proton pump inhibitors : omeprazole, lansoprazole and pantoprazole have a similar effect on gastric *H. pylori* distribution. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89: 1379.
- 270.-Macchia G, Massone A, Burroni D, Covacci A, Censini S, Rappuoli R. The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori* structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. *Mol. Microbiol.* 1993; 9: 645- 652.
- 271.- Madam E, Kemp J, Westblom TU, Subik M, Sexton S, Cook J. Evaluation of staining methods for identifying *Campylobacter pylori*. *Am. J. Clin. Pathol.* 1988; 90: 450-453.
- 272.- Mai U, Geis G, Leying H, Ruhi G, Opferkuch W. Dimorfism of *Campylobacter pylori*. En: *Gastroduodenal pathology and Campylobacter pylori*. Megraud F, Lamouliatte H (ed). Excerpta Medica. Amsterdam 1989, p. 29-33.
- 273.- Mainguet P, Delmee M, Debongnie JC. Omeprazole, *Campylobacter pylori* and duodenal ulcer. *Lancet* 1989; i: 389-390.
- 274.- Majewski SIH, Goodwin CS. Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J. Infect. Dis.* 1988; 157: 465-471.
- 275.- Majmudar P, Shah SM, Chunjibhoy KR, Desai HG. Isolation of *H. pylori* from dental plaques in healthy volunteers. *Ind. J. Gastroenterol.* 1990; 9: 271-272.
- 276.- Malaty HM, Evans DG, Evans DJ Jr, Graham DY. *Helicobacter pylori* in hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterol.* 1992; 103: 813-816.
- 277.- Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1994; 35: 742-745.
- 278.- Malfertheiner P, Pieramico O. *Helicobacter pylori*. En: *The stomach*. Gustavsson S, Kumar D, Graham DY (eds), Churchill Livingstone. 1992. p.297-311.
- 279.- Mapstone NP, Lynch D, Lewis FA, Axon ATR, Dixon MF, Quirke P. The polymerase chain reaction in the diagnosis of *Helicobacter* infection. *Ital. J. Gastroenterol.* 1991; 23 (suppl 2): 4.

-
- 280.- Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P. Identification of *H. pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol* 1993 a; 46:540-543.
- 281.- Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P. PCR identificación of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 1993 b; 341: 447.
- 282.- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961; 3: 208-218.
- 283.- Marotta F, Barreto R, Safran P, Bellini O, Barbi G, Maruyama M. Sucralfate prevents the ammonia-induced progression of experimental ulcer. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89: 1380.
- 284.- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984 a; i: 1311-1314.
- 285.- Marshall BJ, Royce H, Annear DI, Pearman JW, Warren JR, Armstrong JA. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letters* 1984 b; 25: 83-88.
- 286.- Marshall BJ, Mac Gechie DB, Rogers PA, Clancey RJ. Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Aus.* 1985 a; 142: 439-444.
- 287.- Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy R. Attempt to fulfill Kock's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 1985 b; 142: 436-439.
- 288.- Marshall BJ, Goodwin CS. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Inter. J. System. Bacteriol.* 1987 a; 37: 68.
- 289.- Marshall BJ, Warren JR, Francis GJ, Langton SR, Goodwin CS, Blincow ED. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis* associated gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* 1987 b; 82: 200-210.
- 290.- Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blincow ED, Blackbounn SJ, Philips M, Waters TE, Sanderson CR. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *C. pylori*. *Lancet* 1988 a; ii: 1437-1442.
- 291.- Marshall BJ, Surveyor I. ¹⁴C urea breath test for the diagnosis of *C. pylori* associated gastritis. *J. Nucl. Med.* 1988 b; 29: 11-16.
- 292.- Marshall BJ, Barret LJ, Prakesch N. Protection of *C. pyloridis* but not *C. jejuni* against acid susceptibility by urea. En: *Campylobacter IV*. Proceedings of the Fourth International Workshop on *Campylobacter* infections. Kaijser B, Falsen E (ed). University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden 1988 c, p.402.

-
- 293.- Marshall BJ. *Campylobacter pylori*: its link to gastritis and peptic ulcer disease. Rev. Infect. Dis. 1990; 12: 587-593.
- 294.- Marshall B.J. Manejo del paciente con úlcera péptica en la era de *Helicobacter pylori*. Enf. Inf. Microb. Clin. 1994; 12 (suppl 1): 36- 40.
- 295.- Martínez Gómez MJ, Sanz JC, Sánchez Pérez V, Gimeno M, Alarcón T, López-Brea M. Antral gastritis by *H. pylori* in Spanish children: Symptomatology, endoscopic and histological findings. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1351.
- 296.- Maton PN. Omeprazole. N. Engl. J. Med. 1991; 323: 965-975.
- 297.- McLaren A, McColm AA, McDowell SR, Bagshaw JA. Ranitidine bismuth citrate (GR122311X): a novel compound with superior anti-*Helicobacter* activity to a mixture of ranitidine and bismuth citrate. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1381.
- 298.- McMullen L, Walker MM, Bain LA, Karim QN, Baron JH. Histological identification of *Campylobacter* using Gimenez technique in gastric antral mucosa. J. Clin. Pathol. 1987; 40: 464-465.
- 299.- McNulty CAM, Watson DM. Spiral bacteria of the gastric antrum. Lancet 1984; i: 1067-1068.
- 300.- McNulty CAM, Wise R. Rapid diagnostic of *Campylobacter* associated gastritis. Lancet 1985 a; i: 1443-1444.
- 301.- McNulty CA, Dent J, Wise R. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pyloridis* to 11 antimicrobial agents. Antimicrob. Agent. Chemother. 1985 b; 28: 837-838.
- 302.- McNulty CAM, Gearty JC; Crump B, Davis M, Donovan IA, Melikian V, Lister DM, Wise R. *Campylobacter pyloridis* and associated gastritis: investigator blind, placebo controlled trial of bismuth salicylate and erythromycin ethylsuccinate. Br. Med. J. 1986; 293: 645-649.
- 303.- McNulty CAM, Dent JC. Rapid identification of *C. pylori* (*C. pyloridis*) by preformed enzymes. J. Clin. Microbiol. 1987; 5: 1683-1686.
- 304.- McNulty CA, Dent JC. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pylori* to twenty-one antimicrobial agents. Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis. 1988; 7: 566-569.
- 305.- McNulty CAM, Dent JC, Curry A, Uff JS, Gear MWL, Wilkinson SP. Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test: an assessment in 1445 patients. Gut 1989; 30: 1058-1062.

- 306.- McNulty CAM. *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) its clinical significance. Res. Med. Microbiol. 1990; 1: 76-82.
- 307.- McNulty CAM. Detection of *Helicobacter pylori* infection by the biopsy urease test. En: *H. pylori* infection and gastroduodenal disease. Rathbone BJ, Heatley RV (eds). 2nd ed Oxford: Blackwell Scientific Publications 1992; pp 58-63.
- 308.- Megraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile and protein content. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 1007-1010.
- 309.- Megraud F. Morphological and biochemical characterization of *Campylobacter pylori*. En: *Campylobacter pylori*: Proceedings of the First International Symposium on *Campylobacter pylori*. Menge H, Gregor M, Tytgat GNJ, Marshall BJ (eds). Springer, Berlin 1988, p.3-16.
- 310.- Megraud F, Brassens-Rabbé MP, Denis F, Bellbouri A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* in various populations. J. Clin. Microbiol. 1989 a; 27: 1870-1873.
- 311.- Megraud F. *Campylobacter pylori* enzymes. En: *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Rathbone BJ, Heathley RV, Eds, Blackwell Scientific, Oxford, 1989 b, 39.
- 312.- Megraud F, Neman-Simla V, Bruegmann D. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *H. pylori* urease on lumen epithelial cells. Infect. Immun. 1992; 60: 1858-1863.
- 313.- Megraud F. *Helicobacter pylori* species heterogeneity. En: *Helicobacter pylori*. basic mechanisms to clinical cure. Hunt RH, Tytgat GNJ (eds). Kluwer: Dordrecht, The Netherlands; 1994: 28-40.
- 314.- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Stracham D, Northfield TC. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. lancet 1992; 339: 896.
- 315.- Mendes EN, Queiros DMM, Dewhirst FE, Paster BJ, Carvalino SD, Magnago AGP, Moura SB, Rocha GA, Oliveira AMR. Reservoir hosts for human *Gastrospirillum* infection. Gut 1995; 37 (suppl 1): A26.
- 316.- Mertens JCC, Deckker W, Ligtoet EEJ, Block P. Treatment failure of norfloxacin against *Campylobacter pylori* and chronic gastritis in patients with nonulcerative dyspepsia. Antimicrob. Agent. Chemother. 1989; 33: 256-257.
- 317.- Michetti P, Haas R. Steps towards a vaccine. Curr. Op. Gastroenterol. 1994; 10 (suppl 1): 53-57.

- 318.- Mitchell HM, Lee A, Carrick J. Increased incidence of *C. pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person to person transmission of *C. pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 1989; 24: 396-400.
- 319.- Mohamed AE, Al Karawi A, Al Jumah A, Ahmed AMM, Sharig S, Yasawy MI, Osaba O. *Helicobacter pylori* incidence and comparison of three diagnostic methods in 196 Saudi patients with dyspepsia. *Hepatogastroenterol* 1994; 41: 48-50.
- 320.- Montgomery EA, Martin DF, Peura DA. Rapid diagnosis of *Campylobacter pylori* by Gram's stain. *Am. J. Pathol.* 1988; 90: 606-609.
- 321.- Moore RA, Kureishi A, Wong S, Bryan LE. Categorization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the basis of restriction digest analyses of polymerase chain reaction-amplified *ureC* genes. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (5): 1334-1335.
- 322.- Morgan DR, Freedman R, Depew CE, Kraft WG. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 1987 a; 25: 2123-2125.
- 323.- Morgan DR, Fitzpatrick PM, David KL, Kraft WG. Susceptibility patterns of *Campylobacter pyloridis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987 b; 42: 245.
- 324.- Morgan DR, Leunk RD. Pathogenesis of infection by *Campylobacter pylori*. En: *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. Blaser MJ (ed), Igaku Shoin, Inc, New York. 1989. p.115-133.
- 325.- Morgan DD, Owen RJ. Use of DNA restriction endonucleases digest and ribosomal RNA gene probe patterns to fingerprint *H. pylori* and *H. mustelae* isolated from human and animal hosts. *Moll. Cell. Probes.* 1990; 4: 321-334.
- 326.- Morgan DD, Clayton CL, Kleanthous H, McNulty CAM, Tabaqchali, S. Molecular fingerprinting of *Helicobacter pylori* an evaluation of methods. *Ital. J. Gastroenterol.* 1991; 23 (suppl 2): 34.
- 327.- Morotomi M, Hoshina S, Green P, Neu HC, LoGerfo P, Watanabe I, Mutai M, Weinstein IB. Oligonucleotide probe for detection and identification of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 2652-2655.
- 328.- Morris A, Nicholson G, Lloyd G, Haines D, Rogers A, Taylor D. Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*. *N. Z. Med. J.* 1986; 99: 657.
- 329.- Morris, A. and Nicholson, G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* 1987; 82: 192-199.

- 330.- Morris A, Ali MR, Brown P, Lane M, Ppton K. *Campylobacter pylori* infection in biopsy specimens of gastric antrum: laboratory diagnosis and estimation of sampling error. J. Clin. Pathol. 1989; 42: 727-732.
- 331.- Morsdorf G, Kaltwasser H. Cloning of the genes encoding urease from *Proteus vulgaris* and sequencing of the structural genes. FEMS Microbiol. Lett. 1990; 66: 67.
- 332.- Morton D, Bardhan KD. Effect of transport medium and transportation time on culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens (letter). J. Clin. Pathol 1995; 48: 91.
- 333.- Mulrooney SB, Hausinger RP. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. J. Bacteriol. 1990; 172: 5837.
- 334.- Murphy MS, Eastham E. Peptic ulcer disease in childhood: long term prognosis. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1987; 6: 721.
- 335.- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 1980; 8: 4321-4325.
- 336.- Ndawula EM, Owen RJ, Mihr G, Borman P, Hurtado A. *Helicobacter pylori* bacteriemia. Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis. 1994; 13: 621.
- 337.- Nedenskov-Sorensen P, Buckholm G, Bovre K. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. J. Infect. Dis. 1990; 161: 365.
- 338.- Negrini R, Lisato L, Cavazzini L, Maini P, Gullini S, Basso O, Lanza G Jr, Garofalo M, Nenci I. Monoclonal antibodies for specific immunoperoxidase detection of *Campylobacter pylori*. Gastroenterol 1989; 96: 414-420.
- 339.- Newell DG, Johnstone BJ, Ali MH, Reed PI. An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of *Campylobacter pylori*-associated gastritis. Scand J. Gastroenterol 1988; 23 (suppl 142); 53: 53-57.
- 340.- Newell DG, Rathbone BJ. Review article: the serodiagnosis of *Campylobacter pylori* infection. Serodiag. Immunother. Infect. Dis. 1989; 3: 1-7.
- 341.- Newell DG. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. 1991; suppl 187: 31-38.
- 342.- Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, EL-Zaatari FA. Detection of *H. pylori* in dental plaque by reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 783-787.

- 343.- Nilius M, Bode G, Büchler M, Malfertheiner P. Adhesion of *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* to human and bovine surface mucus cells in vitro. Eur. J. Clin. Invest. 1994; 24: 454-458.
- 344.- Noach LA, Rolf TM, Tytgat GNJ. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. J. Clin. Pathol. 1994; 47: 699-704.
- 345.- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. Ann. Intern. Med. 1994; 120: 977-981.
- 346.- Nwokolo CU, Bickley J, Attard AR, Owen RJ, Costas M, Fraser IA. Evidence of clonal variants of *H. pylori* in three generations of a duodenal ulcer disease family. Gut. 1992; 33: 1323-1327.
- 347.- Oderda G, Holton J, Altare F, Vaira D, Ainley C, Ansaldi N. Amoxycillin plus tinidazole for *Campylobacter pylori* gastritis in children assessment by serum IgG antibody, pepsinogen I and gastrin levels. Lancet 1989 a; i: 690.
- 348.- Oderda G, Dell'Olio D, Morra I, Ansaldi N. *Campylobacter pylori* gastritis: long term results of treatment with amoxycillin. Arch. Dis. Child. 1989 b; 4: 326.
- 349.- Oderda G, Vaira D, Holton J. Age related increase of *Helicobacter pylori* frequency in symptom free and dyspeptic children. Lancet 1992; 340: 671-672.
- 350.- Oderda G, Vaira D, Holton J. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. J. Clin. Pathol. 1994; 47: 286.
- 351.- Oderda G, Cadranel S. Paediatric *Helicobacter pylori*. Curr. Op. Gastroenterol. 1995; 11 (suppl 1): 42-46.
- 352.- Oliveira AMR, Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 2101-2204.
- 353.- Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF, Abate L, Espósito E, de Gregorio L, Aziz J et al. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. J. Clin. Microbiol 1993; 31: 160-162.
- 354.- Ormand JE, Talley NJ. *H. pylori* controversies and an approach to management. Mayo Clinic Proceedings 1990; 65: 414-426.
- 355.- O'Toole PW, Logan SM, Kostrzynska M, Wadström T, Trust TJ. Isolation and biochemical and molecular analysis of a species specific protein antigen from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. 1991; 173: 505.

- 356.- O'Toole PW, Logan SM, Kostrzynska M, Wadstrom T, Trust TJ. Isolation biochemical and molecular analysis of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. 1992; 173: 505.
- 357.- O'Toole PW, Kostrzynska M, Trust TJ. Non-motile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. Mol. Microbiol. 1994; 14: 691-703.
- 358.- Oudbier JH, Langenberg W, Rauws EAJ, Bruin-Mosch C. Genotypical variation of *Campylobacter pylori* from gastric mucosa. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 559-565.
- 359.- Owen RJ, Beck A. Evaluation of three procedures using a laser densitometer and microcomputer for estimating molecular sizes of restriction endonuclease digest fragments and application to *Campylobacter jejuni* chromosomal DNA. Lett. Appl. Microbiol. 1987; 4: 5-8.
- 360.- Owen RJ, Costas M, Morgan DD, On SLW, Hill LR, Pearson AD, Morgan DR. One dimensional electrophoretic protein fingerprints for identifying and typing *Campylobacter pylori*. En: Gastroduodenal pathology and *Campylobacter pylori*. Megraud F, Lamouliatte H (eds). Elsevier, Amsterdam 1989 a, 95-98.
- 361.- Owen RJ, Costas M, Morgan DD, On SL, Hill LR, Pearson AD, Morgan DR. Strain variation in *Campylobacter pylori* detected by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. Antonie van Leeuwenhoek 1989 b; 55: 253-267.
- 362.- Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting: a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. J. Med. Microbiol. 1989 c; 30: 89-99.
- 363.- Owen RJ, Desai M. Preformed enzyme profiling of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* from human and animal sources. Lett. Appl. Microbiol. 1990 a; 11: 103.
- 364.- Owen RJ, Fraser J, Costas M, Morgan D, Morgan DR. Signature patterns of DNA restriction fragments of *Helicobacter pylori* before and after treatment. J. Clin. Pathol. 1990 b; 43: 646-649.
- 365.- Owen RJ, Bickley J, Moreno M, Costas M, Morgan DR. Biotype and macromolecular profiles of cytotoxin producing strains of *Helicobacter pylori* from antral gastric mucosa. FEMS Microbiol. Lett. 1991 a; 79: 199.
- 366.- Owen RJ, Bickley J, Costas M, Morgan DR. Genomic variation in *Helicobacter pylori*: application to identification of strains. Scand. J. Gastroenterol. 1991 b; 26 (suppl 181): 43-45.

- 367.- Owen RJ, Desai M, Figura N, Bayeli PF, Di-Gregorio L, Russi M, Musmanno RA. Comparisons between degree of histological gastritis and DNA fingerprints, cytotoxicity and adhesivity of *H. pylori* from different gastric sites. Eur. J. Epidemiol. 1993; 9: 315-321.
- 368.- Owen RJ, Bickley J, Hurtado A, Fraser A, Pounder RE. Comparison of PCR based restriction length polymorphism analysis of urease genes with rRNA gene profiling for monitoring *Helicobacter pylori* infections in patients on triple therapy. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1203-1210.
- 369.- Palmer ED. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. Gastroenterol. 1954; 27: 218-220.
- 370.- Papini E, Bernard M, Milia E, Bugnoli M, Zerial M, Rappuoli R, Montecucco C. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 9720-9724.
- 371.- Parasakthi N, Goh KL. Metronidazole resistant among *H. pylori* strains in Malaysia (letter). Am. J. Gastroenterol 1992; 87: 808.
- 372.- Parsonnet JK, Welch K, Compton C, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. Simple microbiologic detection of *Campylobacter pylori*: J. Clin. Microbiol. 1988; 26: 948-949.
- 373.- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N. Engl. J. Med. 1991; 325: 1127-1131.
- 374.- Parsonnet J. *Helicobacter pylori* as a risk factor for gastric cancer. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1993; 5 (suppl 1): S103-107.
- 375.- Patchett S, Beattie S, Leen E, Keane C, O'Mearain C. Eradicating *Helicobacter pylori* and symptoms of non-ulcer dyspepsia. British Med. J. 1991; 303: 1238-1240.
- 376.- Pavicic HJAMP, Namarar F, Verboom T, Van Winkelhoff AJ, Graff J. "In vitro" susceptibility of *Helicobacter pylori* to several antimicrobial combinations. Antimicrob. Agent. Chemother. 1993; 37: 1184-1186.
- 377.- Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 1994; 62: 1557-1565.
- 378.- Pearson AD, Bamforth J, Booth L, Holdstock G, Ireland A, Walker C, Hawtin P, Millward-Sadler H. Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. Lancet 1984; i: 1349-1350.

- 379.- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Cover TL, Atherton JC, Dunn GD, Blaser MJ. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 28-32.
- 380.- Penfold SS, Lastovica AJ, Elisha BG. Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori*. J. Infect. Dis. 1988; 157 (4): 850-851.
- 381.- Pérez-Pérez GI, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. Ann. Intern. Med. 1988; 109: 11-17.
- 382.- Pérez-Pérez GI, Taylor DN, Bodhidatta L, Wongsrichanalai J, Baze WB, Dunn BE, Echevarria PD, Blaser MJ. Seroprevalence of *H. pylori* infections in Thailand. J. Infect. Dis. 1990; 161: 1237-1241.
- 383.- Pershing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 1281.
- 384.- Peterson WL. Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*. Am. J. Gastroenterol. 1992; 87: 1274.
- 385.- Phillips K, Munster DJ, Allardyce RA, Bagshamm PF. Antibacterial action of the urease inhibitor acetohydroxamic acid on *H. pylori*. J. Clin. Pathol. 1993; 46: 372-373.
- 386.- Pinto MM, Meriano FV, Afridi S, Taudin ML. Cytodiagnosis of *Campylobacter pylori* in Papanicolaou-stained imprints of gastric biopsy specimens. Acta Cytol. 1991; 35: 204.
- 387.- Piotrowski J, Morita M, Slomiany A, Slomiany BL. Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *H. pylori* lipopolysaccharide: effect of ebrotidine. Biochem. Int. 1992; 27: 131-138.
- 388.- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters Applied Microbiology 1989; 8: 151-156.
- 389.- Polish LB, Douglas JM Jr, Davidson AJ, Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Characterization of risk factors for *Helicobacter pylori* infection among men attending a sexually transmitted disease clinic: lack of evidence for sexual transmission. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2139.
- 390.- Proujansky R, Shaffer SE, Vinton NE, Bachrach SJ. Symptomatic *Helicobacter pylori* infection in young patients with severe neurologic impairment. J. Paediatr. 1994; 125: 750-752.
- 391.- Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 2378-2379.

- 392.- Quirós A, Quirós E, González I, Bernal MC, Piedrola G, Maroto MC. *Helicobacter pylori* seroepidemiology in risk groups. Eur. J. Epidemiol. 1994; 10: 299-301.
- 393.- Rathbone BJ, Wyatt JL, Worsley BW, Shires SE, Trejdosiewicz LK, Heatley RV, Losowsky MS. Systemic and local antibody response to gastric *Campylobacter pyloridis* in nonulcer dyspepsia. Gut 1986; 27: 642-647.
- 394.- Rathbone BJ, Wyatt JI, Heatley RV. Symptomatology in *C. pylori* positive and *C. pylori* negative non-ulcer dyspepsia. Gut; 1988: A1473.
- 395.- Rautelin H, Kosunen TU. *Helicobacter pylori* and associated gastroduodenal diseases. APMIS 1991; 99: 677-695.
- 396.- Rautelin H, Seppälä K, Renkonen O, Vainio U, Kosunen T. Role of metronidazole resistance in therapy of *H. pylori* infections. Antimicrob. Agent. Chemother. 1992; 36: 163-166.
- 397.- Rautelin H, Tee W, Seppälä K, Kosunen TU. Ribotyping patterns and emergence of metronidazole resistance in paired clinical samples of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1079-1082.
- 398.- Rauws EAJ, Royen EAV, Langenberg W, Woensel JV, Vrij AA, Tytgat CN, ¹⁴C urea breath test in *Campylobacter pylori* gastritis. Gut 1989; 30: 798-803.
- 399.- Rauws EA, Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *H. pylori*. Lancet 1990; 335: 1233-1235.
- 400.- Raymond J, Bergeret M, Benhamou PH, Mensah K, Dupont C. A 2-year study of *Helicobacter pylori* in children. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 461-463.
- 401.- Reifen R, Rasooly I, Drumm B, Milson ME, Murphy K, Sherman P. Symptomatology and demographic features of *Helicobacter pylori* infection in children. Ir. J. Med. Sci. 1992; 161 (10): 25.
- 402.- Rocha GA, Queiroz DMM, Mendes EN, Lage AP, Barbosa AJA. Simple carbolfuchin staining for showing *C. pylori* and other spiral bacteria in gastric mucosa. J. Clin. Pathol 1989; 42: 1004-1005.
- 403.- Romaniuk PJ, Zoltowaska B, Trust TJ. *Campylobacter pyloridis*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter spp.* J. Bacteriol. 1987; 169: 2137-2141.
- 404.- Romero López C, Owen RJ, Banatvala N, Abdi Y, Hardie JM, Davies GR, Feldman R. Comparison of urease gene primer sequences for PCR based amplification assays in identifying the gastric pathogen *H. pylori*. Mol. Cell. Probes. 1993; 7: 439-446.

- 405.- Rollanson TP, Stone J, Rhodas JM. Spiral organisms in endoscopic biopsies of the human stomach. *J. Clin. Pathol.* 1984; 37: 23-26.
- 406.- Roop RM, Smirbert RM, Johnson JL, Krieg NR. Differential characteristics of catalase positive *Campylobacters* correlated with DNA homology groups. *Can. J. Microbiol.* 1984; 30: 938-951.
- 407.- Roosendaal R, Kuipers EI, van den Brule AJC, Pena AS, Uytterlinde AM, Walboomers JMM, Meuwissen SGM, de Graaff J. Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1123-1126.
- 408.- Rubinstein G, Dunkin K, Howard AJ. The susceptibility of *H. pylori* to 12 antimicrobial agents, omeprazole and bismuth salts. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994; 34: 409-413.
- 409.- Salomon H. Ueber das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentrbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 1896; 19: 433-442.
- 410.- Sanz JC, Martín E, Alarcón T, Martínez J, García-Novo MD, López-Brea M. Valoración del punto de corte (cut off) en el diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante una técnica E.I.A. *Enf. Infec. Microb. Clín.* 1993; 11: 55.
- 411.- Sanz JC. Seroepidemiología, diagnóstico y seguimiento serológico postratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Enf. Inf. Microb. Clin.* 1994; 12 (suppl 1): 28-31.
- 412.- Sarosiek J, Slomiany A, Vanhorn K, Zalesne C, Slomiany B L. Lipolytic activity of *C. pylori*. Effect of sofalcones. *Gastroenterol.* 1988; 94: A 399.
- 413.- Sathar MA, Simjee AE, Wittenberg DF, Fernandescosta FJTD, Soni PM, Sharp BL, Miller NM, Naran AD. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Natal/Kwazulu, South Africa. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1994; 6: 37-41.
- 414.- Satoh K, Kimura K, Yoshida Y, Kasano T, Kihira K, Taniguchi Y. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis quantitative assessment of *H. pylori* in the gastric mucosa. *Am. J. Gastroenterol.* 1991; 86: 285.
- 415.- Schauer DB, Handweker J, Correa P, Fox JG. Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water using polymerase chain reaction amplification. *Gut* 1995; 37 (suppl 1): A27.
- 416.- Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 1994; 12: 307-319.

-
- 417.- Shames B, Kraiden S, Fuksa M, Babida C, Penner JL. Evidence for the occurrence of the same strain of *C. pylori* in the stomach and dental plaque. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 2849-2850.
- 418.- Shahamat M, Paszko-kolva C, Mai UEM, Yamamoto H, Colwell RR. Selected cryopreservatives for long term storage of *H. pylori* at low temperatures. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 735-736.
- 419.- Sharma SA, Tummuru MKR, Blaser MJ. Characterization of gastric IL-8 induction by *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89: 1346.
- 420.- Simor AE, Cooter NB, Low DE. Comparison of four stain and a urease test for rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990 a; 9: 350-352.
- 421.- Simor AE, Shames B, Drumm B, Sherman P, Low DE, Penner JL. Typing of *C. pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J. Clin. Microbiol.* 1990 b; 28: 83-86.
- 422.- Sipponen P. Gastric cancer: a long term consequence of *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 1994 a; 29 (suppl 1): 24-27.
- 423.- Sipponen P, Rihela M, Hyvarinen H, Seppala K. Chronic nonatrophic (superficial) gastritis increases the risk of gastric carcinoma. A case-control study. *Scand. J. Gastroenterol.* 1994 b; 29: 336-340.
- 424.- Skipper R, DeStephann DB. A rapid stain for *Campylobacter pylori* in gastrointestinal tissue sections using Diff-Quik. *J. Histotechnol.* 1989; 12: 303.
- 425.- Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a new disease. *British Med. J.* 1977; ii: 9-11.
- 426.- Skirrow MB. De *Campylobacter* a *Helicobacter*. *Enf. Inf. Microb. Clin.* 1994; 12 (suppl 1): 2-5.
- 427.- Slater B. Superior stain for *Helicobacter pylori* using toluidine O. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43: 961.
- 428.- Slomiany BL, Bilski J, Sarosiek J, Murty VLN, Dworkin B, Van Horn K, Zielenski J, Slomiany A. *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 144: 307-314.
- 429.- Slomiany BL, Slomiany A. Role of mucus in gastric mucosal protection. *J. Physiol. Pharmacol.* 1991; 42: 149-163.

- 430.- Slomiany BL, Piotrowsky J, Slomiany A. Effect of Sulcraifate on the degradation of human gastric mucus by *H. pylori* proteases and lipases. Am. J. Gastroenterol. 1992 a; 87: 595-599.
- 431.- Slomiany BL, Piotrowski J, Mojtahed H, Slomiany A. Ebrotidine effect on the proteolytic and lipolytic activities of *H. pylori*. Gen. Pharma. 1992 b; 23: 203-206.
- 432.- Smith AW, Chadal B, French GL. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 1994; 13: 153-160.
- 433.- Sobala G, Dixon MF, Axon ATR. *C. pylori* is not associated with a distinct dyspeptic syndrome. Gut 1989; 30: A733.
- 434.- Sobala GM, Crabtree JE, Pentith JA, Rathbone BJ, Shallcross TM, Wyatt JL, Dixon MF, Heatley RV, Axon AT. Screening dyspepsia by serology to *H. pylori*. Lancet 1991; 338: 94-96.
- 435.- Spiegelhader C, Gerstenecker B, Kersten A, Schiltz E, Kist M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. Infect. Immun. 1993; 61: 5315-5325.
- 436.- Stanley J, Moreno MJ, Jones C, Owen RJ. Molecular typing of *Helicobacter pylori* by chromosomal and plasmid DNA organization. Mol. Cell. Prob. 1992; 6: 305-312.
- 437.- Steer HW, Colin-Jones DG. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. Gut 1975; 16: 590-597.
- 438.- Stolte M, Eidt S, Ohnsmann A. Differences in *H. pylori* associated gastritis in the antrum and body of the stomach. Gastroenterol. 1990; 28: 229.
- 439.- Stolte M, Eidt S. Healing gastric MALT lymphomas by eradicating *H. pylori*?. Lancet 1993; 342: 568.
- 440.- Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals?. Scand. J. Gastroenterol. 1994; 29: 1061-1064.
- 441.- Stone JW, Wise R, Donovan A, Gearty J. Failure of ciprofloxacin to eradicate *C. pylori* from the stomach. J. Antimicrob. Chemother. 1988; 22: 92.
- 442.- Suerbaum S, Leying H, Klemm K, Opferkuch W. Antibacterial activity of pantoprazole and omeprazole against *Helicobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991; 10: 92-93.

- 443.- Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA* and *flaB* negative mutants by electroporation mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 3278-3288.
- 444.- Suerbham S, Thiberge JM, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* *hspA-hspB* heat shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol. Microbiol.* 1994; 14: 959-974.
- 445.- Suerbaum S, Wadström T. Bacterial pathogenic factors. *Curr. Op. Gastroenterol.* 1995; 11 (suppl1): 11-15.
- 446.- Svedhem A, Kaijser B, Sjogren E. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from humans with diarrhoea and from healthy chickens. *J. Antimicrob. Chemother* 1991; 7: 301-305.
- 447.- Swaminathau B, Matar GM. Molecular typing methods. En: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Persing DH, Smith TF, YTenover FC, White TJ (eds). ASM, Washington 1993. p.26-50.
- 448.- Takami S, Hayashi T, Akashi H, Shimoyama T, Tamura T. Genetic heterogeneity of *Helicobacter pylori* by pulsed field gel electrophoresis and re-evaluation of DNA homology. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1994; 6 (suppl 1): 553-556.
- 449.- Talley NJ, Newell DG, Ormand JE, Carpenter HA, Wilson Wr, Zinsmeister AR, Pérez-Pérez G, Blaser MJ. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* comparison of enzyme-linked immunoabsbent assays. *J. Clin. Microbiol* 1991; 29: 1635-1639.
- 450.- Talley NJ, Noack KB. The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori*: asymptomatic infection and clinical states associated with infection in adults. En: *Helicobacter pylori: Biology and Clinical Practice*. Goodwin CS and Worsley BW (eds). CRC Press Florida. 1993. p. 63-83.
- 451.- Taylor DE, Simons M, Chang N, Salama S. Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates by pulsed-field gel electrophoresis of genome DNA. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 1991; 4: S 172.
- 452.- Taylor DE. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1992 a; 46: 35-64.
- 453.- Taylor DE, Eaton M, Chang N, Salama SSM. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J. Bacteriolog.* 1992 b; 174 (21): 6800-6806.

- 454.- Tee W, Fairley S, Smallwood R, Dwyer B. Comparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. J. Clin. Microbiol 1991; 29: 2587-2589.
- 455.- Tee W, Lambert J, Smallwood R, Schembri M, Ross BC, Dwyer B. Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 1992; 30 (6): 1562-1567.
- 456.- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J. Exp. Med. 1994 a; 179: 1653-1658.
- 457.- Telford JL, Covacci A, Ghiara P, Montecucco C, Rappuoli R. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer potential for new therapies and vaccines. Trends Biotechnol. 1994 b; 12: 420-426.
- 458.- Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *H. pylori* from human faeces. Lancet 1992; 340: 1194-1195.
- 459.- Thomas JE. Epidemiología de las infecciones por *Helicobacter pylori*. Enf. Inf. Microbi. Clin. 1994; 12 (suppl 1): 6-13.
- 460.- Thomas DRH, Salmon RL, Meadows D, Morgan-Capner F, Kench SM, Coleman TJ. Incidence of *Helicobacter pylori* in farmworkers and the role of zoonotic spread. Gut 1995; 37 (suppl 1): A24.
- 461.- Thomson MA, Storey P, Greer R, Cleghorn GJ. Canine human transmission of *Gastrospiralum hominis*. Lancet 1994; 343: 1605-1607.
- 462.- Tjia TN, Harper WES, Goodwin CS, Grubb WB. Plasmids in *C. pyloridis*. Microb. Lett. 1987; 36: 7-11.
- 463.- Tomkins DS, West AP. *C. pylori* acid and bile. J. Clin. Pathol 1987; 40: 1387.
- 464.- Tonokatsu Y, Hayashi T, Fukuda Y, Tamura T, Shimoyama T. A clinico epidemiological analysis of *Helicobacter pylori* by Southern blotting with a urease gene probe. J. Gastroenterol. 1994; 29: 120-124.
- 465.- Trinel PA, Vincent P, Izard D, Leclerc H. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of whole cell proteins of *Campylobacter pylori*: epidemiological interest. En: Gastrointestinal pathology and *Campylobacter pylori*. Megraud F, Lamouliatte H. (eds). Elsevier, Amsterdam, 1989, 95-98.
- 466.- Trowell JE, Yoong AKH, Saul KJ, Gant PW, Bell GD. Simple half-Gram stain for showing presence of *Campylobacter pyloridis* in sections. J. Clin. Pathol. 1987; 40: 702.

- 467.- Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. A urease negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun* 1994; 62: 3586-3589.
- 468.- Tucci A, Varoli O, Corinaldesi R, Stanghellini V, Gasperoni S, Paparo GF, Ricci-Maccarini M, Laplaca M, Barbara L. Evaluation of *H. pylori* sensitivity to amoxicillin and metronidazole in dyspeptic patients. *Ital. J. Gastroenterol.* 1993; 25: 65-67.
- 469.- Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Mutation of the cytotoxin associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun* 1994; 62: 2609-2613.
- 470.- Tytgat DNJ, Langenberg ML, Raws EAJ, Noach LA. *H. pylori* infection and duodenal ulcer. *British Med. J.* 1991; 302: 1534.
- 471.- Tytgat DNJ, van der Hulst RWM. Important acquisitions in *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Op. Gastroenterol.* 1995; 11 (suppl 1): 57-60.
- 472.- Vaira D, D'Anastasio C, Holton J, Dowsett JF, Londei M, Bertoni F, Beltrandi E, Granuenfels P, Salmon PR, Gandolfi L. *Campylobacter pylori* in abattoir workers: is it a zoonosis?. *Lancet* 1988 a; 2: 275.
- 473.- Vaira D, Holton J, Cairns S et al. Urease tests for *Campylobacter pylori*: care in interpretation: *J. Clin. Pathol.* 1988 b; 41: 812-813.
- 474.- Vaira D, Holton J, Cairns S, Falzon M, Salmon PR. Four hour rapid urease test (RUT) for detecting *Campylobacter pylori*: is it reliable enough to start treatment?. *J. Clin. Pathol.* 1988 c; 41: 355-356.
- 475.- Valentine JL, Arthur RR, Mobley HLT, Dick JD. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 689-695.
- 476.- Valle I, Seppala K, Sipponen P, Kosunen T. Disappearance of gastritis after eradication of *H. pylori*. A morphometric study. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991; 26: 1057-1065.
- 477.- Van Caekenberghe DL, Breysens J. "In vitro" synergistic activity between bismuth subcitrate and various antimicrobial agents *Campylobacter pyloridis* (*C. pylori*). *Antimicrob. Agent. Chemother.* 1987; 31: 1429-1430.
- 478.- Van Den Berg FM, Zjilmans H, Langerberg W, Rauws E, Schipper M. Detection of *Campylobacter pylori* in stomach tissue by DNA "in situ" hybridisation. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 995-1000.

- 479.- Van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AMD, Schirm J, Snijder JAM. Sensitivity of culture compared with that of PCR for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1918-1920.
- 480.- Van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AMD, Schirm J, Snijder JAM. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1346-1348.
- 481.- Veenendaal RA, Pena AS, Meijer JL, Endtz HP, van der Est MM, van Duijn W, Eulerink F, Kreuning J, Lamers CB. Long term serological surveillance after treatment of *Helicobacter pylori* infection. Gut 1991; 32: 1291-1294.
- 482.- Veldhuyzen van Zanten SQJ, Pollak PT, Best LM, Bezanson GS, Marrie T. Increasing prevalence of *Helicobacter pylori* infection with age: continuous risk of infection in adults rather than cohort effect. J. Infect. Dis. 1994; 169: 434-437.
- 483.- Vincent P, Gottrand F, Pernes P, Husson MO, Lecompte-Houcke M, Turk D, Leclerc H. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. Gut 1994; 35: 313-316.
- 484.- Von Wulffen H, Heesemann J, Bützow GH, Löning T, Laufs R. Detection of *Campylobacter pyloridis* in patients with antrum gastritis and peptic ulcers by culture, complement fixation test and immunoblot. J. Clin. Microbiol 1986; 24: 716-720.
- 485.- Wadstrom T, Guruge JL, Wei S, Atefjung P, Ljungh A. *Helicobacter pylori* hemagglutinins possible gut mucosa adhesins. En: *Helicobacter pylori*, Gastritis and peptic ulcer. Malfertheiner P, Ditschuneit H, (eds). Springer-Verlag, Heidelberg. 1990, 96.
- 486.- Wagner S, Beil W, Mai UEH, Bokemeyer C, Manns MP. Interaction between *Helicobacter pylori* and human gastric epithelial cells in culture: effect of antiulcer drugs. Pharmacol. 1994; 49: 226-237.
- 487.- Wang JT, Jin JT, Shan JC, Yang JC, Chen DS, Wang TH. Detection of *H. pylori* in gastric biopsy tissue by PCR. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12: 367-371.
- 488.- Warren J, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; i: 1273-1275.
- 489.- Webb PM; Knight T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, Forman D. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood evidence from person to person transmission in early life. British Med. J. 1994 a; 308: 750-753.

- 490.- Webb D, Ciociola A, Graham D. Use of oral GR122311X (ranitidine bismuth citrate) with antibiotics in the healing and prevention of duodenal ulcer relapse and eradication of *H. pylori*. Am. J. Gastroenterol. 1994 b; 89: 1390.
- 491.- Weiss J, Mecca J, da Silva E, Gassner D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1663-1668.
- 492.- West AP, Millar MR, Tompkins DS. Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. J. Clin. Pathol. 1990; 43: 609.
- 493.- Westblom TU, Madan E, Kemp J, Subik MA. Evaluation of a rapid urease test to detect *Campylobacter pylori* infection. J. Clin. Microbiol. 1988 a; 26: 1393-1394.
- 494.- Westblom TU, Madan E, Kemp J, Subik MA, Tseng J. Improved visualization of mucus penetration by *Campylobacter pylori* using Brown-Hopps stain. J. Clin. Pathol. 1988 b; 41: 232.
- 495.- Westblom TU, Madan E, Middkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 1991 a; 29: 819-821.
- 496.- Westblom TU, Phadnis S, Normark S. Polymerase chain reaction for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol. 1991 b; 100: A625.
- 497.- Westblom TU, Phadnis S, Normark S, Czinn SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric juice aspirates using polymerase chain reaction. Ital. J. Gastroenterol. 1991 c; 23 (suppl 2): 35.
- 498.- Westblom T, Fritz S, Phadnis S, Midkiff B, Leon-Barau R, Recaverren S, Ramirez-Ramos A, Gilman R. PCR analysis of peruvian sewage water: support for fecal-oral spread of *Helicobacter pylori*. Act. Gastroenterol. Belgica. 1993 a; 6 (suppl 1): 47.
- 499.- Westblom TU, Phadnis S, Yang P, Czinn SJ. Diagnosis of *H. pylori* infection by means of a PCR reaction assay for gastric juice aspirates. Clin. Infect. Dis. 1993 b; 16: 367-371.
- 500.- Wetherall BL, McDonald PJ, Johnson AM. Detection of *Campylobacter pylori* DNA by hybridization with non-radioactive probes in comparison with a ³²P-labelled probe. J. Med. Microbiol. 1988; 26: 257-263.
- 501.- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. En: Current protocols in Molecular Biology. Ausebel R, Brent RE, Kingston DD, Moore JG, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). Greene publishing and Wiley-Interscience, New York. 1987, p.2.4.1.-2.4.5.

- 502.- Workshop of the European *Helicobacter pylori* Study Group. Am. J. Gastroenterol. 1994; 89: 1317-1321
- 503.- Wotherspoon AC, Ortiz Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 1991; 338: 1175-1176.
- 504.- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, DE Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993; 342: 571-574.
- 505.- Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage?. A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J. Pathol. 1990; 162: 99.
- 506.- Xia HX, Keane CT, Chen J, Zhang J, Walsh EJ, Moran AP, Hua JS, Megraud F, O'Morain CA. Transportation of *Helicobacter pylori* cultures by optimal systems. J. Clin. Microbiol. 1994 a; 32: 3075-3077.
- 507.- Xia HX, Keane CT, O'Morain CA. Culture of *Helicobacter pylori* under aerobic conditions on solid media. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994 b; 13: 406-412.
- 508.- Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect. Immun. 1995; 63: 94-98.
- 509.- Yamada T, Ahnen D, Alpers DH, Greenberg HB, Gray L, Joscelyn KB, Kauffman G, Podolsky DK, Ray WA, Schaberg D et al. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1994; 272: 65-69.
- 510.- Yeung CK, Fu KH, Yuen KY, NG WF, Tsang TM, Branicki FJ, Saing H. *Helicobacter pylori* and associated duodenal ulcer. Arch. Dis. Child. 1990; 65: 1212.
- 511.- Yoshimura HH, Evans DG, Graham DY. DNA-DNA hybridization demonstrates apparent genetic differences between *H. pylori* from patients with duodenal ulcer and asymptomatic gastritis. Dig. Dis. Sci. 1993; 38: 1128-1131.
- 512.- Zhong Y, Xiancun Z, Hong Y, Shengyi J. Rapid diagnosis of *Campylobacter pylori* infection by urea test paper. J. Gastroenterol. Hepatol. 1990; 5: 514.