

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia,
de Medicina Preventiva i Salut Pública
Facultat de Medicina

**APLICACIÓ DE LES NOVES TÈCNIQUES DE
BIOLOGIA MOLECULAR (REAL-TIME PCR) PEL
DIAGNÒSTIC DE PATOLOGIA INFECCIOSA DEL
TRACTE GASTRO-INTESTINAL EN PEDIATRIA**

TESI DOCTORAL

MONTSE MONTRAVETA QUEROL

Per optar al grau de Doctor en Medicina per la Universitat
Autònoma de Barcelona

DIRECTORS

DR. CARLOS RODRIGO GONZALO DE LIRIA

DRA. GEMA FERNÁNDEZ RIVAS

DRA. SÒNIA MOLINOS ABÓS

TUTOR

DR. CARLOS RODRIGO GONZALO DE LIRIA

Barcelona, novembre 2023

A vegades el millor remei, és no fer res

Hipòcrates

ABREVIACIONS

ACG	American College of Gastroenterology
AEP	Asociación Española de Pediatría
AINES	Antiinflamatoris No Esteroidals
BabA	Blood antigen binding adhesion
CDC	Central Disease Control
cDNA	Àcid Desoxiribonuclueic complementari
CEACAM	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule
CLA	Claritromicina
CO₂	Diòxid de Carboni
CPG	Cèl·lula Parietal Gàstrica
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Àcid Desoxiribonucleic
EIA	Enzima Immunoassaig
EMA	Agència Europea del Medicament
EMA	European Medicines Agency
ESPGHAN	European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
E-Test	<i>Epsilon</i> - Test
FDA	Food and Drug Administration
FGS	Fibrogastroscoopia
FlaA	Flagelina A
FlaB	Flagelina B
GGT	Gamma-Glutamil Transferassa
H&E	Hematoxilina&Eosina
HCl	Àcid Clorhídric
HCO₃	Bicarbonat

HDA	Hemorràgia Digestiva Alta
Hp-EuReg	<i>Helicobacter Pylori</i> European Register
IBP	Inhibidor de Bomba de Protons
IC	Interval de confiança
ICA	Immunocromatografia
IgG	Immunoglobulina G
IHQ	Immunohistoquímica
IL	Interleucina
LEVO	Levofloxacino
LPS	Lipopolissacàrid
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MTZ	Metronidazol
NASPGHAN	North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
NGS	Next Generation Sequencing
NH3	Amoníac
O&P	Òvuls i paràsits
OR	Odds Ratio
PBP_s	Penicilline Binding Proteins
P-CAPs	Potassium-competitive acid blockers
PCR	Polymerase Chain Reaction
PME	Proteïnes de Membrana Externa
PTI_c	Púrpura Trombocitopènica Idiopàtica Crònica
RBU	Rifabutina
RNA	Àcid Ribonucleic
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RUT	Rapid Ureasa test
SabA	Sialic acid binding adhesion
SAT	Stool Antigen Test
SCP	Societat Catalana de Pediatria

SEGHNP	Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica
SMS	Somatostatina
SNC	Sistema Nervios Central
TFT	Triple Fecal Test
Th1	Cèl·lules T helper 1
TIP	Transmembrana Receptors
TLRs	Toll-like-receptors
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VacA	Citotoxina Vacuolitzant
VEGF	Proteïna de creixement vascular endotelial
WHO	World Health Organization

INDEX DE FIGURES

Figura 1	Amplificació de fragment del DNA de forma exponencial	25
Figura 2	Procés de la RT-PCR	27
Figura 3	Comparació dels panells múltiple	30
Figura 4	Distribució de la <i>Dientamoeba fragilis</i> .	33
Figura 5	Distribució per sexes i franges d'edat de la <i>Dientamoeba fragilis</i>	34
Figura 6	Formes de esquematitzats de <i>Dientamoeba fragilis</i>	35
Figura 7	Formes <i>Dientamoeba fragilis</i> per tinció amb hematoxilina fèrrica	35
Figura 8	Cicle vital <i>Dientamoeba fragilis</i>	37
Figura 9	Prevalença mundial de l' <i>Helicobacter pylori</i>	44
Figura 10	Prevalença de l' <i>Helicobacter pylori</i> en els sis continents	45
Figura 11	Prevalença de l' <i>Helicobacter pylori</i> per grups d'edat en els sis continents	46
Figura 12	Infecció per l' <i>Helicobacter pylori</i> i patogènesis	56
Figura 13	Escala visual de Sydney System	64
Figura 14	Mecanisme d'acció de Claritromicina i Levofloxacino	70
Figura 15	Mecanismes de resistència de l' <i>Helicobacter pylori</i> a metronidazol.	72
Figura 16	Línia del temps en la recerca de la infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	84
Figura 17	Workflow de l'estudi parasitològic de la <i>Dientamoeba fragilis</i>	102
Figura 18	Test de la ureasa (CLOtest®)	106
Figura 19	WorKflow del diagnòstic de la infecció <i>Helicobacter pylori</i>	107
Figura 20	Distribució raça/ètnia en el grup cas estudi <i>Dientamoeba fragilis</i>	111
Figura 21	Distribució raça/ètnia en el grup control estudi <i>Dientamoeba fragilis</i>	112

Figura 22	Simptomatologia dels pacients del grup cas <i>Dientamoeba fragilis</i>	112
Figura 23	Distribució raça/ètnia estudi <i>Helicobacter pylori</i>	115
Figura 24	Simptomatologia dels pacients de l'estudi <i>Helicobacter pylori</i>	116
Figura 25	Troballes macroscòpiques en la FGS	116
Figura 26	Resultat test ràpid de la ureasa en mucosa gàstrica	117
Figura 27	Resultat anatomia patològica de les biòpsies d'antre gàstric	118
Figura 28	Detecció <i>Helicobacter pylori</i> per tècniques histològiques	119
Figura 29	PCR <i>Helicobacter pylori</i> en el total de mostres processades	120
Figura 30	PCR <i>Helicobacter pylori</i> en les mostres vàlides	120
Figura 31	Identificació de la mutació A2143G	121
Figura 32	Tractament de primera línia en la infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	121
Figura 33	Resultat de SAT post tractament erradicador <i>Helicobacter pylori</i>	122
Figura 34	Evolució de la simptomatologia post tractament erradicador	123
Figura 35	Associacions analitzades en relació a la FGS	124
Figura 36	FGS i PCR <i>Helicobacter pylori</i> en mucosa gàstrica	127
Figura 37	Clínica i identificació <i>Helicobacter pylori</i> per tècniques histològiques	129
Figura 38	<i>H. pylori</i> per H&E i/o IHQ i tractament previ	130
Figura 39	CLOtest® i <i>Helicobacter pylori</i> per IHQ o H&E	131
Figura 40	Histologia <i>Helicobacter pylori</i> i PCR en mucosa gàstrica.	132
Figura 41	SAT i PCR <i>Helicobacter pylori</i> en mucosa gàstrica	133
Figura 42	PCR <i>Helicobacter pylori</i> en mucosa gàstrica i CLOtest	133
Figura 43	Tractament prescrit <i>Helicobacter pylori</i> i SAT post-tractament	134
Figura 44	Mutació A2143G i SAT post-tractament	135

INDEX DE TAULES

Taula 1	Taula comparativa de les diferents tècniques de PCR	28
Taula 2	Prevalença de la infecció per <i>Dientamoeba fragilis</i>	32
Taula 3	Prevalença de les infeccions parasitàries més freqüents	33
Taula 4	Comparació de les diferents tècniques diagnòstiques <i>Dientamoeba fragilis</i>	42
Taula 5	Dosis d'antiparasitaris recomanats	43
Taula 6	Mecanisme d'acció de les proteïnes de membrana externa <i>Helicobacter pylori</i>	52
Taula 7	Resum dels factors de virulència de l' <i>Helicobacter pylori</i>	55
Taula 8	Update Sydney Classification per la gastritis crònica	64
Taula 9	Comparativa tinció d'hematoxicilina-eosina i immunohistoquímica	66
Taula 10	Mètodes diagnòstics invasius i no invasius per detecció <i>Helicobacter pylori</i>	74
Taula 11	Distribució dels fenotips de la CYP2c19 segons les diferents ètnies	78
Taula 12	Propietats farmacocinètiques dels IBP	78
Taula 13	Tractaments d' <i>Helicobacter pylori</i> recomanats en població adulta	81
Taula 14	Tractament de primera línia basat en resultat de cultiu <i>Helicobacter pylori</i>	82
Taula 15	Dosis estàndard de tractament <i>Helicobacter Pylori</i> en pediatria	82
Taula 16	Símptomes i presència de <i>Dientamoeba fragilis</i>	113
Taula 17	Resultat PCR <i>Dientamoeba fragilis</i> del grup cas i grup control	113
Taula 18	FGS i gènere en la infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	124
Taula 19	Símptomes i identificació d' <i>Helicobacter pylori</i>	125
Taula 20	Test ràpid de la ureasa i troballes endoscòpiques	125

Taula 21	Troballes endoscòpiques i la presència d'alteració en l'anatomia patològica	126
Taula 22	Identificació <i>Helicobacter pylori</i> per tècniques histològiques i la FGS	127
Taula 23	Mutació A2143G i alteració endoscòpica	128
Taula 24	Erradicació <i>Helicobacter pylori</i> i alteració endoscòpica	128

RESUM

En els darrers anys les tècniques de diagnòstic de les malalties infeccioses han realitzat un pas de gegant i han permès la identificació de microorganismes que abans amb les eines convencionals no es detectaven. Aquest augment en la detecció de determinades infeccions ha portat a un increment de la prescripció d'antimicrobians que en algunes ocasions el seu benefici ha estat posat en dubte. Aquest és el cas de dues de les infeccions més prevalents en pediatria: La infecció per *Dientamoeba fragilis* i la infecció per *Helicobacter pylori*. Ambdues infeccions sovint no es detecten amb els mètodes microbiològics convencionals, sent necessari les tècniques de biologia molecular, com la Real-time PCR per arribar al diagnòstic. Aquesta tesi compara la sensibilitat dels mètodes convencionals amb la Real-time PCR, mostrant en les dues infeccions una sensibilitat molt superior per aquesta última. Per una altra part, la detecció de DNA microbià permet la identificació de resistències antibiòtiques, fet que facilita la prescripció de tractaments dirigits i individualitzats a cada àrea geogràfica. En el cas de *Helicobacter pylori* hem detectat una resistència a la claritromicina del 40%, motiu pel qual, en la nostra àrea es desaconsellaria el seu ús com a tractament empíric. Un segon objectiu del nostre estudi, és demostrar la causalitat de la simptomatologia digestiva i la detecció del microorganisme. Aquesta correlació sí que l'hem trobat en el cas de la infecció per *H. pylori*, però no en el cas de la *D. fragilis*, fet que ens fa plantejar el seu poder patògen real i per tant la necessitat del seu tractament. L'ús racional dels antimicrobians, conèixer el poder patògen real de certs microorganismes, saber quan és necessari el seu tractament juntament amb l'estudi de patrons de sensibilitat en les diferents àrees geogràfiques del nostre país, és bàsic per aconseguir una política antibiòtica que permeti la reducció de futures resistències, un dels problemes mèdics més greu de les pròximes dècades.

RESUMEN

En los últimos años, las técnicas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas han dado un salto gigante y han permitido la identificación de microorganismos que anteriormente no se detectaban con las herramientas convencionales. Este aumento en la detección de ciertas infecciones ha llevado a un aumento en la prescripción de antimicrobianos, cuyos beneficios en ocasiones se han puesto en duda. Este es el caso de dos de las infecciones más prevalentes en pediatría: la infección por *Dientamoeba fragilis* y la infección por *Helicobacter pylori*. A menudo, estas infecciones no se detectan con los métodos microbiológicos convencionales, siendo necesario el uso de técnicas de biología molecular, como la PCR en tiempo real, para llegar al diagnóstico. Esta tesis compara la sensibilidad de los métodos convencionales con la PCR en tiempo real, mostrando en ambas infecciones una sensibilidad mucho mayor para esta última. Por otro lado, la detección del ADN microbiano permite la identificación de resistencias antibióticas, lo que facilita la prescripción de tratamientos dirigidos e individualizados para cada área geográfica. En el caso de la infección *Helicobacter pylori*, en nuestra población, hemos detectado una resistencia a la claritromicina del 40%, razón por la cual sería aconsejable evitar su uso como tratamiento empírico. Un segundo objetivo de nuestro estudio es demostrar la causalidad entre los síntomas digestivos y la detección del microorganismo. Esta correlación la hemos podido demostrar en el caso de la infección por *H. pylori*, pero no en el caso de *D. fragilis*, lo que nos hace cuestionar su verdadero poder patógeno y la necesidad de su tratamiento. El uso racional de los antimicrobianos, conocer la patogenicidad real de determinados organismos y saber cuando es necesario su tratamiento, junto con el estudio de los patrones de sensibilidad en las diferentes áreas geográficas de nuestro país, son fundamentales para lograr una política antibiótica que permita la reducción de futuras resistencias, uno de los problemas médicos más graves en las próximas décadas.

SUMMARY

In recent years, diagnostic techniques for infectious diseases have taken a giant leap forward, enabling the identification of microorganisms that were previously undetectable with conventional tools. This increase in the detection of certain infections has led to a rise in the prescription of antimicrobials, the benefits of which have sometimes been questioned. This is the case for two of the most prevalent infections in pediatrics: *Dientamoeba fragilis* infection and *Helicobacter pylori* infection. Often, these infections are not detected using conventional microbiological methods, necessitating the use of molecular biology techniques, such as real-time PCR, to reach a diagnosis. This thesis compares the sensitivity of conventional methods with real-time PCR, demonstrating a much higher sensitivity for the latter in both infections. Additionally, the detection of microbial DNA allows the identification of antibiotic resistances, facilitating the prescription of targeted and individualized treatments for each geographical area. In our population, we have detected a 40% resistance to clarithromycin, which is why we discourage the empirical use of clarithromycin for *Helicobacter pylori* treatment in our area. A second objective of our study is to demonstrate the causality between digestive symptoms and infection detection. We have been able to establish this correlation in the case of *H. pylori* infection but not in the case of *D. fragilis*, leading us to question its true pathogenic power and the need for its treatment. Rational use of antimicrobials and the study of sensitivity patterns in different geographical areas are essential to establish an antibiotic policy that allows for the reduction of future resistances.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	23
1.1. Tècniques microbiològiques pel diagnòstic de patologia infecciosa	23
1.1.1. Tècniques de biologia molecular.....	23
1.1.1.1. Reacció en cadena polimerasa (PCR)	24
1.1.1.2. PCR en temps real (<i>Real-time</i> PCR)	26
1.1.1.3. PCR amb transcriptasa inversa (RT-PCR).....	26
1.1.1.4. Tècniques de seqüenciació del genoma.....	27
1.1.2. Diferències entre la PCR convencional, la PCR en temps real i la RT-PCR.....	28
1.2. Aplicació de la PCR i de la Real-Time PCR en el diagnòstic de patologia infecciosa del tracte digestiu en pediatria.....	29
1.2.1. Infecció per <i>Dientamoeba fragilis</i>	31
1.2.1.1. Epidemiologia.....	31
1.2.1.2. Morfologia i cicle vital	34
1.2.1.3. Mecanismes de transmissió	37
1.2.1.4. Clínica	39
1.2.1.5. Diagnòstic.....	40
1.2.1.6. Tractament.....	42
1.2.2. Infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	43
1.2.2.1. Epidemiologia.....	43

1.2.2.2. Factors associats a la infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	47
1.2.2.3. Fisiopatologia i factors de virulència	49
1.2.2.4. <i>Helicobacter pylori</i> i microbioma	56
1.2.2.5. Clínica	57
1.2.2.6. Diagnòstic.....	60
1.2.2.7. Tractament.....	75
1.2.2.8. <i>Helicobacter pylori</i> i vacuna	85
2. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.....	89
3. OBJECTIUS I HIPÒTESI DE TREBALL	93
3.1. Objectius en la infecció per <i>Dientamoeba fragilis</i>	93
3.2. Objectius en la infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	93
4. APROVACIÓ DEL COMITÈ D'ÈTICA.....	92
5. MATERIALS I MÈTODES.....	101
5.1. Infecció per <i>Dientamoeba fragilis</i>	101
5.1.1. Població de pacients.....	101
5.1.2. Metodologia del processament de mostres	101
5.1.3. Recopilació de dades	103
5.1. . Anàlisi estadístic.....	103
5.2. Infecció per <i>Helicobacter pylori</i>	103
5.2.1. Població de pacients.....	103
5.2.2. Metodologia del processament de les mostres.....	104
5.2.3. Recopilació de les dades	107
5.2.4. Anàlisi estadístic	108

6. RESULTATS	111
6.1. Resultats <i>Dientamoeba fragilis</i>	111
6.2. Resultats <i>Helicobacter pylori</i>	114
6.2.1. Anàlisi descriptiva.....	114
6.2.2. Anàlisi estadística	123
6.2.2.1. Anàlisi comparatiu en relació a les troballes de la FGS	123
6.2.2.2. Anàlisi comparatiu en relació la identificació de <i>Helicobacter pylori</i> per histologia (H&E o IHQ).....	129
6.2.2.3. Anàlisi comparatiu en relació a la PCR en mucosa gàstrica	132
6.2.2.4. Anàlisi comparatiu en relació l'erradicació de l' <i>Helicobacter pylori</i>	134
7. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS.....	139
7.1. Discussió de l'estudi de <i>Dientamoeba fragilis</i>	139
7.2. Discussió de l'estudi d'<i>Helicobacter pylori</i>	143
7.3. Discussió conjunta.....	148
8. CONCLUSIONS.....	153
9. ANNEXOS.....	157
9.1. Annex 1	157
9.1.1. Enquesta a Gastroenteròlegs Pediàtrics de la Societat Catalana de Pediatria).	157
9.1.1.1. Resultats.....	157
9.1.2. Enquesta als pediatres d'Atenció Primària de la Regió Metropolitana Nord de Barcelona	159

9.1.2.1. Resultats.....	159
9.2. Annex 2	161
9.2.1. Aprovació Comitè Ètica estudi <i>Dientamoeba fragilis</i>	161
9.2.2. Aprovació Comitè Ètica estudi <i>Helicobacter pylori</i>	164
9.3. Annex 3	166
9.3.1. Publicació article: <i>Should Dientamoeba fragilis be looked for in pediatric digestive pathology of an unknown cause? A proposed pilot case-control study</i>	166
10. BIBLIOGRAFIA.....	175
11. AGRAÏMENTS	199

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. TÈCNiques MICROBIOLÒGIQUES PEL DIAGNÒSTIC DE PATOLOGIA INFECCIOSA

En els darrers anys les tècniques de diagnòstic de les malalties infeccioses han realitzat un pas de gegant i han permès la identificació de gèrmens que amb les eines convencionals no es detectaven. Fins no fa gaire anys el diagnòstic de la major part de les infeccions bacterianes i parasitàries depenien del cultiu i de les tècniques de tinció. Poc a poc s'ha anat avançant i s'han anat introduint noves tecnologies que permeten un augment de la sensibilitat, una major especificitat, millor valor predictiu positiu i negatiu i sobretot més rapidesa en la identificació dels agents responsables. Aquesta millora ha tingut un impacte transcendent en l'evolució dels pacients, ja que ha permès la realització de tractaments antibiòtics dirigits, millorant l'evolució alhora que han reduït les taxes de resistència a fàrmacs, associades a l'empirisme.

1.1.1. Tècniques de biologia molecular

La tècnica de la reacció en cadena polimerasa (PCR per les seves sigles en anglès) va ser desenvolupada l'any 1986 per Kary Mullis (1) i es considera una de les fites científiques més importants de les darreres dècades. En l'actualitat és una eina fonamental en el camp de la medicina i la seva introducció ha suposat un gran avenç en la microbiologia clínica. La tècnica de PCR es basa en la cerca i el reconeixement del genoma del microorganisme. L'avantatge principal és la seva capacitat de detectar els gèrmens sense la necessitat de que aquests siguin viables. Tot i així cal tenir en compte que un transport o un emmagatzematge no òptim pot disminuir la seva sensibilitat, igual que passa amb altres mètodes microbiològics. Es una tècnica que es pot automatitzar gairebé al 100% amb inclusió de controls d'amplificació, que permeten validar els resultats amb seguretat alhora que permet la detecció de un o varis microorganismes en una sola reacció (uniplex versus múltiplex) que ja existeixen comercialitzats i amb marca CE

(Comunitat Europea). Les tècniques de biologia molecular serveixen per analitzar els àcids nucleics, per detectar i per identificar els microorganismes alhora que també permeten la diferenciació de genotips d'una mateixa espècie així com també la determinació de gens de resistència a fàrmacs. Totes aquestes tècniques requereixen una extracció prèvia de DNA o RNA. Aquest punt és clau en tot el procés ja que cal obtenir unes mostres amb material genètic purificat. En general, s'utilitzen assaigs comercialitzats que inclouen el seu protocol específic del procés d'extracció per minimitzar errors. Els mètodes d'extracció de material genètic necessiten primer de la lisis cel·lular, seguit de la inactivació de les nucleases cel·lulars i finalment es procedeix a la separació dels àcids nucleics. Un cop s'ha obtingut l'àcid nucleic, es realitzarà la tècnica òptima pel seu estudi (2). Des de les primeres PCRs realitzades fins l'actualitat, aquesta tecnologia ha evolucionat considerablement, donant lloc a tècniques cada cop més específiques. En general totes elles pretenen amplificar una porció d'àcid nucleic determinada, però en el que més s'ha evolucionat és en la forma de detectar aquest producte amplificat. A continuació es descriuen les principals tècniques usades en l'actualitat.

1.1.1.1. *Reacció en cadena polimerasa (PCR)*

La tècnica de la PCR consisteix en l'amplificació d'una regió específica del DNA que hem obtingut del procés d'extracció. Per la seva realització és necessari uns *primers*, és a dir, unes seqüències de DNA que delimiten la zona d'amplificació i que són complementàries a la regió de DNA que volem estudiar. Per realitzar aquest procés cal un Termociclador, aparell que mitjançant cicles i amb canvis de temperatura determinats, permetrà amplificar la regió de DNA que volem (Figura 1).

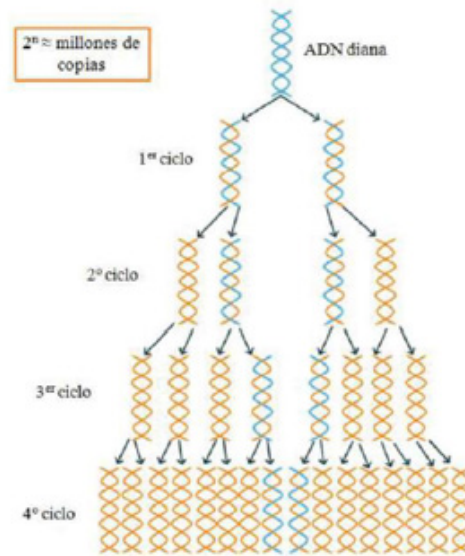


Figura 1. Amplificació de fragment del DNA de forma exponencial. Maria *et al.* ¹ (2)

L'avantatge principal de la PCR és la seva alta especificitat i també la seva gran sensibilitat, ja que la quantitat de DNA necessari per iniciar l'amplificació és molt baixa. Tot i així presenta alguns inconvenients clàssics i coneguts com és el fet de que és una tècnica laboriosa i amb nombrosos passos que poden facilitar, en alguns d'ells, la seva contaminació (2). Per aquest motiu, en els darrers anys s'han desenvolupat tècniques que integren tots els passos de la PCR en una mateixa plataforma, disminuint així tant el risc de contaminació com el temps de resposta.

Aquestes millores però no han permès encara solucionar la gran desavantatge d'aquesta tècnica que resideix en el fet de no disposar del microorganisme viable i per tant de no poder realitzar proves de susceptibilitat als antimicrobians. Les noves tècniques de seqüenciació massiva tenen com a objectiu donar sortida a aquests problemes, però requereixen gran quantitat de material genètic que no sempre s'aconsegueix.

Dins de les tècniques de PCR podem trobar diferents variants amb diferents característiques i diferents aplicacions facilitant la detecció de patògens concrets.

1.1.1.2. *PCR en temps real (Real-time PCR)*

Es la tècnica que més s'utilitza en els laboratoris de microbiologia. Aquesta variant de la PCR afegeix marcadors fluorescents amb l'objectiu de saber la quantitat de DNA inicial i per tant permet detectar la presència de variacions genètiques al llarg del procés d'ampliació (2). La fluorescència que s'emet respon al número de molècules produïdes, fet que permet quantificar-les a mesura que es va produint la reacció de PCR. A part dels reactius necessaris de la PCR convencional, la Real-time PCR necessita sondes marcades amb quimioluminescència o fluorescència amb capacitat d'unir-se a la cadena de DNA que volem amplificar (2,3). El marcador més utilitzat és el fluorofor SYBR Green, el qual només emet senyal fluorescent quan s'uneix al DNA. La Real-time PCR permet l'obtenció de resultats de manera més ràpida que la PCR convencional i amb una sensibilitat superior. Aquesta tècnica integra i automatitza l'amplificació i la detecció (en alguns casos fins i tot l'extracció) en un sol instrument i en un sol temps, millorant l'agilitat i requerint menys ma d'obra en comparació amb la PCR convencional. Per altra part, el fet de necessitar poca manipulació de la mostra, el risc de contaminació es minimitza, obtenint per tant, uns resultats més fiables i segurs.

1.1.1.3. *PCR amb transcriptasa inversa (RT-PCR)*

La RT-PCR és una variant de la PCR convencional en la que la cadena que fa de motlle és de RNA enlloc de DNA. A partir d'aquesta cadena de RNA es sintetitza el DNA complementari (cDNA) sobre el qual es realitzarà la PCR (2). Per tant, la RT-PCR consta de dues fases, primer la transcripció inversa de RNA a DNA i després la PCR *sensu stricto* sobre el DNA obtingut (Figura 2). Sobre aquesta prova existeixen també dues variants:

- RT-PCR en temps real: combina les dues tècniques (transcripció inversa + marcatge fluorescent).
- RT-PCR múltiplex: permet l'amplificació simultània de diversos gens en una sola reacció, utilitzant per tant més d'un *primer*.

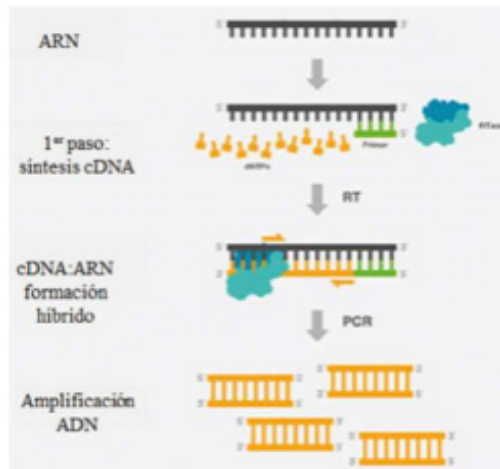


Figura 2. Procés de la RT-PCR. Maria et al. ¹ (2)

1.1.1.4. Tècniques de seqüenciació del genoma

La seqüenciació del genoma consisteix en determinar la seqüència completa del DNA en el genoma (és a dir, l'ordre de les bases: timina, adenina, citosina i guanina). Va ser descrita per primera vegada per Sanger l'any 1974 (4), d'aquí que es coneix amb el nom de seqüenciació de Sanger. Els mètodes de seqüenciació es basen en l'activitat de la DNA polimerasa, que té per funció la síntesi de DNA a partir d'un fragment de DNA, donant lloc a una cadena complementària. La seqüenciació del DNA té moltes aplicacions clíniques, una de les quals és la detecció de mutacions específiques que poden conferir resistències antibiòtiques (2). En els darrers anys s'ha desenvolupat les tècniques de seqüenciació massiva, les anomenades *next generation sequencing* (NGS) (5). Les tecnologies de seqüenciació massiva permeten obtenir la seqüència de nucleòtids de milions de fragments d'ADN en paral·lel, el que suposa una reducció enorme de costos i fa accessibles per a tothom estudis genètics abans impensables.

Una de les aplicacions de la NGS és la determinació de resistències antibiòtiques. Segons dades recents de la WHO publicades l'any 2019 s'ha estimat que la mortalitat a Europa secundària a resistències a antibiòtics és aproximadament de 20000 individus /any, mentre que a nivell mundial aquesta xifra augmenta a 700. 000 (6). Aquesta xifra s'eleva contínuament, de manera que s'ha suggerit que l'any 2050, les infeccions per patògens resistents seran la primera causa de mort, per sobre del càncer i de les malalties cardíco-vasculars, provocant més de 20 milions de morts/any en tot el món. En l'actualitat més del 70% de bacteris patògens són resistent com a mínim a un antibiòtic (7). La NGS permet una vigilància epidemiològica ràpida i intensa a fi d'identificar precoçment els microorganismes multi resistents i elaborar estratègies preventives, amb l'objectiu d'evitar l'ús i el sobre ús d'antibiòtics, disminuir el número diagnòstics erronis i controlar la seva prescripció (8,9).

1.1.2. Diferències entre la PCR convencional, la PCR en temps real i la RT-PCR

De manera esquemàtica, les diferències pràctiques de les diverses tècniques queden resumides en la Taula 1.

Taula 1. Taula comparativa de les diferents tècniques de PCR. Adaptat de Maria *et al.* (2)

PCR convencional	PCR en temps real	RT-PCR
Detecta un segment únic de DNA	Detecta i quantifica el DNA	Síntesi de cDNA a partir de RNA. Permet detecció virus RNA
Requereix dos passos	Requereix un sol pas	Requereix dos passos
Menor sensibilitat	Major sensibilitat	Major sensibilitat
Menor especificitat	Major especificitat	Major especificitat
Preu menor	Reactiu més cars	Cara

1.2. APLICACIÓ DE LA PCR I DE LA REAL-TIME PCR EN EL DIAGNÒSTIC DE PATOLOGIA INFECCIOSA DEL TRACTE DIGESTIU EN PEDIATRIA

Les malalties infeccioses del tracte gastro-intestinal són una causa important de morbi-mortalitat a nivell mundial, amb una gran varietat de gèrmens responsables que inclou tant virus, bacteris com paràsits (10). Històricament el diagnòstic d'aquestes malalties es realitzava mitjançant cultius, microscòpia òptica, tests d'antígens etc, però en els darrers anys, amb la incorporació de les tècniques de biologia molecular (com les anteriorment esmentades), s'ha millorat extremadament el rendiment dels estudis microbiològics, aconseguint el diagnòstic etiològic en una gran part dels casos. Aquest és el cas, per exemple, de la implementació i comercialització de diferents panells moleculars múltiple que permeten un diagnòstic ràpid, amb una alta sensibilitat i identificant múltiples microorganismes alhora (10). Aquesta millora en el diagnòstic ha permès tractar l'agent causal d'una manera més precoç i dirigida, millorant l'evolució, el pronòstic i reduint l'ús de fàrmacs empírics i en definitiva reduint el desenvolupament de resistències antibiòtiques. Aquests panells són molt útils sobretot pel diagnòstic de gastroenteritis infeccioses (2,10) i estan dissenyats seguint patrons de diagnòstic sindròmic. En l'actualitat els més utilitzats són Verigene EP, FilmArray GI i xTAG GPP (Figura 3). L'ús d'un panell o un altre dependrà de diferents factors (rendiment de la prova, tipus de pacient a estudiar, cost etc. .). Tot i així la realització de cultius continua sent necessària tant per poder dur a terme estudis d'investigació epidemiològica com per conèixer millor la susceptibilitat a antibiòtics.

Target ^a	Multiplex panel ^b		
	Verigene EP	FilmArray GI	xTAG GPP
<i>Aeromonas</i>		IUO ^c	
<i>Campylobacter</i>	✓	✓	✓
<i>Clostridium difficile</i> (toxin A/B)		✓	✓
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		✓	
<i>Salmonella</i>	✓	✓	✓
<i>Yersinia enterocolitica</i>	✓	✓	RUO ^d
<i>Vibrio</i> spp.	✓	✓	✓
EAEC		✓	
EPEC		✓	
ETEC		✓	✓
STEC (<i>stx</i> ₁ and <i>stx</i> ₂)	✓ ^e	✓	✓
<i>E. coli</i> 0157		✓	✓
EIEC/ <i>Shigella</i>	✓	✓	✓
<i>Cryptosporidium</i>		✓	✓
<i>Cyclospora cayetanensis</i>		✓	
<i>Entamoeba histolytica</i>		✓	✓
<i>Giardia lamblia</i>		✓	✓
Adenovirus 40/41		✓	✓
Norovirus GI/GII	✓	✓	✓
Rotavirus A	✓	✓	✓
Sapovirus		✓	
Astrovirus		✓	

^a EAEC, enteroaggregative *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli* (heat-labile toxin/heat-stable toxin); STEC, Shiga-like toxin-producing *E. coli* (*stx*₁ and *stx*₂); EIEC, enteroinvasive *E. coli*.

^b EP, enteric pathogen; GI, gastrointestinal; GPP, gastrointestinal pathogen panel.

^c IUO, investigational use only.

^d RUO, research use only.

Figura 3. Comparació dels panells multiplex més utilitzats en l'actualitat. Binniker et al.³

En molts casos l'agent microbiològic identificat és el responsable de la simptomatologia del pacient, com és el cas de la majoria de gastroenteritis, però en altres ocasions aquesta relació causal no és tant clara. Aquest és el cas de la infecció per *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*) i la infecció per *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Tradicionalment el diagnòstic de la *D. fragilis* es realitza per microscòpia òptica amb la visualització del paràsit. En el cas de l'*H. pylori* el seu diagnòstic es realitza mitjançant el

cultiu. Ambdues tècniques presenten un baix rendiment comportant un índex de falsos negatius molt elevat. La incorporació de la tècniques de biologia molecular ha aconseguit una millora dràstica en la identificació d'ambdues infeccions.

1.2.1. Infecció per *Dientamoeba fragilis*

1.2.1.1. Epidemiologia

La *D. fragilis* es un protozou unicel·lular que parasita el budell humà. Tot i que fa molts anys que es va descriure, el seu cicle vital, el seu mecanisme de transmissió i la seva capacitat patògena real encara no són de tot coneguts havent-hi en l'actualitat diferents hipòtesis obertes al respecte (11).

La *D. fragilis* és un paràsit de distribució mundial, molt present en el tracte gastrointestinal humà, amb una prevalença estimada a Espanya al voltant del 17,7% (12) i una incidència igual o inclús superior a la infecció per *Giardia* (13). La seva prevalença a nivell mundial és variable en funció de l'àrea geogràfica, reportant-se en alguns països una prevalença de fins al 82% (14). Aquesta variabilitat, a part de la seva distribució geogràfica, pot ser deguda als diferents dissenys d'estudi i, especialment, al tipus de tècnica diagnòstica aplicada (cultiu, microscòpia òptica o biologia molecular). L'ús de tècniques de biologia molecular (PCR) n'ha millorat la detecció i per tant ha contribuït a augmentar les taxes de prevalença (15-17). La Taula 2 mostra un resum de tots els estudis publicats fins al moment sobre les diferents prevalences de la *D. fragilis* en funció del mètode microbiològic utilitzat.

Taula 2. Prevalença de la infecció per *D. fragilis* en els diferents estudis publicats. Font: Tesi doctoral Dra. Candela Menéndez Fernández-Miranda. La numeració de referències bibliogràfiques correspon a la tesi de la Dra. Menendez, no a aquesta tesi

<i>Método diagnóstico</i>	<i>Referencia bibliográfica</i>	<i>N</i>	<i>País</i>	<i>Prevalencia</i>	
Cultivo	Prociiv. <i>et al.</i> (54)	260	Australia	1,50%	
	Rayan <i>et al.</i> (4)	168	Egipto	29,80%	
	Windsor <i>et al.</i> (55)	976	Reino Unido	2,60%	
Microscopía	Ayadi <i>et al.</i> (56)	27058	Túnez	5,50%	
	Burgaña <i>et al.</i> (57)	13983	España	8,20%	
	Calderaro <i>et al.</i> (58)	8886	Italia	1,68%	
	Crotti <i>et al.</i> (59)	3139	Italia	3,70%	
	Crotti <i>et al.</i> (60)	151	Italia	11,30%	
	Fletcher <i>et al.</i> (61)	910	Australia	12,00%	
	Girginkardesler <i>et al.</i> (62)	400	Turquía	8,80%	
	Gonzalez-Moreno <i>et al.</i>	8313	España	1,60%	
	Jimenez <i>et al.</i> (64)	3388	Venezuela	1,80%	
	Kaminsky <i>et al.</i> (65)	266	Honduras	3,00%	
	Keystone <i>et al.</i> (66)	900	Canadá	8,60%	
	Lainson <i>et al.</i> (67)	34 (VIH)	Brasil	3,00%	
	Mendez <i>et al.</i> (68)	82 (VIH)	Argentina	25,60%	
	Millet <i>et al.</i> (69)	81	EEUU	52,00%	
	Ortega <i>et al.</i> (70)	150	EEUU	1,30%	
	Preiss <i>et al.</i> (71)	123	Alemania	82,90%	
	Sarkari <i>et al.</i> (72)	1025	Irán	0,19%	
	Schuster <i>et al.</i> (73)	3719	Inglaterra	14,60%	
	Shehata <i>et al.</i> (74)	200	Egipto	8,00%	
	Stark <i>et al.</i> (75)	6750	Australia	0,90%	
	Stensvold <i>et al.</i> (93)	103	Dinamarca	11,65%	
	Windsor <i>et al.</i> (77)	857	Omán	5,10%	
	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Aykur <i>et al.</i> (78)	490	Turquía	12,04%
		Bruijnesteijn <i>et al.</i> (79)	397	Países Bajos	32,00%
		Calderaro <i>et al.</i> (80)	491	Italia	21,40%
		Clemente <i>et al.</i> (81)	575	Italia	14,78%
Incani <i>et al.</i> (82)		228	Venezuela	40,40%	
Jokelainen <i>et al.</i> (83)		142	Dinamarca	68,30%	
Julio <i>et al.</i> (84)		176	Portugal	6,30%	
Maas <i>et al.</i> (85)		163	Países Bajos	61,96%	
Yakoob <i>et al.</i> (86)		171	Pakistán	4,00%	
Ögren <i>et al.</i> (87)		146 niños <11 a Padres: 123 Hermanos: 14 Profesores: 16	Suecia	73,00%	
Ögren <i>et al.</i> (88)		Niños: 100 Adultos: 80 Sanos: 88	Vietnam	5,00%	
Osman <i>et al.</i>		249 (3-16 años)	Líbano	60,6%	
Röser <i>et al.</i> (90)		22000	Dinamarca	43,00%	
Sarafraz <i>et al.</i> (91)		1000	Irán	2,30%	
Stark <i>et al.</i> (27)		750	Australia	5,20%	
Stark <i>et al.</i> (92)		472	Australia	5,50%	

L'any 2011 segons un article de revisió publicat per Barrat et al. (18), la distribució mundial de la *D. fragilis* en centra en uns focus concrets amb una concentració marcadament cosmopolita (Figura 4).



Figura 4. Distribució de la *Dientamoeba Fragilis*. Les localitzacions on més s'ha identificat *D. fragilis* es marquen amb el cercle vermell. Font: Barrat et al (18)

La *D. fragilis* va ser observada per primera vegada l'any 1909 per Charles Wenyon que va trobar el paràsit en les seves pròpies femtes, tot i que el microorganisme no va ser correctament identificat fins l'any 1918 per Jebbs and Dobell (19) que el van descriure com una ameba binucleada, fràgil i molt làbil fora de l'organisme, motiu que li va valdre el nom de *D. fragilis* (13). Es una de les infeccions parasitàries més prevalent arreu del món, només superada pel *Blastocystis hominis* (Taula 3).

Taula 3. Prevalença *D. Fragilis*. Adaptat de Stark D. et al (9)

<i>Blastocystis hominis</i>	9,6%
<i>Dientamoeba fragilis</i>	5,2%
<i>Giardia intestinalis</i>	2%
<i>Endolimax nana</i>	1,3%
<i>Cryptosporidium spp</i>	0,8%
<i>Entamoeba coli</i>	0,8%
<i>Entamoeba dispar/hystolitica</i>	0,7%

El seu hoste principal és l'home, però també s'ha trobat en primats i en altres mamífers com ara rosegadors i porcs, però amb una incidència desconeguda. Diversos autors han demostrat una incidència variable en funció del grup d'edat i també en funció de gènere (Figura 5), sent l'edat pediàtrica una de les franges d'edat més afectades (12,19). Alguns estudis reporten una distribució bimodal per edat, amb un pic al voltant dels 7 anys i un altre pic als 40 anys, afectant principalment en aquesta franja al sexe femení, que probablement correspon a mares de nens infectats (20).

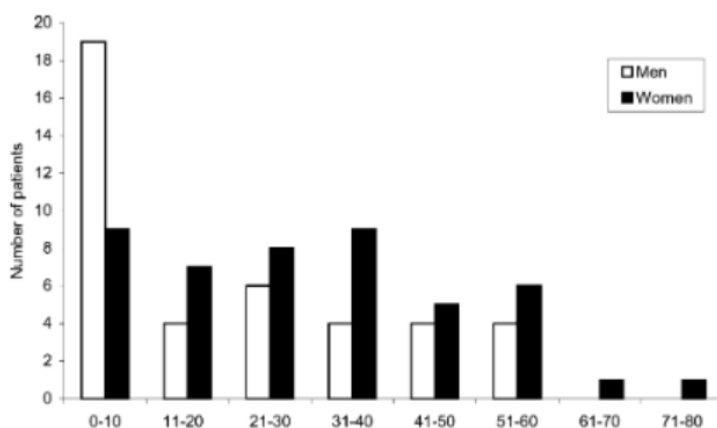


Figura 5. Distribució per sexes i franges d'edat. Font: Norberg et al. ⁷

1.2.1.2. Morfologia i cicle vital

La *D. fragilis* es un protozou flagel·lat que mostra gran similitud estructural i antigènica amb *Trichomonas* i *Histomonas* (19). Pertany a l'ordre *Tritrichomonadida*, però tot i que forma part de la família de protistes anaerobis flagel·lats, la *D. fragilis* ha perdut els seus flagels. Per aquest motiu, i de manera errònia, va ser classificat antigament com una ameba. Es suggereix que l'etapa de quist és el vehicle que facilita la seva transmissió fecal-oral entre hostes (15,21). Tot i que es desconeix com poden romandre els trofozoïts fora del cos, alguns autors postulen que poden sobreviure dins dels ous d'helminths com ara l'*Enterobius vermicularis* o l'*Ascaris lumbricoises* (22-24), però, d'altra banda, altres estudis no han demostrat

la correlació entre les infeccions causades per ambdós paràsits (22). La possible transmissió de la *D. fragilis* a través dels ous de *Enterobius vermicularis* podria explicar la seva major prevalença en població pediàtrica, on la infecció per oxiurs és més freqüent.

Morfològicament la *D. fragilis* es presenta en tres formes: quist, prequist i trofozoït (Figures 6 i 7).

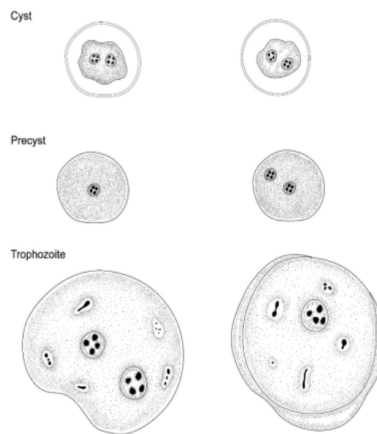


Figura 6. Formes de *D. fragilis* esquematitzats: quist, prequist i trofozoït.
Font: Stark et al. (25)

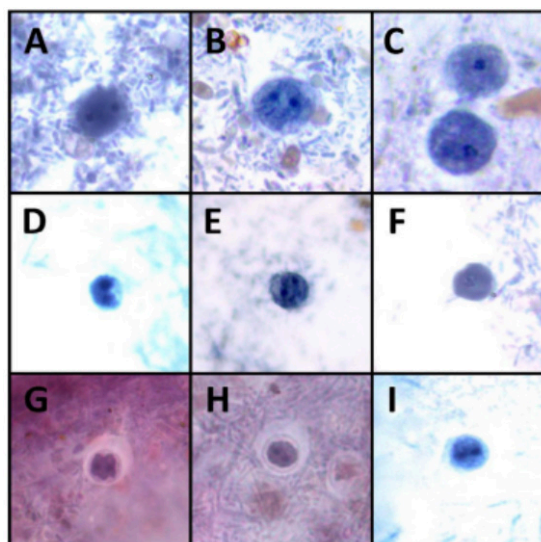


Figura 7. Formes *D. fragilis* per tinció amb hematoxilina fèrrica. Trofozoït (a-c); prequist (d-f); quist (g-i). Font: Stark et al. (25)

La forma de quist posseeix, tal i com mostren les imatges, una paret gruixuda, amb una paret interna més irregular i membranosa que envolta l'estructura nuclear del paràsit. Aquesta estructura nuclear es manté idèntica en la fase de trofozoït. Entre ambdues parets hi ha un espai anomenat espai peritròfic. Tots els quists presenten dos nuclis, i cada nucli es fragmenta en grànuls de cromatina, sovint anomenats «paquets de cromatina» (25). L'estructura de quist poques vegades s'identifica en les mostres de femta. Per contra, la forma de prequist es troba amb més freqüència.

La forma de prequist es caracteritza per una estructura esfèrica compacta, amb una reducció de mida del 50% respecte la forma de trofozoït. Presenta un citoplasma sense inclusions i més fosc, que indica la seva compactació.

El trofozoït de la *D. fragilis* es una estructura pleomòrfica i de forma ovalada o arrodonida. Mesura entre 5-15 micres aproximadament. El trofozoït és capaç de desplaçar-se gràcies a uns pseudòpodes hialins, disposats en forma de «ventall». El seu grau de mobilitat és depenent de la temperatura a la que es troba, disminuint a temperatures baixes.

La *D. fragilis* viu exclusivament en el colon. Tal i com hem dit, els trofozoïts són molt làbils en femta presentant una escassa resistència al medi extern. Per altra part, la *D. fragilis* no presenta la forma de quist com a transmissor de la infecció, per això s'han generat les diverses hipòtesi abans esmentades, sobre la transmissió a través d'ous d'*Enterobius* parasitats per trofozoïts de *D. fragilis*.

El cicle vital proposat actualment queda resumit en la Figura 8.

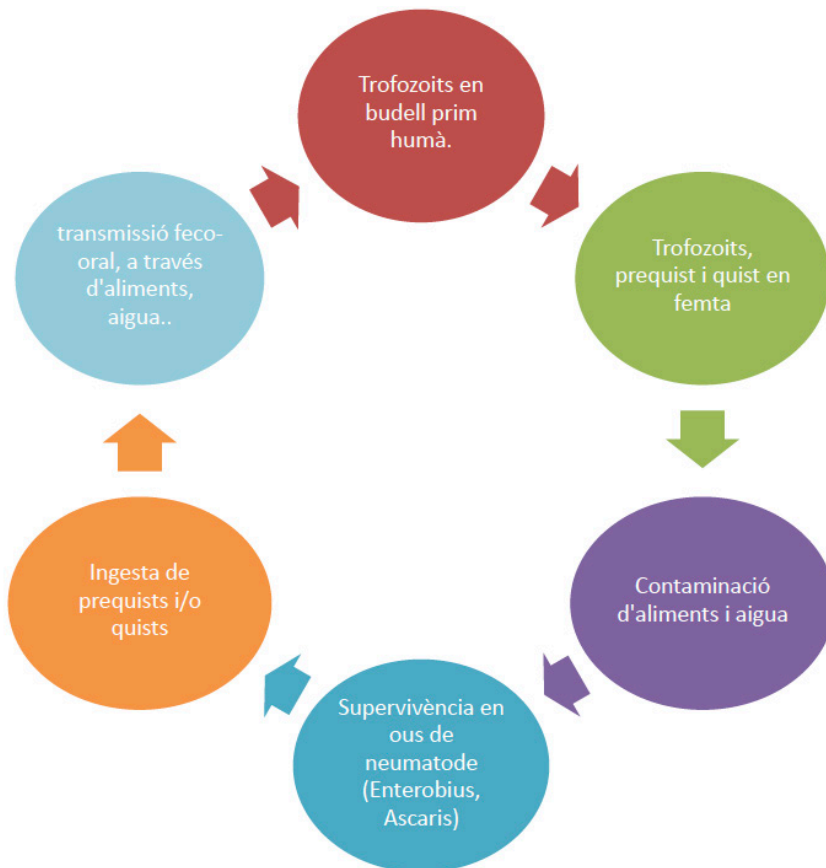


Figura 8. Cicle vital *D. fragilis*. Els trofozoits ingerits presents en la llum intestinal es multipliquen per fisió binària i s'eliminen per la femta, juntament amb les formes quístiques i prequístiques, contaminant aigua i aliments. La majoria d'aquests quists seran vehiculats a través d'ous d'helminths que facilitaràn la seva supervivència, infectant altres hostes a través de la via feco-oral i per aliments contaminats, tancant el cicle. Adaptat de Ögren et al. (22)

1.2.1.3. Mecanismes de transmissió

Clàssicament tal i com hem dit anteriorment s'han postulat dos mecanismes de transmissió possibles:

- **Transmissió fecal-oral (model clàssic):** Els trofozoïts es multipliquen en el budell prim de l'hoste (humans i altres mamífers) i posteriorment son excretats a través de la femta. Els trofozoïts

infecten aliments o aigües que son ingerits per altres hostes tancant el cicle i perpetuant la infecció (25,26).

- **Transmissió per *Enterobius vermicularis*:** Aquesta hipòtesi està avalada per les altes taxes de coinfecció, fet que podria explicar que els trofozoïts, que són làbils i poc resistents fora del budell, es vehicularien a través del ous dels oxiürs, parasitant així a l'hoste. Hi ha dos estudis recents que mostren presència de DNA de *D. fragilis* en els ous d'*Enterobius vermicularis* així com també en la seva superfície (22,24), donant més força a aquesta teoria. Tot i així, la presència de DNA no confirma l'existència de paràsit «viu» i per tant caldrien més estudis en aquest sentit.

S'han proposat altres vies de transmissió, però amb menys suport de la literatura:

- **Transmissió persona-persona:** Teoria avalada per la infecció seqüencial de *D. fragilis* intrafamiliar, sense haver identificat com a vector *E. vermicularis* (27) i sense haver pogut comprovar altres focus de infecció (a través d'animals domèstics o aliments) (28). Hi ha pocs estudis publicats respecte aquesta via de transmissió
- **Transmissió zoonòtica:** Com qualsevol altre infecció parasitària la *D. fragilis* es podria transmetre a través d'animals. Tot i així podria existir reactivitat creuada amb paràsits del mateix ordre, que podrien portar a resultats falsos positius. Per altre part, en diversos estudis publicats sembla que la potencial transmissió dels animals als humans juga un paper mínim (28,29).
- **Aigua contaminada:** L'aigua potable contaminada per patògens pot ser un focus important de transmissió de múltiples infeccions provocant brots comunitaris inclús en països desenvolupats. Sovint l'aigua potable es pot contaminar en cas de precipitacions abundants, problemes de xarxa o de distribució d'aigua. Kauppinen et al van publicar l'any 2019 un estudi on van identificar *D. fragilis* en mostres d'aigua potable a Finlàndia (30).

1.2.1.4. Clínica

Malgrat els anys que fa que la *D. fragilis* es coneix, el seu paper etiopatogènic com a causant de malaltia gastrointestinal és a dia d'avui, encara controvertit. Sembla que la presència de *D. fragilis* en el budell pot desencadenar una resposta inflamatòria local. Diversos estudis demostren que el paràsit té la capacitat d'adherir-se a la mucosa intestinal i causar un dany directe en les cèl·lules epitelials, provocant l'alliberació de mediadors inflamatoris i provocant de manera secundària inflamació del teixit circumdant (11,13,19,31-33). S'ha suggerit també que la *D. fragilis* podria interaccionar amb altres microorganismes presents en el budell, fet que podria influir en la resposta immune i la fisiopatologia de la infecció (11). Per altra banda, determinats estudis han demostrat la presència del paràsit en femta de pacients asimptomàtics (16,21,33-35) mentre que d'altres mostren possible correlació entre símptomes i la troballa del paràsit, amb resolució dels mateixos a l'erradicar la infecció (12,14). En els casos en que s'ha relacionat la infecció amb patologia digestiva, la simptomatologia més descrita ha estat diarrea (present en la majoria d'estudis en més del 80% dels pacients), seguida de dolor o malestar abdominal (més de la meitat dels pacients), urgència fecal (40%) i menys freqüentment nàusees, vòmits o febre (<10%) (21,32). Una troballa relativament freqüent és l'eosinofília, que segons alguns estudis es pot observar fins en el 50% dels pacients infectats (18,36). Tots els estudis realitzats, però, acaben conclouent que no es pot assegurar una relació causal clara i que són necessaris estudis més uniformes i amb mida mostral major. En aquest sentit, els estudis publicats incloent població pediàtrica i ben dissenyats (amb comparació amb grup control) són molt escassos i amb resultats contradictoris (36).

Un estudi recent de Aykur et al. (37) ha estudiat els nivells de calprotectina fecal (CPF) en pacients infectats amb *D. fragilis* amb l'objectiu de demostrar la patogenicitat del paràsit. La CPF es una proteïna alliberada per neutròfils, monòcits, macròfags i cèl·lules epitelials de la submucosa. La seva excreció en femta indica inflamació de la mucosa intestinal. Aquest estudi va comparar nivells de CPF en pacients infectats amb *D. fragilis* i els va comparar amb els nivells de CPF en controls sans i amb pacients amb símptomes digestius no infectats per *D. fragilis*. Els

nivells de CPF en pacients infectats van ser superiors al grup control amb resultat estadísticament significatiu, però quan es van comparar amb el grup amb símptomes però sense infecció, tot i tenir uns resultats de CPF majors, aquests no eren estadísticament significatius. Per tant, aquest estudi tampoc demostra la possible lesió del paràsit sobre la mucosa intestinal.

En resum, en el moment actual, la fisiopatologia i el poder patogen real de la *D. fragilis* encara continua sent objecte de debat. Son necessaris més estudis, sobretot en població pediàtrica, per esbrinar si realment és causa de patologia intestinal o simplement és una paràsit comensal benigne i la seva troballa en persones simptomàtiques és merament incidental.

1.2.1.5. *Diagnòstic*

El diagnòstic de la *D. fragilis* es basa principalment en tres mètodes: la microscòpia, el cultiu i la PCR (Taula 4). La Immunofluorescència indirecta (IFI) te una gran especificitat però escassa aplicació clínica (38).

- **Microscòpia:** La microscòpia òptica és el mètode clàssic de diagnòstic, però és una tècnica amb especificitat limitada per la difícil identificació correcta del paràsit, ja que presenta una gran semblança morfològica amb altres protozous. Precisament la «fragilitat» característica de la *D. fragilis* provoca que sovint no es pugui visualitzar mitjançant aquest mètode. La microscòpia òptica requereix una fixació ràpida de les mostres de femta i un microscopista altament format. Aquesta fixació es pot realitzar per diferents mètodes (alcohol polivilinic, acetat sòdic -àcid acètic formalina, mertiolat iode-formol (MIF), lugol (11,13,39,40). Un cop fixada la mostra fecal, es procedeix a la tinció. La tinció més utilitzada actualment és l'hematoxilina fèrrica de Heidenhain (25,41). Per augmentar el rendiment de les mostres, es recomana que aquesta es processi el més ràpidament possible després de la defecació. En la pràctica clínica real aquesta rapidesa sovint és poc viable, donat que les mostres es processen hores (o inclús dies) després de la seva obtenció, fet que augmenta la taxa de falsos

negatius (42). Una altra dificultat afegida, és la secreció fàsica del paràsit i la seva eliminació intermitent. La càrrega parasitària pot ser molt elevada un dia, sent pràcticament inexistent els dies posteriors.

Amb l'objectiu d'evitar els falsos negatius derivats de l'excreció fàsica, la majoria del laboratoris han implementat el Triple Test Fecal (TFT). El TFT consisteix en la recollida de tres mostres de femta en 3 dies consecutius, processant-les amb tècniques que combinen mètodes de fixació i de concentració, fet que millora el rendiment del resultat i per tant s'augmenta la sensibilitat (42,43). Als pacients se'ls proporciona un kit amb tres tubs (dos tubs amb fixador i un tub buit). Aquest procediment té l'inconvenient que pot endarrerir el diagnòstic tres dies, alhora que sovint molts pacients no aporten correctament totes les mostres (per excés o defecte de la quantitat de femta en els diferents tubs). Finalment és necessari també un microbiòleg expert que sigui capaç de diferenciar la *D. fragilis* d'altres protozous (42).

- **Cultiu**

La *D. fragilis* a diferència d'altres protozous precisa de flora bacteriana pel seu creixement (cultiu xènic) (44-46), no creixent en els coprocultius convencionals on s'inhibeix la flora comensal. Per millorar-ne el rendiment, en general, cal enriquir el medi amb midó d'arròs, citrat fèrric, àcid ascòrbic i L-cysteina (46). Tot i que el cultiu és més sensible que la microscòpia, en general és poc utilitzat en els laboratoris de microbiologia per la seva laboriositat.

- **PCR convencional i la Real-Time PCR**

Les tècniques de biologia molecular són el diagnòstic d'elecció per la majoria dels autors (15,29,41,44,47). La tècnica de la PCR permet detectar i amplificar segments específics de DNA de *D. fragilis*. La Real-time PCR redueix a més el risc de contaminació del DNA, i per tant permet un diagnòstic més ràpid i més sensible que el TFT i la PCR convencional (15,17,42). Stark et al. (44) va

comparar la microscòpia clàssica, dues tècniques de cultiu, la real-time PCR i la PCR convencional. Va incloure 650 mostres de femta. En 35/650 va identificar *D. fragilis* per Real-time PCR, 15/650 per PCR convencional, 14/650 per cultiu i 12/650 per microscòpia. La sensibilitat i l'especificitat per la Real-time PCR va ser del 100% respectivament, mentre que per la PCR convencional va ser del 42,9% i 100% respectivament, i del 34,3% i 99% per la microscòpia. Determinant per tant, que la Real-time PCR és el mètode diagnòstic d'elecció per la infecció per *D. fragilis*.

Taula 4. Comparació de les diferents tècniques diagnòstiques de *D. fragilis*.
Van Gestel et al. (42)

Availability	Worldwide	Worldwide	Developed countries
Basic laboratory requirements	Microscope, skilled technologist, fixative and staining method	Microscope, skilled technologist fixative, concentration method, permanent stain	Laboratory with PCR facility, <i>D. fragilis</i> -specific PCR setup
Patient instructions	Refrigeration not required after collecting, but <i>D. fragilis</i> rapidly degrades after collection, thus rapid fixation is required	Collecting on 3 consecutive days with right fixative immediately after defecation. Refrigeration not required after collecting	No special procedures. Special collection buffers preserve intactness of DNA for prolonged periods at room temperature
Laboratory costs per test ^a	€40 for the detection of most common enteric protozoa	€47 per TFT sample for all enteric protozoa	€40 for fully automated PCR on <i>D. fragilis</i> (<i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> and <i>Blastocystis</i>) in our laboratory
Sensitivity	+	++	+++
Specificity	+	++	+++ ^b

^aAssuming required infrastructure is already present and thus of no consequence on price per test.

^bThere is some discussion as some PCRs may detect a potentially non-pathogenic *Dientamoeba fragilis* subspecies from pigs (Stark et al., 2016).

1.2.1.6. Tractament

No hi ha un consens clar en el tractament de la *D. fragilis*, tant pels dubtes sobre la seva veritable capacitat patògena com pel conegut caràcter auto limitat de la infecció en la majoria dels casos (42,48). Els estudis publicats es basen en cohorts petites i no controlades amb placebo, fet que complica l'evidència de l'eficàcia dels tractament proposats. Tot i que el fàrmac més utilitzat és el metronidazol (21,35,49), alguns autors proposen el clioquinol com antiparasitari de primera línia (31) mentre que d'altres recomanen la paromomicina, antiparasitari intraluminal, per presentar una millor eficàcia i menys efectes adversos (21,48,50). La recomanació actual del CDC (Centers of Disease Control 2017 (URL: https://www.cdc.gov/parasites/dientamoeba/health_professionals/index.html)) és el tractament

amb Iodoquinol (no comercialitzat en el nostre país), metronidazol o paromomicina (Taula 5).

Taula 5. Dosis d'antiparasitaris recomanats

Metronidazol	30-40 mg/kg/dia x 10 dies (31,35)
Paromomicina	25-35 mg/kg/dia x 7 dies (48,50)
Clioquinol	15 mg/kg/dia 5-10 dies (31)

En un estudi recent, van Kalleveen et al. (36) proposen tant la paromomicina i com el clioquinol com a tractament d'elecció, per tenir un espectre més reduït amb menys efectes secundaris en comparació al metronidazol, alhora que ambdós presenten una taxa d'erradicació més alta que aquest últim.

1.2.2. Infecció per *Helicobacter pylori*

L'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) és una bactèria gram negativa, d'estructura helicoidal i flagel·lada, identificada per primera vegada l'any 1982 per dos investigadors australians, Barry Marshall i Robin Warren. Presenta un conegut potencial patogènic, fet que l'ha portat a ser la principal causa de patologia ulcerosa pèptica alhora que se li adjudica també un poder oncogènic actualment ja poc discutit.

1.2.2.1. Epidemiologia

L'*H. pylori* habita en l'estomac humà d'aproximadament el 60% de la població mundial (51) i que pot conduir a gastritis crònica, úlcera pèptica, adenocarcinoma gàstric i limfoma MALT (limfoma del teixit limfàtic associat a la mucosa) (52). La seva prevalença és especialment elevada en països de rendes baixes, en els quals aquesta, pot arribar al 80% (53). Aquest fet és propiciat per condicions higièniques deficientes, aglomeracions o amuntegament de persones, facilitant la transmissió oral-oral i/o fecal-oral. S'han publicat recentment dos metaanàlisis que mostren dades una mica diferents pel que fa a la prevalença de l'*H. pylori* a nivell mundial. El primer

d'ells (54) mostra que la major prevalença és al continent africà on pot arribar al 79%, Amèrica Llatina i Carib fins al 63% i Àsia al voltant del 54%, trobant una prevalença inferior a Amèrica del Nord amb un 37% i Oceania amb un 24%. La prevalença a Europa és variable, mostrant concretament a Espanya unes taxes entre el 50-60%. Aquest autor suggereix que aproximadament 4,4 bilions de persones estan infectades i que per tant l'*H. pylori* afecta al 60% de la població a nivell global.

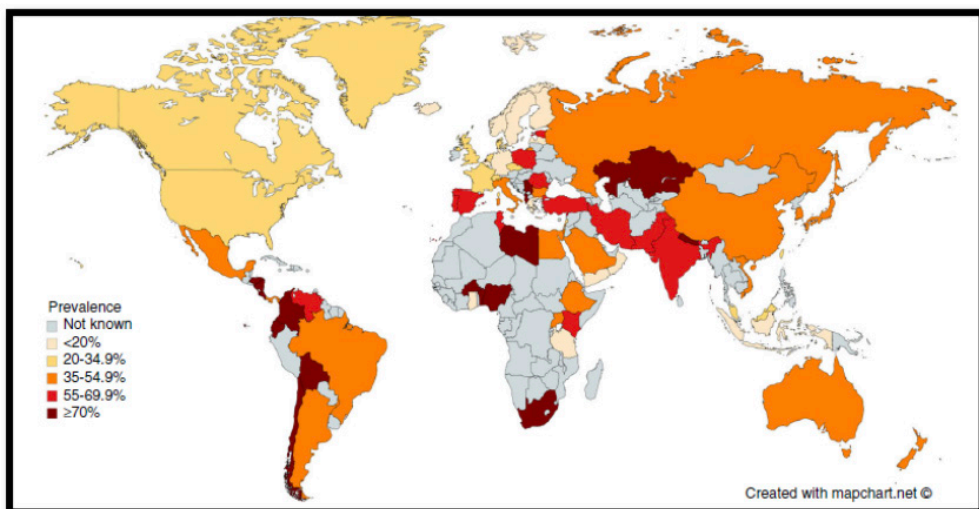


Figura 9. Prevalença mundial de l'*Helicobacter Pylori*. Zamani et al. (52)

Per altra banda, aquest estudi apunta que aquesta taxa global de prevalença tant elevada, presenta una tendència a la baixa en els països industrialitzats en el que portem de segle XXI. Per contra en els països en vies de desenvolupament, la prevalença va en augment (54). Dades també recentment publicades en un segon metaanàlisi (52) mostren en canvi una prevalença per *H. pylori* menor (Figura 9). Segons Zamani et al. (52), en països en vies de desenvolupament la prevalença és del 50,8% (IC 95%: 46,8-54,7) mentre que en països desenvolupats és del 34,7% (IC 95%: 30,2-39,3) amb una prevalença global del 44,3% (Figura 10), a diferència de l'estudi de Hooi et al. (54) on es descriu una prevalença global del 60%. Un article publicat aquest any 2023 mostra una disminució progressiva de la infecció d'*H. pylori* a nivell global, del 50-55% al 43%

entre l'any 2014 i el 2020 (55) atribuint aquest descens a la confluència de diferents factors com ara la millora de l'estatus socio-econòmic, de les condicions de vida i millora també en les polítiques d'higiene.

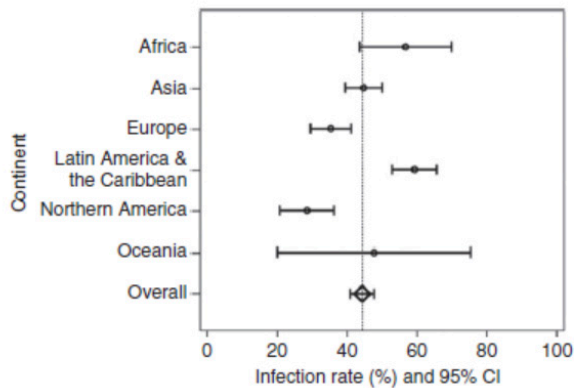


Figura 10. Prevalença de *H. pylori* en els sis continents. La línia central representa la prevalença global a nivell mundial (44,3%). Zamani et al. (52)

En ambdós metaanàlisis es mostra una prevalença a Espanya similar, amb taxes entre el 60 i el 70%. Pel que fa a la distribució per gèneres, de manera global, la prevalença és major en sexe masculí (46,3%) en comparació al sexe femení (42,7%), tot i que la diferència no és estadísticament significativa (52). Si mirem la distribució per edats, la població adulta presenta unes taxes d'infecció superiors que la població infantil (48,6% enfront de 32,6%) (52) (Figura 11).

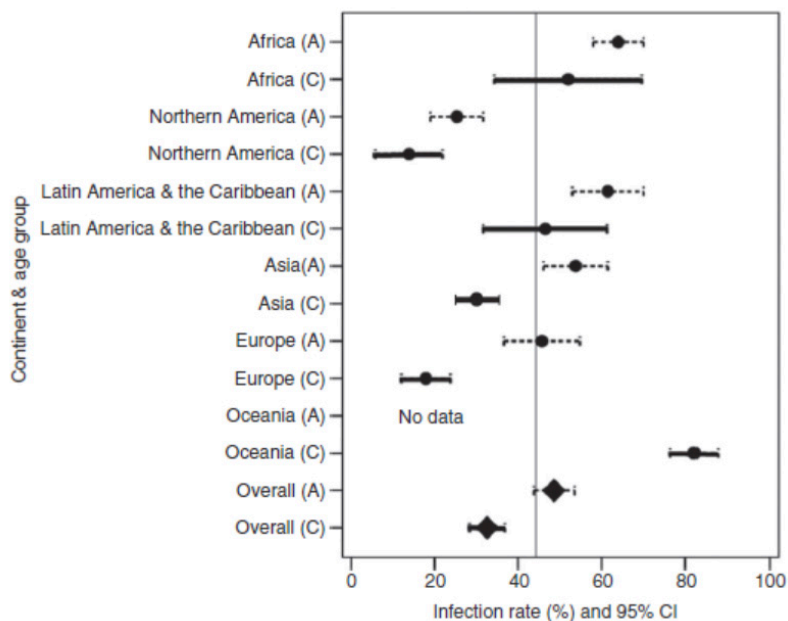


Figura 11. Prevalença de *H. pylori* per grups d'edat en els sis continents. a, adults; C, children. zamani et al. (52)

Tot i així, altres autors han mostrat dades diferents pel que fa a la distribució per edat i sexe. Ibrahim et al. (56) en un metaanàlisi publicat l'any 2017, avalua un total de 244 estudis la majoria transversals, on mostra una major prevalença de la infecció per *H. pylori* en sexe masculí tant en població infantil (102 estudis. OR=1,02) com en població adulta (169 estudis. OR=1,12). El motiu pel qual el sexe pot influir en l'adquisició o en la persistència de la infecció, de moment és desconegut. Tot i així, la majoria dels estudis avaluats en el metaanàlisi de Ibrahim et al, que mostraven una major associació entre sexe masculí i edat infantil, eren estudis realitzats a Àfrica i amb mides mostrals petits, i per tant els resultats s'han d'interpretar amb cautela. Una de les causes que s'ha proposat per justificar l'augment de la infecció en el sexe masculí és la diferència d'exposició a diferents factors ambientals, com ara el tabaquisme. El tabac s'ha associat a un augment del risc d'infecció per *H. pylori* així com també a un major fracàs a la seva erradicació (57-59). També hi ha factors fisiològics i hormonals que poden explicar aquesta diferència entre sexes, afectant la immunitat i la resposta

inflamatòria de manera diferents entre homes i dones (60). Els esteroides sexuals són hormones que actuen sobre múltiples òrgans diana (Sistema Nerviós Central (SNC), os, òrgans reproductors, sistema immunitari. .) i poden influir en el desenvolupament, maduració i activitat del sistema immune. Es conegut que la Deshidroepiandrosterona (DHEA) promou la producció de citocines IL2 i IFN, estimulants també el desenvolupament de la immunitat cel·lular, mentre que els estrògens afavoreixen l'activació de les cèl·lules B, estimulades en part per la IL4, IL 6 i la IL10 (60). Per tant, aquest fet podria justificar la diferent resposta i per tant la diferent prevalença de determinades infeccions entre el sexe masculí i el femení.

1.2.2.2. Factors associats a la infecció per *Helicobacter pylori*

Factors demogràfics i socio-econòmics

Diferents estudis (53,61,62) han mostrat que les poblacions amb major poder adquisitiu i major nivell cultural presenten taxes inferiors de infecció per *H. pylori*. També s'han trobat diferències entre zones rurals i urbanes, amb un augment de la prevalença en les primeres (75% i 50% respectivament) (53). En el mateix sentit, la creixent urbanització del món rural s'està associant amb una disminució progressiva de les taxes d'infecció. S'ha vist també que un millor status socio-econòmic no només redueix el risc d'infecció sinó que redueix també el risc de presentar lesions que poden portar a neoplàsia gàstrica, atrofia i metaplàsia intestinal (61).

Dieta i estil de vida

Un estudi realitzat amb 166 adults a Portugal (63) va trobar una major prevalença de *H. pylori* en persones que consumien pocs vegetals i fruites, alhora que mostraven un elevat consum d'aliments fregits i de greix saturat. També s'ha trobat més prevalença en persones que tenen un elevat consum de sal, de carn processada, carn vermella i de tabac. En aquest cas, també presenten més risc de neoplàsia gàstrica (53,63). Pel que fa altres components de la dieta (vitamina A, vitamina C, vitamina E, Beta-carotens, flavonoides), els estudis no són conclouents. Tampoc ho són pel que fa a la relació amb el consum d'alcohol i l'exercici físic (63). Tot i així, independentment de la infecció per *H. pylori*, es manté la recomanació de

reduir l'alcohol i de realitzar una dieta mediterrània per la prevenció del càncer gàstric (64).

Reservori i transmissió

Hi ha diferents hipòtesis sobre el reservori natural de l'*H. pylori* i les seves vies de transmissió. Les rutes de transmissió actualment no es coneixen amb exactitud, però sembla que la transmissió persona-persona és la via més probable sobretot en els països industrialitzats (65). S'han descrit cinc possibles vies de transmissió: oral-oral, fecal-oral, gàstric-oral, anal-oral i genital-oral. En un estudi (65) recent es postula la via fecal -oral com la via més freqüent de transmissió. La via gàstric -oral quedaria restringida a la transmissió en nens a través dels vòmits. La resta de vies tenen una freqüència poc rellevant. També s'ha descrit la transmissió a través d'aliments (aigua contaminada, llet no pasteuritzada, aliments crus que han estat rentats amb aigua contaminada o carn (especialment el porc) (65-68). La transmissió a través d'aigua contaminada o d'aliments contaminats és la via més freqüent en països en vies de desenvolupament (65). Es coneix que l'*H. pylori* no resisteix massa temps fora de l'organisme, fet que evidencia que la seva transmissió requereix un contacte interpersonal estret (67). Tot i així alguns estudis indiquen que l'*H. pylori* és capaç de sobreviure en aigua, llet, fruites i verdures fresques i carns fresques per sota dels 30° (66). Per altra banda, qualsevol aliment que presenti un pH entre 4,9 i 6 o que sigui ric en urea (com és el cas de la llet) pot facilitar també la seva supervivència (65). Com a reservoris extra-gàstrics de l'*H. pylori* diferents estudis han demostrat la seva presència en mostres de saliva, llengua, placa dental, teixit amigdalari i en conductes radiculars dentaris (68,69). Una altra font d'infecció són els animals. Diversos autors han investigat la presència de *H. pylori* en gats, gossos, rates i ovelles, sent aquestes últimes un dels reservoris naturals més probable (69).

1.2.2.3. Fisiopatologia i factors de virulència

La infecció per *H. pylori* no causa malaltia en la majoria de les persones infectades, però sí que és un factor de risc per úlcera pèptica, sent el responsable de la majoria de úlceres gàstriques i duodenals. L'any 1994, l'Oficina Internacional de Investigació del Càncer va classificar l'*H. pylori* com a agent carcinogen en humans, re confirmant-se l'any 2009 en base a les dades epidemiològiques del moment (68), i acceptant-se cada cop més, com a causa important de càncer d'estómac i limfoma MALT. També l'any 1994 el Nacional Institute of Health recomanà el tractament de l'*H. pylori* per ser la causa principal de patologia ulcerosa pèptica en l'home. Finalment Marshall i Warren, després de més de 20 anys d'investigació, van ser guardonats amb el premi Nobel de Medicina pel seus innombrables treballs en aquest sentit. Aquest investigadors van trencar un dels dogmes mèdics més arrelats fins aquell moment, que relacionaven de manera històrica l'úlcera pèptica amb els estils de vida i l'estrès.

L'*H. pylori* té la capacitat de colonitzar i sobreviure en un medi tan hostil, com és l'acidesa gàstrica. És precisament aquesta acidesa la que protegeix l'organisme dels múltiples microorganismes que ens arriben constantment per via digestiva. L'*Helicobacter* posseeix una sèrie de mecanismes que li permeten adaptar-se al pH àcid, migrar cap a la capa de mucosa, travessar-la i aconseguir arribar a la mucosa, on desplegarà el seu poder patogènic. Els factors de virulència (Figura 10) més rellevants que li confereixen aquesta alta patogenicitat es detallen a continuació, de manera resumida:

- **Producció d'ureasa:** L'*H. pylori* no sobreviu en medis àcids que presentin un pH menor a 4. La seva capacitat de sobreviure en l'estómac és gràcies a la producció d'ureasa, que hidrolitza la urea en amoni (NH₃) i diòxid de carboni (CO₂) formant un núvol alcalí que l'aïlla de l'acidesa gàstrica (68,70). El NH₃ i el CO₂ difonen cap a l'espai periplasmàtic, on el CO₂, gràcies a l'acció de l'anhidrasa carbònica del periplasma es dissocia en HCO₃⁻ i H⁺, fet que permet una major aclimatació de la bactèria a l'augmentar el pH fins a 6.0. Altres gèrmens, com el *Proteus mirabilis* i l'*Staphylococcus saprophyticus* també són productors d'ureasa (70). Aquest entorn

«alcalí» permet la supervivència de l'*helicobacter* mentre es desplaça a cap a la capa mucosa de l'epiteli gàstric el qual té ja un pH més alt. La capa de moc te per funció protegir la mucosa gàstrica de l'àcid clorhídric segregat per les cèl·lules parietals gàstriques.

- **Estructura helicoidal:** Aquesta estructura permet a l'*H. pylori* enganxar-se a la mucosa gàstrica i travessar-la. L'acidesa gàstrica proporciona una elevada viscoelasticitat a la capa de moc, dificultant l'adherència dels patògens. Amb l'augment del pH gràcies a l'activitat ureàsica del *H. pylori*, aquesta viscositat es perd, facilitant la seva adherència (70). Per altra part, la seva estructura helicoidal li confereix un moviment ràpid, endinsant-se dins la capa de moc, arribant a la part més profunda de la paret, on el pH és més alt. Podríem dir doncs, que el moviment que realitza per penetra la capa de moc, s'assembla al moviment d'un llevataps. Alhora la bactèria sintetitza una proteasa que «digereix» el moc, facilitant la seva penetració (71).
- **Flagels:** L'*H. pylori* presenta entre 2 i 6 flagels que li donen més rapidesa de moviment. Els flagels estan formats per dues subunitats proteiques anomenades Flagelines. La flagelina A (FlaA) que es troba en la regió exterior, i la Flagelina B (FlaB) situada en la base del flagel. Ambdues subunitats són imprescindibles per aconseguir una motilitat ràpida i perfecta (70). El número de flagels també sembla que és important. Alguns estudis han demostrat una velocitat major, en un medi viscos, en bactèries que presentaven 4 flagels en comparació a les que en presentaven 3 (72).
- **Activitat quimiotàctica:** Les cèl·lules de l'epiteli gàstric secreten de manera continua, substàncies químiques com ara la urea, el carbonat sòdic i el carbonat potàssic, que atreuen l'*H. pylori* cap un pH més alt, buscant el seu nínxol ecològic natural (70). Tot i així poc es coneix de l'activitat quimiotàctica del *H. pylori*, tot i que sembla que aquesta disminuiria en $\text{pH} < 3$. Aquest moviment de l'*H. pylori* buscant aquest pH més elevat és possible gràcies a 4

quimiorceptors: TlpA, TlpB, TlpC i TlpD. Aquests quimiorceptors són proteïnes transmembrana, de les quals el TlpB és el que juga un paper més important. Consten de dos dominis, un citoplasmàtic i l'altre periplasmàtic. La seva funció és «conduir» la bactèria cap a la capa mucosa, on el pH com hem dit és més elevat (70,73,74). La inactivació del TlpA i del TlpD ha mostrat disminució de la colonització de *H. pylori* en models animals, demostrant la importància d'aquests quimiorceptors en la infecció (74).

- **Proteïnes de la membrana externa (PME)**

Un cop l'*H. pylori* ha aconseguit arribar a la capa mucosa, cal que s'hi adhereixi. Aquesta adherència ve facilitada per una sèrie de proteïnes que es troben en la seva membrana externa. S'han descrit cinc grans famílies de PME: BabA (HopS), SabA (HopP), OipA (HopH), HopQ i AlpA/B (HopC/B) (73) El mecanisme d'acció de les diferents proteïnes de membrana es mostra en la Taula 6.

- **BabA (*blood antigen binding adhesion*):** es l'adhesina més estudiada i caracteritzada. Interactua amb les cèl·lules epitelials a través dels antígens de Lewis B, fucosilats dels grups sanguinis ABO de l'humà. S'han identificat 3 al·lels bab (babA1, babA2 i babA3), però només el babA2 és funcionalment actiu (71,73). La unió del babA2 amb l'antigen de Lewis produeix el trencament de la doble cadena de DNA, augmentant l'adherència i facilitant el contacte amb la mucosa, provocant una intensa resposta inflamatòria.
- **SabA (*sialic acid binding adhesion*):** Es la segona adhesina millor caracteritzada. El SabA s'uneix als receptors de l'àcid siàlic dels antígens de Lewis-sialyl, que estan expressats en el teixit gàstric inflamat. El SabA s'associa al desenvolupament de metaplàsia intestinals, atrofia gàstrica i neoplàsia gàstrica (71,73,74).
- **OipA (*proteïna de membrana externa inflamatòria*):** Tots els *H. pylori* presenten el gen OipA que codifica per aquesta proteïna, però només alguns *helicobacters* l'expressen. La

OipA, a part de tenir la seva funció d'adhesió, està associada a la resposta proinflamatòria, augmentant la producció de IL8 (73).

- **HopQ:** Aquesta adhesina s'uneix al complexe *Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule* (CEACAM). Aquesta interacció a part de desencadenar resposta inflamatòria, permet la fosforilació i translocació de la oncoproteïna CagA per via T4SS, per mecanisme encara desconegut. El CagA és una de les proteïnes que confereix a l'*Helicobacter* el seu poder oncogènic. Alguns estudis epidemiològics apunten que l'al·lel tipus1 del HopQ és més prevalent en soques de *H. pylori* asiàtiques fet que podria explicar la distribució geogràfica de la neoplàsia gàstrica (75).
- **Alp A/B:** Intervenent també en l'adherència del microorganisme a les cèl·lules epitelials gàstriques, unint-se principalment al col·lagen IV i a la laminina de la matriu extracel·lular. Aquestes proteïnes tenen un rol clar en la colonització, però és dubtós el seu paper en la patogènia de la infecció, ja que la seva implicació en l'activació del CagA i en la producció de IL8 no ha estat encara ben demostrada (73).

Taula 6. Mecanisme d'acció de les proteïnes de membrana externa de l'*H. pylori*. Matsuo et al. (55)

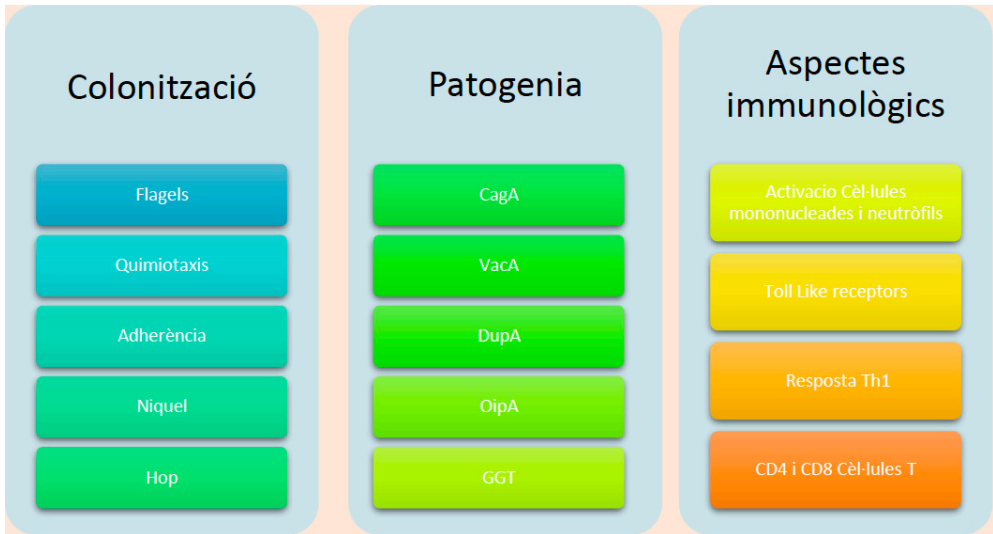
Outer Membrane Protein	Interaction Partner	Suggested Protein Function
BabA (HopS)	Lewis B, Globo H hexaglycosylceramide, Globo A heptaglycosylceramide	Adhesion to host cell, enhancing translocation of CagA via the T4SS
SabA (HopP)	Sialyl Lewis X, Sialyl Lewis A, Lewis X	Adhesion to host cell
OipA (HopH)	Not known	Adhesion, induction of inflammatory cytokine production
HopQ	CEACAM1, 3, 5, 6	Adhesion to host cell, translocation of CagA via the T4SS
AlpA/B (HopC/B)	Collagen IV, Laminin	Adhesion to ECM

- **Lipopolissacàrid (LPS):** El LPS és factor de virulència de baixa toxicitat si el comparem amb el d'altres bacteris gramnegatius. Posseeix en el seu antígen O, els carbohidrats de Lewis «x» (Lex) i/o de Lewis «y» (LeY), els quals tenen la funció d'evadir la resposta immune. durant la colonització de l'epiteli gàstric, ja que produeix un mimetisme molecular que protegeix a la bactèria de la resposta immunitària de l'hoste. El grau d'expressió d'aquests antígen és variable entre soques i dependrà també del pH i del tipus de antígen de Lewis que s'expressi en les cèl·lules epitelials o en les cèl·lules sanguínies (71).
- **Enzims:** L'*H. pylori* sintetitza diversos enzims, com ara mucinases, lipases, proteases, catalases i dismutases que tenen per funció protegir-lo dels metabòlits tòxics procedents de processos oxidatius de defensa per part dels macròfags i dels neutròfils. Produeixen també proteïnes de xoc tèrmic (groEL i groEs) que tenen la capacitat d'augmentar l'activitat ureàsica (71). L'*H. pylori* produeix també l'enzim gamma-glutamil transferasa (GGT) que catalitza la conversió de glutamina en glutamat i amoni, induint l'apoptosi i la necrosi tissular. L'activitat de la GGT s'ha vist augmentada en pacient amb úlcera pèptica (76).
- **Citotoxina vacuolitzant (vacA):** Aquesta citotoxina, codificada pel gen *vacA*, la produeixen tots el *H. pylori*. La seva funció és la vacuolització de la cèl·lula epitelial, a través de la formació de canals transmembrana, induint secundàriament la seva apoptosi. També té la propietat d'alliberar el citocrom C de la mitocòndria, el qual acaba d'ajudar al procés apoptòtic. L'activitat vacuolitzant es presenta en el 50-60% de les soques, malgrat que tot els *H. pylori* presenten el gen *vacA*. Aquesta capacitat vacuolitzant no s'ha trobat en altres espècies d'*helicobacters* ni altres bacteries gramnegatives. El gen *vacA* presenta un mosaicisme genètic basat en diferències al·lèliques que li confereixen més o menys citotoxicitat (71). La presència de *vacA* pot induir també l'expressió

de la proteïna de creixement vascular endotelial (VEGF) implicada en el desenvolupament de processos neoplàsics, per la seva capacitat neoangiogènica.

- **Citotoxina *cagA*:** El gen *cagA* es troba en 60% de les soques d'*H. pylori*. Codifica per la citotoxina *cagA* i és un dels factors de virulència més estudiats. Juga un paper molt rellevant en el desenvolupament de la gastritis atròfica, l'úlcera pèptica i el càncer gàstric. Indueix la producció de citocines inflamatòries, com la IL8 i ajuda al reclutament de leucòcits. El gen *cagA* és el responsable de la síntesi de fosfataxa SHP-2 (*protein tyrosine phosphatase*), relacionada amb la carcinogènesis gàstrica, per contribuir a una proliferació cel·lular excessiva (74).
- **Aspectes immunològics:** La infecció per *H. pylori* engloba tant mecanismes de la immunitat innata com de l'adquirida. Alguns antígens de la bactèria s'uneixen als receptors de membrana de la cèl·lules epitelials gàstriques, els anomenats *toll-like-receptors* (TLRs). Aquesta interacció activa les vies de senyalització i la producció de diferents citocines (76). Com a conseqüència es produeix una infiltració de la mucosa gàstrica per neutròfils i cèl·lules mononucleades, amb activació dels limfòcits CD4 positius i en menys intensitat dels CD8 positius.

La Taula 7 mostra de manera esquemàtica els diferents factors de virulència que intervenen en la infecció per *H. pylori*.

Taula 7. Resum dels factors de virulència de l'*H. pylori*. Adaptat de Brito et al. (76)

En la Figura 12 es mostra de manera esquemàtica la fisiopatologia de la infecció per *H. pylori*.

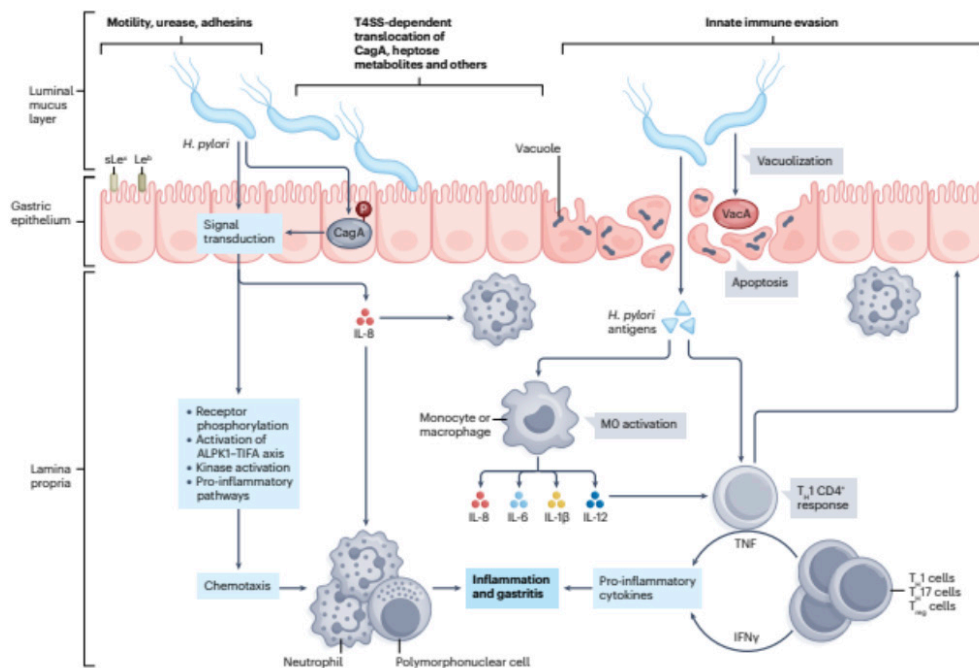


Figura 12. Infecció per *H. pylori* i patogènesi. aspectes claus de la colonització bacteriana inclouen la motilitat flagel·lar, l'activitat ureàsica, els mecanismes d'adhesió i el dany en l'epiteli gàstric a causa de la vacuolització. La citotoxina caga és la responsable de l'activació de diferents vies inflammatòries que induiran a la infiltració de neutròfils i polimorfonuclears (pmn) provocant una gastritis progressiva. Per altra banda la resposta immune de l'hoste es caracteritza per una invasió de la mucosa per pmn seguit d'una activació de la resposta immune innata i adaptativa a través de la interacció del complex T helper 1 (TH1), TH17 i cèl·lules t reguladores (Treg). Font: Malfertheiner et als. (55)

1.2.2. . *Helicobacter pylori* i microbioma

Cada cop existeix més evidència sobre la importància de la microbiota intestinal humana per preservar el nostre estat de salut i mantenir un sistema immune sa i competent. Algunes substàncies produïdes per la microbiota, com ara els àcids grassos de cadena curta, han demostrat que poden modular les vies de la inflamació i la tumorigènesis (77,78). Quan es produeix una alteració de la nostra microbiota per presència de gèrmens patògens o bé per ús d'antibiòtics, pot haver-hi un impacte negatiu en el control de la inflamació i la carcinogènesis (78). La presència d'*H. pylori*

en la mucosa gàstrica es capaç d'alterar el microbioma gàstric i facilitar la inflamació, actuant com a «trigger» de processos neoplàsics (79,80). Clàssicament s'havia pensat que l'estómac era un òrgan estèril degut a que la seva acidesa impedia el creixement de bacteries. Actualment es coneix que no és així. El microbioma gàstric està representat per 4 phyla (*Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*) (78). S'ha observat que en pacients pediàtrics infectats per *H. pylori* hi ha un predomini de bacteroides amb una disminució de Firmicutes i Actinobacteries en comparació amb nens no infectats per *H. pylori* i per tant amb una disminució clara de la diversitat bacteriana habitual ja en edat infantil (81,82). Aquesta disbiosis podria afavorir canvis inflamatoris i precancerosos actuant de manera sinèrgica amb el conegut poder carcinogen de l'*H. pylori* (78).

1.2.2.5. Clínica

La colonització de l'estómac humà per l'*H. pylori* sol produir-se habitualment durant la infantesa, i persisteix durant tota la vida sense el tractament adequat. Totes les persones infectades presenten una resposta inflamatòria i immune davant la bactèria, tot i que aquest fet no es coneix del cert (83). La persistència del germen en la mucosa gàstrica sembla que juga un paper important en les malalties associades a la infecció, com ara la úlcera gàstrica i duodenal, l'adenocarcinoma i el limfoma MALT. Tot i així, la majoria de les persones infectades per *H. pylori* (>80%) mai desenvoluparan cap d'aquestes patologies i romandran asimptomàtiques tota la vida (83). Aquesta dada és de vital importància de cara a evitar el sobretractament, ja que no sempre que hi ha colonització, hi haurà malaltia.

Manifestacions gastrointestinals:

- **Gastritis crònica:** Secundària a la inflamació de l'epiteli gàstric i al dany de la mucosa. La causa més freqüent de la gastritis crònica a nivell mundial és la infecció per *H. pylori*. Generalment la gastritis crònica és asimptomàtica. La infecció produeix una afectació de les cèl·lules D responsables de la producció de Somastostatina (SMS) de manera que hi ha una disminució dels nivells de SMS,

la qual cosa estimula les cèl·lules G de l'antre, que augmenten la producció de gastrina, estimulants a la seva vegada la producció de HCl per les cèl·lules parietals gàstriques. L'augment de l'acidesa afavoreix la úlcera gastro-duodenal (68).

- **Úlcera pèptica:** La patologia ulcerosa és una causa de morbi-mortalitat freqüent a nivell mundial. Sovint cursa també de manera asimptomàtica. Les formes simptomàtiques expressen un ventall de manifestacions clíniques molt amplia: distensió abdominal, epigastràlgia-dispèpsia, sensació de plenitud, nàusees, sacietat precoç i dolor abdominal (68). Les causes més freqüents de úlcus són la infecció per *H. pylori* i el consum de antiinflamatoris no esteroidals (AINES) o ambdós.
- **Càncer gàstric:** El càncer gàstric la cinquena neoplàsia més freqüent a nivell mundial i la tercera causa de mort per etiologia oncològica. Els factors de risc més coneguts de càncer gàstric són la infecció per *H. pylori*, l'edat, l'elevat consum de sal i el baix consum de fruites i vegetals (68). Tal i com s'ha explicat anteriorment, algunes soques d'*H. pylori* expressen factors de virulència amb un elevat poder oncogènic, fet que apunta que la infecció no tractada juntament amb factors ambientals predisponents i determinants genètics de l'hoste poden comportar el desenvolupament de la neoplàsia. Alguns estudis apunten que l'elevat consum de sal afavoreix el creixement de les soques *cagA*, i per tant incrementant el risc oncogènic (68,84-86). Per contra, l'all, la cúrcuma, la vitamina C i aliments rics en licopens sembla que tinguin efecte protector, disminuint la incidència de la infecció i per tant reduint el desenvolupament de neoplàsia gàstrica (87-89). Alguns autors apunten que una dieta rica en verdures i fruites i baixa en sal i carn processada té un alt poder profilàctic en les taxes d'infecció de *H. pylori* i reduint per tant, el risc de neoplàsia gàstrica (68).
- **Limfoma de teixit limfoide associat a mucosa (MALT):** La relació causal entre el limfoma MALT en mucosa gàstrica i la infecció per *H. pylori* s'ha demostrat àmpliament en la literatura. Són limfomes

de baix grau, però que poden evolucionar cap a la neoplàsia. En la etapa precoç del limfoma el tractament inicial (i sovint únic) és la erradicació de la infecció. En fases més avançades serà necessari associar tractament immunosupressors i /o quimioteràpia (90).

Manifestacions extraintestinals:

- **Anèmia ferropènica i dèficit de Vitamina B12:** L'*H. pylori* produeix una hipo/aclorhídria i una atrofia gàstrica. Aquests dos factors redueixen l'absorció correcta del ferro. S'ha vist que aquest dèficit de ferro sembla que és més marcat en pacients infectats que sobreexpressen el gen *sabA* (91), conegut factor de virulència com s'ha referenciat prèviament. Per altra banda, la gastritis atròfica redueix la síntesi de factor intrínsec per la cèl·lula parietal gàstrica (CPG), fet que redueix secundàriament la correcta absorció de vitamina B12, empitjorant l'anèmia (68).
- **Púrpura Trombocitopènica Idiopàtica (PTI):** La PTI és una malaltia autoimmune causada per la producció d'anticossos dirigits contra antígens de superfície de les plaquetes. Diferents estudis han demostrat que en pacients amb PTI i infectats per *H. pylori*, l'erradicació de la infecció ha millorat significativament la plaquetopènia (92,93). El mecanisme d'acció més àmpliament acceptat és la reacció creuada entre els anticossos dirigits contra els antígens de superfície de l'*H. pylori* (sobretot *cagA* i *vac A*) i els antígens de superfície plaquetar (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, and GP Ia/IIa). Un altre mecanisme proposat és la interacció entre la IgG anti-*H. pylori* en pacients infectats i la presència de factor de Von Willebrand present en la membrana cel·lular d'algunes soques de *H. pylori* fet que provocaria l'activació i l'agregació plaquetar, contribuint encara més a la disminució de les plaquetes circulants (94).
- **Halitosis:** la prevalença de l'halitosi varia en la població general entre un 22-50%. Múltiples estudis han intentat demostrar una relació causal entre la infecció per *H. pylori* i la presència de l'halitosi (95,96). Tot i així, donat que la causa més freqüent de l'halitosi és

una deficient higiene buco-dental, no s'ha pogut establir, fins ara una correlació clara amb la infecció ni una millora de l'halitosi amb l'erradicació de l'*H. pylori* en pacients infectats (97).

- **Dolor abdominal recurrent:** No s'ha establert una relació causal entre la infecció per *H. pylori* i el dolor abdominal recurrent sense signes d'alarma (98). Es consideren signes d'alarma el dolor intens en quadrant superior o inferior, hematèmesis, vòmits persistents, pèrdua involuntària de pes, melenes, antecedents familiars o personals de malaltia inflamatòria intestinal etc. .
- **Talla baixa:** Hi ha molts pocs estudis ben dissenyats que avaluïn la relació entre la infecció *H. pylori* i el retard de creixement, i la millora d'aquest amb l'erradicació de la infecció. En l'actualitat es desaconsella la investigació sistemàtica de l'*H. pylori* dins l'estudi del nen amb talla baixa (98).
- En població adulta s'ha intentat relacionar la infecció *H. pylori* amb esteatosi hepàtica no alcohòlica, resistència a la insulina, hepatocarcinoma, litiasis biliar, malaltia de Parkinson, malaltia d'Alzheimer, malaltia cardíoc-vascular, esclerosis múltiple, asma etc. . En totes elles encara que no s'ha establert una relació causal clara a dia d'avui (51).

1.2.2.6. Diagnòstic

Quan cal investigar l'*H. pylori*?

Segons les darreres guies pediàtriques publicades l'any 2017 «Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* in Children and Adolescents» (Update 2016) (98), les recomanacions actuals per investigar la infecció per *H. pylori* en pediatria serien les següents:

- Pacients amb úlcera gàstrica o duodenal.
- Anèmia ferropènica refractària al tractament amb ferro, havent descartat prèviament altres causes malabsortives.

- PTI crònica (PTI_c), entenent com a crònica una durada superior a 6 mesos i que no ha respòs al tractament convencional.
- No es recomana la investigació de *H. pylori* en nens amb talla baixa, dolor abdominal recurrent, antecedents familiars de neoplàsia gàstrica o limfoma MALT i com a estudi inicial d'anèmia ferropènica.

Tècniques diagnòstiques

El diagnòstic de la infecció per *H. pylori* es pot realitzar a través de tècniques no invasives o tècniques invasives. Entenem com a no-invasives, mètodes indirectes que no permeten la comprovació directa de la infecció i per tant, són mètodes menys específics i amb un valor predictiu positiu (VPP) molt més baix, que aquelles tècniques que si permeten la visualització del germen o la comprovació directa de la seva presència en mucosa gàstrica. Els mètodes invasius requereixen de la realització d'una fibrogastroscòpia (FGS).

Test no invasius

- Test de l'alè o de urea 13 (TAU-C¹³)

Es basa en la capacitat de l'*H. pylori* de produir ureasa. S'administra urea marcada amb Carboni 13 (¹³C-urea) per via oral. En cas d'haver-hi *H. pylori* en l'estómac, la ureasa que produeix catalitza la hidròlisi de la ¹³C-urea, donant lloc a diòxid de carboni marcat (¹³CO₂) i amoni.



El ¹³CO₂ marcat s'absorbeix i difon cap al pulmó, on s'excreta juntament amb CO₂ fisiològic, detectant-se en l'aire espirat, mitjançant un espectròmetre de masses (99). Hi ha altres gèrmens, a part de l'*H. pylori*, capaços de produir ureasa, com seria el cas de la *Klebsiella pneumoniae* i el *Proteus mirabilis*, presents en la cavitat oral. Per tant la presència d'aquestes bacteries pot donar resultats falsos positius (100). Per contra, el tractament previ amb

fàrmacs inhibidors de bomba de protons (IBP) o el tractament amb antibiòtics poden negativitzar la prova, donant lloc a falsos negatius. En aquest cas, es recomana suspendre el tractament entre 2 i 4 setmanes abans de la realització de la seva realització. No hi ha dades en el seu ús en nens menors de 6 anys.

- Antigen *H. pylori* en femta (SAT)

La sensibilitat i especificitat de l'Antigen d'*H. pylori* en femta (SAT) es del 92-94% i 94-97% respectivament (101,102). Es una prova fàcil i barata de realitzar que permet per altra banda, emmagatzemar les mostres congelades. Hi ha diversos mètodes desenvolupats per detectar l'antigen *H. pylori* en les mostres fecals, com ara l'Immunoassaig enzimàtic (EIA), la Immunocromatografia (ICA) (103,104) i darrerament la quimioluminiscència (CLIA) (105), que permet automatitzar el procés. En tots els mètodes es poden utilitzar anticossos monoclonals o policlonals. Els anticossos monoclonals presenten en general una sensibilitat més elevada (104,106,107). No s'han vist diferències per edat, ni per presència de sang en femta ni per tractament previ amb IBP (69, (108,109), tot i que hi ha estudis que refereixen que la precisió del SAT si que es pot alterar per tractament previ amb IBP, sagnat digestiu alt o per tractament amb N-acetil-cisteïna (109,110). Cal tenir en compte també que la conservació deficient de la mostra (elevat temps de transport i temperatura per sobre 25°) pot disminuir també la seva sensibilitat (109).

- Serologia

Com tota infecció l'*H. pylori* desencadena tant resposta immunològica com producció d'anticossos. En les primeres fases de la infecció es produeix IgA, IgM i IgG mentre que en la fase crònica s'observa bàsicament producció de IgA i IgG. La IgA i la IgG està present en sèrum, orina i saliva. No és un test útil per discriminar infecció activa, tenint un valor predictiu positiu molt baix. Es desaconsella com a tècnica diagnòstica de la infecció per *H. pylori* en tots els grups d'edat (100). Per altra

banda, tampoc és útil pel control post-erradicació, ja que la IgG es manté positiva tot i haver erradicat l'*H. pylori* (111).

Test invasius

Els tests invasius es consideren el gold standard per la detecció de l'*H. pylori* tant en nens com en adults en comparació als test no invasius, ja que cap d'aquest darrers mètodes permeten demostrar la presència real de la bactèria en mucosa gàstrica. Els mètodes invasius requereixen de la realització d'una FGS per tal de poder obtenir biòpsies de diferents localitzacions i realitzar tant estudi microbiològic com histològic. Les guies actuals (98) recomanen la presa d'un mínim de 6 biòpsies: 2 biòpsies d'antre i 2 de cos gàstric per realitzar estudi anatomo-patològic a fi d'aplicar la *Update Sydney System* (112) i com a mínim una biòpsia d'antre i una de cos per estudi microbiològic. També es recomana una biòpsia extra per realitzar estudis complementaris, com ara el Clotest®.

Amb les mostres de mucosa gàstrica obtingudes es poden realitzar els següents estudis: Estudi histològic, estudi microbiològic i test ràpid de la ureasa.

- Estudi histològic

L'examen histològic proporciona una valoració completa de la mucosa gàstrica i per tant permet realitzar un diagnòstic més precís. La confirmació histològica de la inflamació de la mucosa és fonamental pel diagnòstic de la gastritis i la seva classificació, detectant al mateix temps zones de metaplàsia intestinal. Els canvis histològics de la gastritis aguda i crònica s'avaluen seguint la classificació de la Sydney System. Aquesta classificació pretén definir les gastritis en funció del grau d'infiltració de cèl·lules mononuclears, del grau d'activació dels neutròfils, del grau d'atròfia glandular i del grau de metaplàsia, classificant en lleu, moderada o severa alhora que també valora la densitat de *H. pylori* present en la mucosa (113) (Taula 8). En la Figura 13 es mostra d'una manera gràfica una escala visual dels diferents graus de gastritis.

Taula 8. Update Sydney Classification for chronic gastritis. Do Lh et al. (113)

Histologic properties	Definition	Grade		
		Mild	Moderate	Severe
Inflammation	Lymphocyte and plasma cell in lamina propria	1+	Chronic inflammation	Lymphocyte and plasma cell in lamina propria
Neutrophil activation	Neutrophilic infiltration in lamina propria or superficial epithelium	<1/3	Neutrophil activation	Neutrophilic infiltration in lamina propria or superficial epithelium
Glandular atrophy	Loss of corpus and antral glands	1+	Glandular atrophy	Loss of corpus and antral glands
Intestinal metaplasia	Intestinal metaplasia of mucosal epithelium	<1/3	Intestinal metaplasia	Intestinal metaplasia of mucosal epithelium
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i> intensity	1+	2+	3+

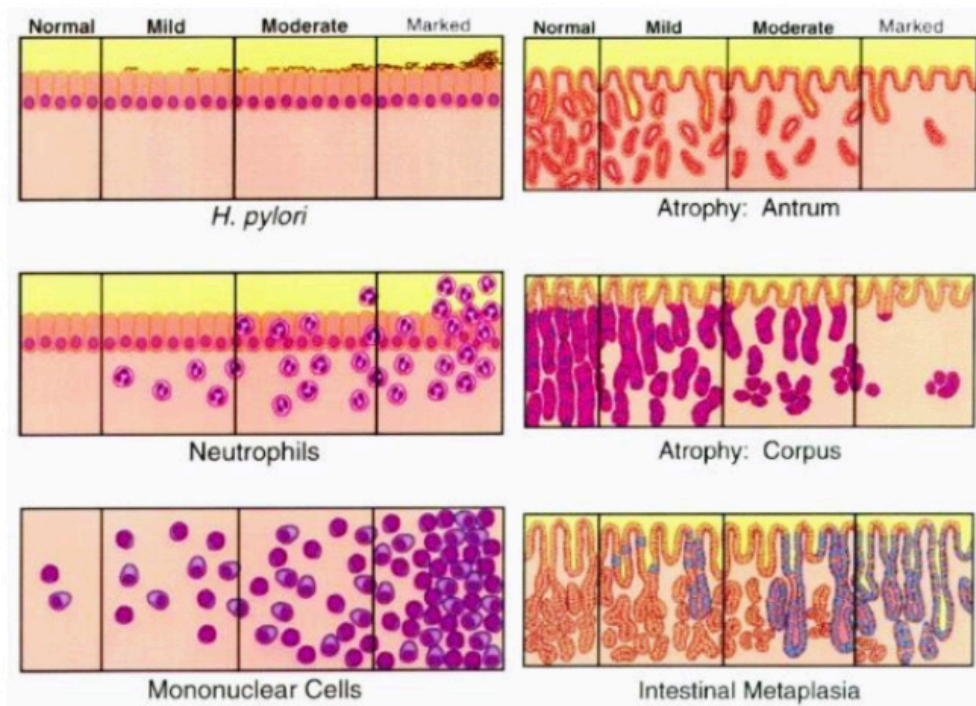


Figura 13. Escala visual analògica per la classificació de les gastritis segons la Sydney System. Sipponen et al. (112)

La identificació del *H. pylori* per histologia es determina bàsicament per dues tècniques: la tinció d'Hematoxilina&Eosina (H&E) i la Immunohistoquímica (IHQ).

1. Tinció Hematoxilina&Eosina

Es la tècnica standard i de rutina per la valoració de la inflamació de la mucosa alhora que permet valorar també la presència de *H. pylori*. La sensibilitat de la tinció de hematoxilina&Eosina (H&E) és entre el 70-95%, podent millorar aquestes taxes si s'augmenta el temps d'exposició a l'hematoxilina (114). L'especificitat de la tinció per *H. pylori* també és molt alta (100%). En cas de poca densitat bacteriana o de morfologia habitual alterada, la H&E pot presentar falsos negatius, havent de realitzar aleshores altres tècniques com la Immunohistoquímica (IHQ) (100,114). S'ha descrit que després de tractament amb fàrmacs inhibidors de bomba de protons (IBP), *H. pylori* pot adoptar una estructura més «cocoide», complicant la seva identificació. S'ha descrit una taxa de falsos negatius del 30% després del tractament amb IBP (115). Una altra desavantatge a tenir en compte de la H&E és que aquesta tinció no marca de manera específica la bactèria i tendeix a deteriorar-se amb el temps, la qual cosa dificulta la re-avaluació de la mostra (116). Tot i així en presència d'abundants bacteris, i amb estructura conservada, no hi ha diferències significatives entre la tinció H&E i la IHQ, sent d'elecció en aquest casos la H&E (Taula 9).

2. Tècnica Immunohistoquímica (IHQ)

La tinció de IHQ s'ha convertit en l'standard d'equivalència per la detecció de *H. pylori*, mostrant una sensibilitat i una especificitat del 100% en múltiples estudis (117-119). La desavantatge principal és el seu alt cost i la no disponibilitat en molts països. La tècnica de IHQ utilitza anticossos policlonals de conill específics contra antígens termoestables que només presenta *H. pylori*, marcant el bacteri de manera específica i prolongada, ja que no es deteriora amb el pas del temps, a diferència de la tinció H&E (116).

Taula 9. Comparació entre la tinció d'hematoxilina-eosina (H&E) i la immunohistoquímica (IHQ) per detectar *H. pylori* en mucosa gàstrica. Adaptat de Batts et al (120)

Comparació entre H&E i IHQ per detectar <i>H.pylori</i> en biòpsies gàstriques			
Conclusions d'estudi	Hartman et al (83) (%)	Smith et al (82) (%)	Wang et al (81) (%)
Sensibilitat H&E	93	91	95-100
Especificitat H&E	100	100	100
Sensibilitat immunohistoquímica	97-100	100	100
Especificitat immunohistoquímica	100	100	100

3. Tinció amb Giemsa

La tinció amb Giemsa és barata i és la tècnica d'elecció en molts laboratoris de Anatomia Patològica. La seva sensibilitat és similar a la tinció de H&E (120).

4. Tincions de plata

Actualment en desús en la majoria de centres degut a la seva laboriositat.

Estudi microbiològic

L'estudi microbiològic es fonamenta sobretot en les tècniques tradicionals de cultiu i recentment amb les tècniques de biologia molecular basades en la Real-Time PCR.

1. Cultiu microbiològic

L'*H. pylori* és un microorganisme molt làbil. L'èxit del cultiu i de l'aïllament de l'*H. pylori* de les biòpsies gàstriques és una tasca desafiant que depèn de múltiples factors que poden dificultar el creixement de la bactèria, com ara la presència de flora comensal, l'interval de temps entre l'obtenció de la mostra i el seu processament, el medi de transport fins arribar al laboratori, la temperatura, la contaminació de la pines de biòpsia amb formol etc. (121). Hi ha també factors del propi hoste que poden dificultar el rendiment del cultiu, com ara presència de gastritis aguda amb alta activitat, sagnat en tracte digestiu alt, consum

d'alcohol, i ús de fàrmacs (IBP, antagonistes receptor H2, antibiòtics) (98,101,115,122,123). Es per aquest motiu que la ESPGHAN ha publicat recentment un protocol (98) sobre la recollida de mostres gàstriques a fi de millorar les taxes de rendiment dels cultius. En aquest document en el que es fa especial èmfasis en els següents aspectes:

- Assegurar que el pacient no ha pres antibiòtics en les darreres 4 setmanes prèvia a la realització de la FGS i per tant de l'obtenció de mostres per cultiu.
- Suspendre el tractament amb IBP al menys dues setmanes abans de la realització de la FGS, ja que els IBP suprimeixen la replicació de l'*H. pylori*.
- Obtenir varies mostres de diferents trams: 2 biòpsies d'antre i 2 biòpsies de cos abans de passar a duodè i abans d'agafar mostres per histologia (possible contaminació del material d'endoscòpia per formol).
- Introduir les biòpsies en un medi selectiu de transport o en 1-2 mL de sèrum salí fisiològic (SSF) i mantenir en nevera a 4° fins a ser enviada al laboratori de microbiologia.
- Entregar la mostra en mà al microbiòleg a fi de realitzar la sembra el més ràpid possible al laboratori.
- En cas de no ser possible el processament immediat, cal congelar les mostres a -80°.

El *H. pylori* és capaç de créixer en diversos medis de cultiu suplementats amb diversos factors per afavoreix el seu creixement. Es un microorganisme que requereix atmosfera microaeròfila amb una humitat del 95%. Per considerar el cultiu com a negatiu es recomana una incubació de fins a 10 dies. Els medis de cultiu sòlids més freqüents són l'agar Mueller-Hinton i agar Columbia suplementats amb nutrients derivats de la sang, sèrum de cavall, lisat d'eritròcits i hemina, extracte de llevat o sèrum boví fetal entre altres. Amb l'objectiu d'evitar el sobrecreixement d'altres bacteris que poden acompanyar el *H. pylori*, pot ser necessari també l'ús de inhibidors que no afectin la seva viabilitat, com ara la vancomicina, el sulfametoxazol,

el trimetoprim als quals l'*H. pylori* és resistent *in vitro* (124,125). El cultiu de l'*H. pylori* presenta una especificitat del 100% però una sensibilitat molt variable (depenent de les condicions de recollida, de transport, temps d'exposició a medi aerobi i condicions inherents al propi laboratori (101,121). Aquesta sensibilitat pot variar entre el 40-80% (101,115), tot i que en alguns centres de referència concrets reporten taxes de sensibilitat del 90% (126). Per altra banda, s'han realitzat estudis en cultius de mostres d'obtenció menys invasiva, com ara saliva, suc gàstric o femta amb resultats variables i poc extrapolables a la pràctica clínica real (126). El darrer Maastricht VI/Florence consensus de l'any 2022 (127) afirma que el gold standard per testar la sensibilitat antibiòtica continuen sent les tècniques basades en el cultiu, però donada la seva escassa sensibilitat i la inversió de temps que requereix, insisteixen en la importància d'avançar en la investigació de mètodes cultiu-independent que permetin estudiar les resistències antibiòtiques de manera més efectiva, com ara les tècniques de biologia molecular.

2. Tècniques de biologia molecular: Real-Time PCR

La Real-Time PCR presenta una sensibilitat i una especificitat superior al 95%. És una tècnica que permet detectar *H. pylori* en situacions on el cultiu i el test ràpid de la ureasa presenten més taxes de falsos negatius, com és el cas de pacients amb sagnat digestiu o bé en casos de poca càrrega bacteriana (101,128). Altres avantatges de la Real-time PCR és que permet l'obtenció de resultats de manera ràpida i no requereix especials condicions de transport, a diferència del cultiu. Momtaz et al (129) van comparar genotips de l'*H. pylori* de mostres de saliva, placa dental, biòpsia gàstrica i femta, demostrant una gran variabilitat de genotips en les diferents mostres d'un mateix pacient, fent palès que una mateixa persona pot presentar diferents soques de *H. pylori* de manera simultània. Aquest fet impossibilita l'extrapolació de resultats obtinguts de mostres de fàcil accés (saliva, placa dental, femta) amb la presència de lesió gàstrica secundària a la infecció. Per tant, en l'actualitat la mostra òptima per realitzar Real-time PCR continua sent la mucosa gàstrica. Per una altra banda la PCR permet també la detecció de mutacions que confereixen resistència antibiòtica,

sobretot per macròlids i fluoroquinolones, així com també la possibilitat de identificar factors de virulència com el CagA i VacA. Les mutacions genètiques responsables de la resistència antibiòtica més conegudes fins al moment són les següents: Claritromicina (23S rRNA), quinolones (*gyrA* gene), tetraciclina (16S rRNA), rifabutina (*rpoB* gene) i amoxicil·lina (*pbp-1a* gene). La resistència al metronidazol és molt més complexa i no depèn només de mutacions concretes. Actualment existeixen pocs kits comercialitzats que permetin la detecció de les diferents resistències antibiòtiques, a excepció de la claritromicina, de la qual si que hi ha més opcions comercialitzades (130).

A continuació es detallen els mecanismes d'acció dels principals antibiòtics que s'utilitzen pel tractament de l'*H. pylori* i dels mecanismes de resistència que la bactèria ha aconseguit desenvolupar.

Resistència a claritromicina i quinolones

Les mutacions genètiques que confereixen resistència a la claritromicina i a les quinolones són les que estan més ben caracteritzades a data d'avui. En comparació a altres macròlids, la claritromicina és la que presenta una major estabilitat en medi àcid i per aquest motiu és el macròlid més àmpliament usat en les pautes de tractament erradicador de l'*H. pylori* (131). La resistència a la claritromicina es deu, amb excepcions puntuals, bàsicament a tres mutacions (A2142C, A2142G i A2143G) de la subunitat ribosomal 23S codificat pel gen del RNAs 23S (normalment dues còpies per soca). La claritromicina s'uneix a la subunitat 23S del ribosoma bacterià, inhibint la seva funció i impeding la síntesi proteica (130). Una mutació a aquest nivell impossibilita la unió de la claritromicina a la subunitat 23S i per tant la seva acció antibacteriana queda inhabilitada. Aquestes mutacions són fàcilment detectables per tècniques de biologia molecular a partir de mostres de mucosa gàstrica (127,132). Les mutacions A2142C i A2143 G són les responsables de més del 90% de la resistència a claritromicina en països desenvolupats (133). Un altre mecanisme de resistència descrit és un sistema de bombes que faciliten la sortida d'agents antimicrobians (entre ells la claritromicina) de l'interior de la bactèria, reduint la seva concentració intracel·lular. Aquest mecanisme és conegut

com a «multidrug efflux pumps» i és un dels mecanismes responsables de resistència a macròlids en bacteris Gram-negatius el que s'ha proposat també per l'*H. pylori* (133,134).

En el cas de la levofloxacina, la mutació es troba en el gen de la girasa *gyrA* (127). La levofloxacina inhibeix la DNA girasa i per tant altera la síntesi del DNA bacterià, impedit la replicació de la bactèria (135) Els mecanismes de resistència d'ambdós fàrmacs queden detallats en la Figura 14.

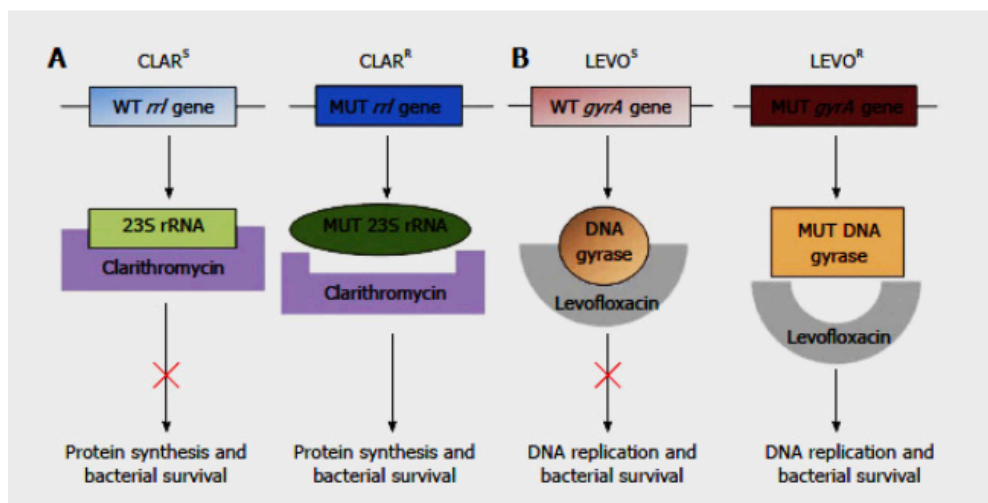


Figura 14. A: Mecanisme d'acció de la claritromicina; B Mecanisme d'acció de la levofloxacina. CLAR^S: Claritromicin sensible; CLAR^R:Claritromicin resistent. LEVO^S: Levofloxacina sensible. LEVO^R:Levofloxacina Resistent; MUT: mutació. Font: Smith et al. (130)

Resistència a tetraciclines i rifampicina

La tetraciclina actua unint-se a la subunitat 30S del ribosoma microbià, inhibint la síntesi proteica. Es ben conegut que mutacions en el gen 16S rRNA impossibiliten la unió del fàrmac al ribosoma, i per tant bloquegen el seu mecanisme d'acció (131). Tot i així alguns estudis han mostrat resistència a tetraciclina tot i absència de la mutació en 16S rRNA, fet que confirma que la resistència pot ser multifactorial, incloent tant alteracions en la unió al ribosoma com alteracions en la permeabilitat de la membrana (136). Per altra banda, la rifabutina (RBU) (derivat semi-sintètic de la rifampicina) ha mostrat també activitat contra bacteries tant gram-positives com gram-

negatives, formant part de tractaments de segona línia per l'erradicació de *H. pylori*. La RBU s'uneix a la subunitat- β de la RNA polimerasa DNA-dependen (*rpoB* RNA) inhibint la transcripció i comportant la mort de la bactèria (137). Mutacions en el gen *rpoB* RNA polimerasa conferiran per tant resistència al fàrmac (131).

Resistència a penicil·lines

L'amoxicil·lina és un antibiòtic fonamental en la teràpia erradicadora de *H. pylori*, formant part de totes les pautes de primera línia (98,127,138). L'amoxicil·lina s'uneix a les Proteïnes d'unió a la Penicil·lina (PBPs acrònim de *penicillin binding proteins*). Les PBPs estan localitzades en la superfície de la membrana bacteriana, facilitant l'entrada de l'antibiòtic a l'interior del microorganisme. Un cop dins, el fàrmac bloqueja la síntesi de la paret bacteriana, provocant un desequilibri osmòtic que acabarà amb la lisis cel·lular. El mecanisme de resistència que *H. pylori* ha creat enfront les penicil·lines consisteix en mutacions de les PBPs, principalment la PBP1 que és la que presenta major afinitat per l'amoxicil·lina (139).

Resistència a metronidazol

El metronidazol (MTZ) és un nitroimidazol que s'administra en forma de pro-fàrmac, de manera que és necessària la seva reducció, que es du a terme per determinades nitroreductases com la piruvat-ferredoxina-oxidoreductasa microbiana, per passar a la forma activa (131). Un cop activat, el MTZ produeix radicals nitrosos que causen la ruptura de les cadenes del DNA bacterià induint la mort cel·lular. El mecanisme pel qual *H. pylori* aconsegueix la resistència és complex i múltiple (135). Com a mínim s'han descrit 4 mecanismes de resistència diferents: 1 presència de bombes de flux que faciliten la sortida del metronidazol de l'interior de la bactèria. 2 mutació dels gens responsables de la síntesi de les nitroreductases que activen el fàrmac. 3 estimulació de l'activitat del sistema de destrucció de radicals lliures. 4 augment de l'activitat dels enzims responsables de la reparació de DNA (Figura 15). En soques *H. pylori* resistents a MTZ s'ha observat una sobre expressió de la superòxid dismutasa, la qual redueix els radicals lliures produïts per l'acció del metronidazol (140).

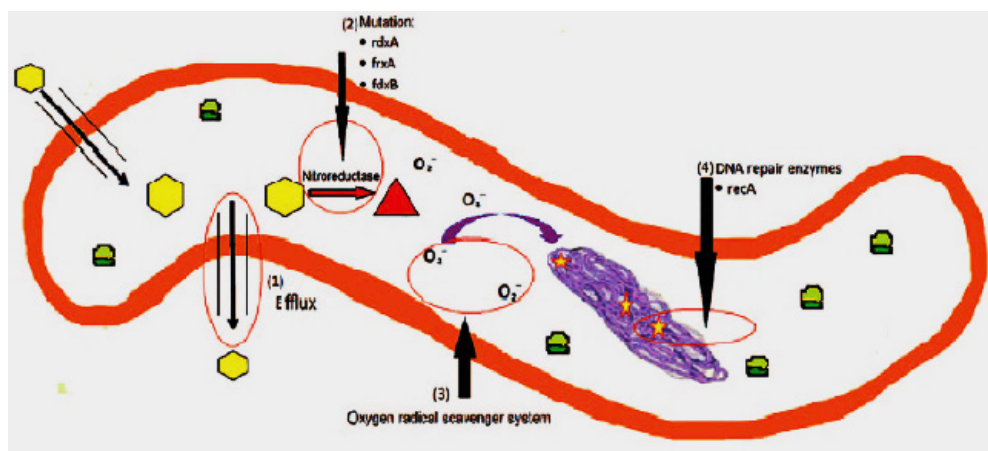


Figura 15. Mecanismes de resistència de l'*H. pylori* a metronidazol.
Font: Alba et al. (135)

Evolució de les resistències desenvolupades per l'*H. pylori*

Segons dades del Registre Europeu de *H. pylori* (Hp-EuReg), actualment la resistència a claritromicina, metronidazol i levofloxacino són del 25 %,30% i 20% respectivament. Les resistències a tetraciclines i a amoxicil·lina són mínimes, situant-se per sota del 1% (55). Les guies internacionals recomanen abandonar els tractament amb claritromicina en àrees on la resistència a claritromicina sigui superior al 15% (141). En àrees del Sud d'Europa s'han observat taxes de resistència a claritromicina del 30% i a Xina fins al 50% (142).

La resistència a metronidazol és superior al 25% en molts països, però el seu impacte es menor pel que fa a l'eficàcia del tractament quan s'utilitza formant part de teràpies triples o quàdruples, ja que existeix una incongruència entre els resultats in vitro i la seva eficàcia clínica in vivo, sobretot amb el sinergisme que presenta quan s'associa a sals de bismut (55,143).

- **Test ràpid de la ureasa (RUT)**

El test ràpid de la ureasa (RUT) és una eina diagnòstica molt útil, que es basa en un gel d'agar que conté urea i un indicador de pH. Sobre el gel d'agar es col·loca la mostra de biòpsia gàstrica.

En presència de *H. pylori* productor d'ureasa, es produeix una alcalinització del pH secundària al desdoblament de la urea en amoni i bicarbonat. El canvi de pH es tradueix en un canvi colorimètric de groc a vermell, que ens indica la positivitat de la prova. El resultat es llegeix en un termini de temps de màxim 24 hores, obtenint per tant un diagnòstic més ràpid que les tincions histològiques i que els mètodes microbiològics (144). Segons diferents autors la seva sensibilitat és del 75-100% i la seva taxa d'especificitat varia entre el 85-100% (145,146). La sensibilitat del RUT està influenciada per la densitat bacteriana que contingui la mostra i de la seva viabilitat. Cal un mínim de 10^4 colònies de microorganismes per positivitzar el test. Una baixa densitat de bactèries es pot donar en condicions post-tractament antibiòtic, en sagnat digestiu, consum de IBP i d'antagonistes de receptor H_2 (145). Tot i aquest inconvenients, el RUT presenta diverses avantatges com ara el seu baix cost, la seva rapidesa i la seva facilitat de realització, que fan que esdevingui una eina molt útil en el diagnòstic de la infecció per *H. pylori*. En Taula 10 es resumeixen les avantatges, limitacions, sensibilitat i especificitat dels diferents mètodes diagnòstics.

Taula 10. Comparativa dels mètodes diagnòstics invasius i no invasius de la infecció *H. pylori*

Mètodes	Avantatges	Limitacions	Sensibilitat	Especificitat	
No invasives	Test alè TAU-C ¹³	Alta precisió; útil abans i després tractament	Baixa especificitat i alts resultats falsos positius en nens petits (<6 anys), falsos negatius en pacients receptors bismut, antibiòtics	75-100%	77-100%
	Prova antígen en femta (SAT)	Ràpid, fàcil i rendible; no edat dependent; útil abans i després tractament	Resultats falsos negatius en en pacients receptors bismut, antibiòtics; dependència precisió valor punt de tall i estat del tractament	67-100%	61-100%
	Serologia	Barat; àmpliament disponible	Incapacita per detectar infecció aguda versus crònica; baixa sensibilitat en nens; no fiable per confirmar eradicació infecció	85%	79%
Invasives	Histologia	Observa grau d'atròfia; taxes d'inflamació; metaplàsia intestinal gàstrica i malignitat	Observador depenent; requereix temps; necessitat d'habilitats especials i costos; Falsos negatius en càrregues bacterianes baixes per presa prèvia d'antibiòtics o IBP	66-100%	94-100%
	Test ràpid ureasa	Alta sensibilitat (80%) i especificitat (100%); ràpid, barat	Dependència precisió segons nombre i localització biòpsies, densitat de bacteria	75-100%	84-100%
	Cultiu	Determinació patró de resistència antimicrobiana; alta especificitat	Car; requereix temps; depèn d'habilitats del professional i medi de cultiu	55-65%	100%
	Reacció en cadena de polimerasa	Ràpida; alta sensibilitat i especificitat; determinació de susceptibilitat antimicrobiana	Resultats falsos positius degut a la detecció de DNA de bacteries mortes	75-100%	84-100%

La necessitat actual d'obtenir mostres gàstriques per realitzar els mètodes de sensibilitat antibiòtica, obliga a la realització de test invasius a fi de poder prescriure una teràpia dirigida i eficaç. L'endoscòpia és un procediment lent, car i que no està a l'abast de tots els centres. Es per aquest motiu, que en els darrers anys s'estan desenvolupant tècniques per determinar la sensibilitat antibiòtica en mostres de fàcil obtenció, com poden ser les mostres fecals. Aquest mètodes es basen en el mateix principi que la prova d'antigen en femta. Les tècniques de PCR poden detectar canvis en el DNA que es correlacionen amb la resistència antibiòtica. Actualment aquest kits només estan comercialitzats als Estats

Units i de moment només determinen la resistència a claritomicina. A data d'avui encara no es disposen de kits per avaluar la sensibilitat a la resta d'antibiòtics (147). En aquest sentit les NGS permeten conèixer la susceptibilitat antibiòtica en tot tipus de mostra, i per tant també en mostres fecals, tant fresca com congelada. Les NGS són capaces d'obtenir la informació sobre les resistències dels sis antibiòtics més usats (amoxicil·lina, metronidazol, claritromicina, levofloxacino, tetraciclina i rifabutina) (147) Aquests avenços en el camp de la microbiologia obren un nou escenari tant en el diagnòstic com en el tractament de la infecció per *H. pylori*, simplificant el seu maneig alhora que permetran millorar significativament les taxes d'erradicació al poder realitzar un tractament dirigit basat en mostres de fàcil obtenció, com són les mostres fecals.

1.2.2.7. Tractament

L'*H. pylori* infecta el 50% de la població mundial i fins a un 90% de la població de països en vies de desenvolupament, afectant a més de 4 bilions de persones. Establir unes pautes de tractament homogènies per a una infecció tant estesa és molt difícil, ja que cada continent, país i inclús cada zona geogràfica del mateix país poden tenir i tenen patrons de resistència també diferents (148). Per optimitzar el millor possible el maneig de la infecció, és imprescindible el coneixement dels patrons de resistència locals i individuals a fi de realitzar un tractament dirigit i eficaç, evitant l'empirisme.

Hi ha múltiples guies de maneig de l'*H. pylori* amb recomanacions de tractament de primera línia en població adulta: Maastricht V/ Florence Consensus Report (Europa) (127), Toronto Consensus (141), i l'American College of Gastroenterology Clinical Guideline (149) (Nord-Amèrica). Les guies europees i americanes recomanen quàdruple teràpia, amb o sense bismut, durant 10-14 dies en àrees resistents a claritromicina. Les pautes que contenen bismut inclouen, a part del bismut, IBP a dosis altes i dos antibiòtics (bàsicament metronidazol i tetraciclins). Les pautes que no contenen bismut, inclouen IBP a dosis altes i tres antibiòtics (clàssicament amoxicil·lina, claritromicina i metronidazol). Amb aquestes

pautes l'objectiu és aconseguir taxes d'erradicació >90%. En l'European Registry on *Helicobacter pylori* management (Hp-EuReg) (150) es va analitzar el tractament de l'*H. pylori* durant un període de 5 anys (2013-2018), incloent un total de 21.533 pacients. Van evidenciar més de 100 pautes de tractament de primera línia diferents, 2/3 amb triple teràpia i 1/3 quàdruple teràpia i règims de tractament inferiors a 10 dies, amb fortes diferències regionals. Aquest estudi evidencia la falta d'adherència als darrers consens, on es recomana el switch de triple a quàdruple teràpia i durades de tractament no inferiors a 10 dies. Aquesta manca d'actualització en la pràctica clínica real provoca una baixa taxa d'erradicació (<80%), lluny de l'actual llinar d'acceptació proposat en >90%. En aquest mateix registre, s'evidencia que en les àrees on si es van aplicar les recomanacions actualitzades, van millorar clarament les taxes d'eficàcia, aconseguint un 90% d'erradicació de la infecció. Aquest registre a més, mostra un alt ús de claritromicina, que fins i tot en pautes de 14 dies, presenta una eficàcia inferior al 50%. Tot i que els llinars de resistència a la claritromicina no estan estudiats en totes les àrees geogràfiques, es considera àrea CLAR-resistent si mostren taxes de resistència >15%-20% (135,151). A Espanya, Alarcón et al. (152), van definir l'any 2016 unes taxes de resistència a Claritromicina del 51%, a metronidazol del 39%, a amoxicil·lina del 8,5%, a tetraciclins del 0,6% i a levofloxacino del 6,7 %. Les guies europees actuals només recomanen l'ús de la claritromicina en les zones que mostren una resistència <15% i en pacients que no hagin rebut macròlids (153). A Àsia, la Chinese guideline recomana en cas de tractament empíric, pautes de 10-14 dies amb teràpia quàdruple (154). A Àsia presenten una alta taxa de resistència a claritromicina (20-50%), a metronidazol (40-70%) i a levofloxacino (20-50%) (130). Tot i així, en el cas de les Korean (155) i Japanese (156) guidelines es continua recomanant triple teràpia amb claritromicina com a tractament de primera línia, tot i que especifiquen que en cas de no conèixer sensibilitat antibiòtica, s'optin per pautes que incloguin metronidazol.

A part de la antibioticoteràpia, la pedra angular del tractament erradicador és la supressió àcida. El tractament amb inhibidors de bomba de protons (IBP), com el omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, pantoprazol

o rabeprazol a dosis doble a l'standard és essencial per provocar una supressió àcida potent, amb l'objectiu d'aconseguir i mantenir un pH intragàstric igual o superior a 6. Aquest augment del pH optimitza l'estabilitat, la biodisponibilitat i l'eficàcia dels antibiòtics (55,157). Els IBP de nova generació com l'esomeprazol o el rabeprazol han mostrat taxes d'erradicació de *H. pylori* superiors als obtinguts amb els IBP de primera generació (com l'omeprazol). Aquest benefici s'ha observat sobretot en pautes amb esomeprazol a dosis de 40mg al dia i en aquells pacients metabolitzadors ràpids de la CYP2C19, en els quals l'omeprazol a dosis standard és menys eficaç. Tot i així en l'actualitat no hi ha recomanacions clares del l'ús d'esomeprazol o rabeprazol com a pauta inicial en la infecció per *H. pylori* (158). Tots els IBP, excepte el rabeprazol es metabolitzen a nivell hepàtic per la via del citocrom CYP2C19. Aquest isoenzim presenta una distribució molt polimòrfica, existint una gran variabilitat inter-individual. Segons la seva activitat, la població general es divideix en metabolitzadors ràpids i en metabolitzadors lents (159). Els metabolitzadors ràpids o ultraràpids requereixen dosis de IBP més altes (sobretot afecta més a omeprazol i lansoprazol, afectant menys a l'esomeprazol (ja que té una vida mitja més llarga) i no afectant gens al rabeprazol), mentre que els metabolitzadors lents, amb dosis standard assolixen una bona supressió àcida. Aquesta variabilitat en l'activitat enzimàtica canvia considerablement segons l'ètnia (157) (Taula 11). El 60% dels caucàsics són metabolitzadors ràpids, ultraràpids o normals mentre que el 60% dels asiàtics són metabolitzadors intermitjos o lents (159). En l'actualitat no hi ha cap guia disponible sobre la necessitat del genotipar el gen de la CYP2C19 en el pacients infectats per saber si són metabolitzadors ràpids o no (160). Per tant les recomanacions actuals suggereixen dosis altes (dobles) de IBP en totes les pautes de tractament de la infecció per *H. pylori*, excepte en el cas que el IBP prescrit sigui el rabeprazol (157,158). Altres antiàcids, com els antagonistes de la histamina (anti H2) han quedat totalment obsolets i no tenen cap paper en el tractament de la infecció per *H. pylori*, ja que el seu poder antiàcid és molt menor. Tenir una bona supressió àcida a part d'augmentar l'eficàcia dels antibiòtics, permet també afavorir la replicació de l'helicobacter, motiu pel qual encara fa més susceptible la

bactèria a l'acció dels antibiòtics. Per altra banda, les pautes que contenen claritomicina i/o metronidazol aconseguen, en general un millor control del pH àcid ja que són inhibidors de la CYP2C19, augmentant per tant la vida mitja dels IBP (157).

Taula 11. Distribució dels fenotips de la CYP2C19 segons les diferents ètnies.
Font: El Rouby et al (160)

Predicted CYP2C19 phenotype	whites	African Americans	Asians
CYP2C19 ultrarapid metabolizer (UM)	5%	4%	~1%
CYP2C19 rapid metabolizer (RM)	27%	24%	2-16%
CYP2C19 normal metabolizer (NM)	42%	39%	23-45%
CYP2C19 intermediate metabolizer (IM)	27%	32%	46-47%
CYP2C19 poor metabolizer (PM)	3%	4%	12-15%

En la Taula 12 es mostren les principals característiques farmacocinètiques dels diferents IBP

Taula 12. Ppi: Proton Pump Inhibitors. Propietats farmacocinètiques dels IBP.
Font: El Rouby et al (160)

PPI	Omeprazole (OME)	Esomeprazole (ESO)	Lansoprazole (LNZ)	Dexlansoprazole (DEX)	Pantoprazole (PNZ)	Rabeprazole (RPZ)
Bioavailability (%)	30-40%	64-90%	80-85%	NA	77%	52%
Time to plasma peak levels (Tmax)	0.5-3.5h	1.5h	1.7h	1-2h	2-3h	2-5h
Volume of distribution (L/Kg)	0.13-0.35	0.22-0.26	0.4	0.54	0.15	0.34
Clearance (mL/min)	400-620	150-266	400-650	190-193	90-225	160-330
Protein Binding %	95%	95%	97%	96%	96%	95-98%
Half-life (T1/2)	0.5-1h	1.3-1.6h	1.6h	1-2h	1-1.9h	1-2h
Hepatic metabolism	CYP2C19 (major), CYP3A4 (minor)	CYP2C19 (major), CYP3A4 (minor)	CYP2C19 (major), CYP3A4 (minor)	CYP2C19 (major), CYP3A4 (minor)	CYP2C19 (major), CYP3A4 (minor)	Nonenzymatic clearance, minor metabolism through CYP2C19
Fraction of CYP2C19 metabolism	>80%	~70%	>80%	>80%	>80%	Minimal
Inhibition of CYP2C19	Yes	Yes	No	No	No	No
Pharmacokinetics	Nonlinear	Nonlinear	Linear	Linear	Linear	Linear

En alguns pocs països (entre ells Japó), des l'any 2015 s'utilitza uns nous supressors de l'acidesa gàstrica, els P-CAPs (Potassium-competitive acid blockers) El més utilitzat en l'actualitat és el vonoprazan. Les pautes que inclouen vonoprazan han demostrat taxes d'erradicació >80% inclús en soques de *H. pylori* resistents a claritromicina, tot i utilitzant macròlids (161,162). Els tractaments basats amb Vonoprazam i claritromicina és la

pauta actualment més prescrita a Japó. Les taxes d'erradicació basades amb aquesta combinació en àrees sensibles a claritromicina arriben fins al 98%, mentre que en àrees resistents a claritromicina són aproximadament del 85% (163). El mecanisme d'acció del vonoprazam és mitjançant la inhibició de la bomba H^+ , K^+ ATPasa, competint amb el K^+ , de manera que suprimeix la secreció àcida per part de la cèl·lula parietal gàstrica, aconseguint un efecte anti-àcid més potent que els IBP (163). Està aprovat al Japó des de l'any 2015. La Food Drug Administration (FDA) l'ha aprovat l'any 2022. A Europa, l'Agència Europea del Medicament (EMA) encara no l'ha aprovat. No hi ha estudis de seguretat en nens a data d'avui. Tot i que sembla un fàrmac prometedori i que pot aconseguir altes taxes d'erradicació malgrat les resistències antibiòtiques, de moment no es pot incloure en les guies de tractament en el nostre medi.

En referència a les sals de bismut (subnitrat, subsalicilat i subcitrat de bismut), el seu efecte beneficiós en la patologia ulcerosa gàstrica i en la dispèpsia, és ben conegut des del segle XIX (164,165). El seu ús es va anar reduint progressivament amb l'arribada dels IBP. Aquestes sals s'hidrolitzen en l'estómac, formant polímers insolubles amb efecte bactericida, motiu pel qual actualment s'inclouen en les pautes de tractament de *H. pylori*. El seu mecanisme principal d'acció és impedit l'entrada d'hidrogenions a l'interior del citoplasma, bloquejant així la replicació bacteriana (166). Actualment s'afegeix en pautes antibiòtiques estàndards de tractament d'*H. pylori* per contrarestar les resistències antibiòtiques. Fins al moment no s'ha reportat existència de fracàs terapèutic a les sals de bismut. El seu màxim inconvenient és la dosificació en pediatria i la no disponibilitat en molts països. A Espanya està comercialitzat en forma de comprimit, sent difícil la seva administració en edat pediàtrica.

En adults, amb l'objectiu de millorar l'adherència al tractament, es disposa d'una presentació comercialitzada amb tres fàrmacs en la mateixa càpsula (subcitrat de bismut, metronidazol i clorhidrat de tetraciclina), conegut com a Pylera®. Al Pylera® cal afegir a més un IBP, a fi de realitzar la quàdruple teràpia, tal i com recomanen les guies actuals. Aquest medicament no està recomanat en població <18 anys.

Un altre diferència molt important en el maneig de la infecció entre població adulta i població pediàtrica, és que en la primera es recomana l'estratègia «test and treat», és a dir, el tractament empíric de l'*H. pylori* en cas de tenir simptomatologia compatible i un test no invasiu positiu (127,155,156,167,168). Les guies pediàtriques, en canvi, no contemplen el «test and treat», i especifiquen la necessitat d'un test invasiu que demostrï la presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica, abans d'iniciar tractament erradicador (98,138).

Els diferents règims de tractament recomanats en població adulta segons les diferents guidelines publicades, queden resumits en la Taula 13.

En referència al tractament en pediatria, les guies més actuals són les publicades de manera conjunta per les societats científiques europees i nord-americanes (ESPGHAN i NASPGHAN respectivament) l'any 2016 (98). En aquestes guies, es fa un èmfasis especial en la necessitat de l'estudi i coneixement del patró local de resistències antibiòtiques, a fi d'escollir la teràpia més adient i eficaç. En el cas de no tenir aquesta informació, la recomanació és evitar sempre el règims que incloguin claritromicina. Una altra de les recomanacions que es realitzen, és l'ús de dosis altes de IBP i d'amoxicil·lina per aconseguir taxes d'erradicació >90%, amb durades de tractament entre 10 i 14 dies. La «V conferència Espanyola de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*» estableix com a punt de partida augmentar per sobre del 90% les taxes d'erradicació de *H. pylori* en els casos on s'utilitza la teràpia empírica. Aquest consens s'ha publicat l'any 2022 (169). De manera que, en situacions on es desconeix la susceptibilitat antibiòtica la recomanació en població pediàtrica és l'administració a dosis altes en règim de tripleteràpia amb IBP, amoxicil·lina i metronidazol, com a tractament de primera línia. Les pautes que contenen bismut es reserven com a tractament de segona línia, sempre dependent de la seva disponibilitat. Les pautes de tractament en pediatria i les dosis recomanades queden resumides en la Taula 14 i 15 respectivament.

Taula 13. Tractaments recomanats en població adulta segons les diferents guies publicades. Font Suzuki et al. (170)

Guideline	Regimen(s)	Treatment duration, days
Maastricht V/Florence Consensus Report [3]	In areas of low (<15%) CLA resistance Standard triple therapy (PPI + CLA + AMO) (PPI + CLA + MET)	14
	In areas of high (>15%) CLA resistance Bismuth quadruple therapy (PPI + bismuth + 2 kinds of antibiotics) Concomitant quadruple therapy (PPI + AMO + CLA + MET/TIN)	14
Toronto Consensus [4]	In areas of low (<15%) CLA resistance Standard triple therapy (PPI + CLA + AMO) (PPI + CLA + MET) (PPI + AMO + MET)	14
	In areas of high (>15%) CLA resistance Bismuth quadruple therapy (PPI + bismuth + TET + MET) Concomitant quadruple therapy (PPI + AMO + CLA + MET)	14
ACG Clinical Guideline [5]	In areas of low (<15%) CLA resistance and in patients without previous macrolide exposure Standard triple therapy (PPI + CLA + AMO) (PPI + CLA + MET)	14
	In areas of high (>15%) CLA resistance or in patients with previous macrolide exposure Bismuth quadruple therapy (PPI + bismuth + TET + MET) Concomitant quadruple therapy (PPI + AMO + CLA + MET)	10–14
Fifth Chinese National Consensus Report [6]	Bismuth quadruple therapy (PPI + bismuth + 2 kinds of antibiotics)	10–14
Korean Guideline 2020 [7]	Standard triple therapy (PPI + CLA + AMO)	14
	Sequential therapy (PPI + AMO/5 days followed by PPI + CLA + MET/5 days)	10
	Concomitant quadruple therapy (PPI + AMO + CLA + MET)	
Japanese Guideline 2016 [8]	Standard or vonoprazan triple therapy (PPI/P-CAB + AMO + CLA/MET)	7

ACG, American College of Gastroenterology; AMO, amoxicillin; CLA, clarithromycin; MET, metronidazole; P-CAB, potassium-competitive acid blocker (vonoprazan); PPI, proton pump inhibitor; TIN, tinidazole; TET, tetracycline.

Taula 14. Tractament de primera línia basat en resultat cultiu *H. pylori*.
Modificat de Jones et al. (98)

Tractament primera línia amb cultiu positiu i segons antibiograma	
Susceptibilitat antimicrobina HP	Tractament recomanat
Sensibilitat a CLA i MET	IBP-AMO-MET 14 dies a dosi estàndard IBP-AMO-CLA 14 dies a dosi estàndard Teràpia seqüencial ^a
Resistent a CLA, sensible a MET	IBP-AMO-MET 14 dies o sals de bismut ^b
Resistent a MET, sensible a CLA	IBP-AMO-CLA 14 dies o sals de bismut ^b
Resistent a CLA i MET o desconeguda	IBP-AMO-MET 14 dies a dosi altes d'amoxicil·lina o sals de bismut-IBP-AMO-MET

AMO: amoxicil·lina; CLA: claritromicina; IBP: inhibidor de la bomba de protons; MET: metronidazol.

^a Teràpia seqüencial 10 dies: IBP-AMO 5 dies + IBP-CLA-MET 5 dies. És igual d'efectiva en pacients amb soques *H. pylori* sensibles, però no s'ha d'usar si hi ha resistència a MET o CLA o si la sensibilitat és desconeguda.

^b La quàdruple teràpia amb sals de bismut consisteix en IBP-bismut-amoxicil·lina-metronidazol o IBP-bismut-amoxicil·lina-claritromicina.

En cas d'al·lèrgia a penicil·lina: si la soca és sensible a CLA i MET, utilitzar triple teràpia amb dosis estàndard amb MET en lloc d'AMO; si la soca és resistent a CLA, s'han d'utilitzar sals de bismut amb tetraciclines en lloc d'AMO si el nen és major de 8 anys.

Taula 15. Dosis estàndard de tractament en pediatria. Modificat de Jones et al (98)

Dosis estàndard fàrmacs		
Fàrmac	Dosi estàndard	Dosi màxima diària
IBP ^a	2 mg/kg/dia	80 mg
Amoxicil·lina ^b	50 mg/kg/dia	2 g
Claritromicina	20 mg/kg/dia	1g
Metronidazol	20 mg/kg/dia	1,5 g
Sals de bismut ^c	8 mg/kg/dia	<10 anys: 240 mg >10 anys: 480 mg

^a Dosi IBP referides per a esomeprazol, omeprazol o rabeprazol. En cas d'ús de lansoprazol: 1,5 mg/kg/dia, màxim 60 mg/dia. Administrar 15 minuts abans dels àpats.

^b Amoxicil·lina a dosis altes: 75 mg/kg/dia, màxim 3 g al dia.

^c Sals de bismut: repartit en 2-4 dosis al dia.

Tots els fàrmacs s'administraran en dues dosis diàries: l'IBP 15-20 min abans i els antibiòtics durant o en acabar esmorzar i sopar

Un cop escollida la teràpia i la dosis a prescriure, l'èxit del tractament dependrà sobretot de l'adherència al mateix. Per tant és imprescindible emfatitzar aquest punt tant als pares com als pacients. Un cop finalitzat, caldrà un control post-erradicació, que es realitzarà amb un test no invasiu com a mínim a les 6 setmanes (171) després d'haver finalitzat la teràpia erradicadora. Un període inferior a 6 setmanes pot detectar fraccions d'antigen de bactèria no viable. Aquest test, tant pot ser per SAT o per TAU-C¹³ (98,138).

L'ús dels probiòtics com a tractament coadjuvant de moment encara és controvertit (98,127). La suplementació amb probiòtics pot millorar l'adherència al tractament, al reduir els seus efectes adversos sobretot a nivell gastrointestinal i per tant pot contribuir a augmentar l'eficàcia de la teràpia erradicadora. Els suposats efectes beneficiosos dels probiòtics, es basen en diferents possibles mecanismes d'acció: funció barrera, competència amb l'helicobacter per l'adherència a la mucosa, producció de substàncies antimicrobianes (àcids grassos de cadena curta com l'àcid acètic, l'àcid propiònic o l'àcid làctic) o la modulació de la resposta immunològica estimulant la producció de citocines amb acció antiinflamatòria (172,173). Tot i així, l'heterogeneïtat dels estudis publicats, la no uniformitat del tipus de probiòtic usat, les diferents dosis utilitzades i les diferents pautes de durada, dificultat la realització de recomanacions concretes (172,174). Malgrat totes aquestes limitacions, recentment la ESPGHAN ha publicat una actualització sobre l'ús de probiòtics en pediatria, recomanant l'ús de *Saccharomyces boulardii* durant el tractament de la infecció per *H. pylori*, a fi d'augmentar les taxes d'erradicació i disminuir els efectes secundaris a nivell digestiu (grau d'evidència molt baix; recomanació dèbil) (175).

En la Figura 16 es resumeixen els punts claus en el desenvolupament de la recerca, diagnòstic i tractament de la infecció per *H. pylori*.

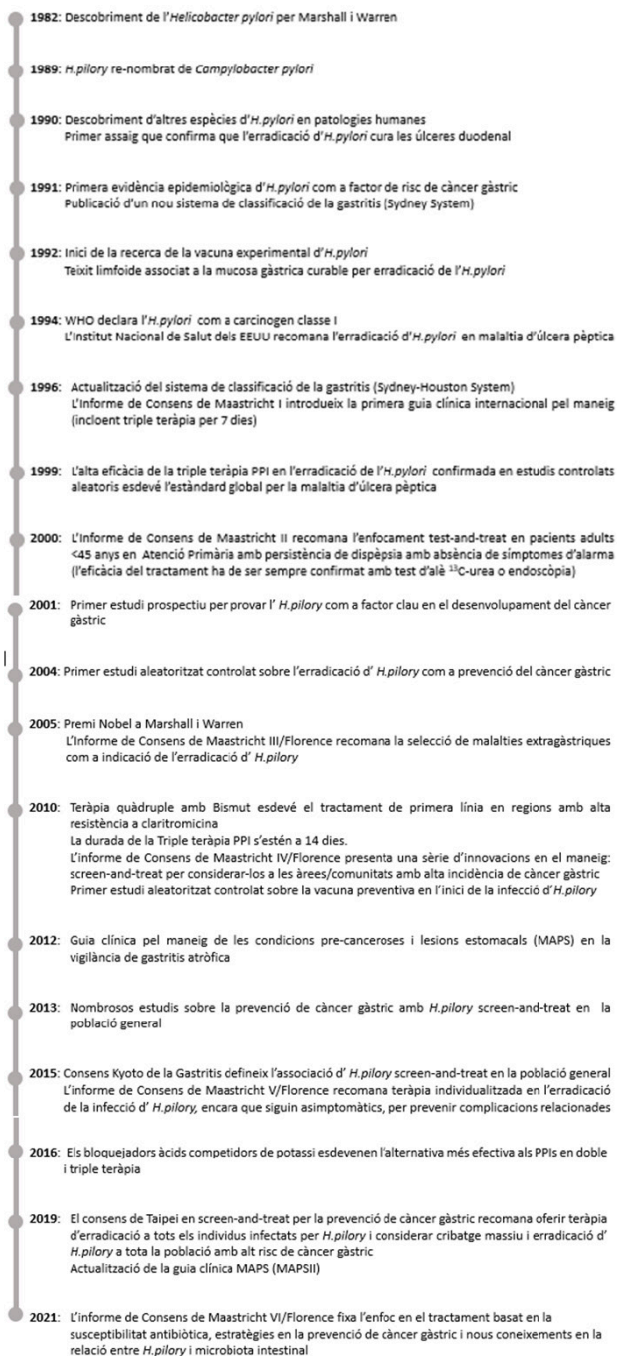


Figura 16. La línia del temps resumeix les troballes més rellevants en la recerca de la infecció per *H. pylori*, des de la seva descoberta l'any 1982 fins l'actualitat. Adaptat de Malfertheiner et als. (55)

1.2.2.8. *Helicobacter pylori* i vacuna

En els darrers anys, diversos laboratoris i empreses han posat el focus en l'elaboració d'una vacuna contra l'*H. pylori*. Tot i així, actualment tots els assaigs estan encara en una fase molt primerenca (pre-clínica o fase 1). Malgrat els esforços, la tasca de trobar una vacuna eficaç és molt complexa, degut a que l'*H. pylori* és un microorganisme extremadament adaptat al medi i té la capacitat d'evadir el sistema immunitari de l'hoste, perpetuant la seva infecció. La selecció de l'antigen idoni també és un punt important. En general les vacunes que van dirigides a un sol antigen, han mostrat ser menys eficaces (176,177).

JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

2. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

Tal i com ha quedat referenciat en la introducció, la infecció per *D. fragilis* i la infecció per *H. pylori*, son dues entitats molt freqüents en la població general, adquirint-se en la major part dels casos en l'edat pediàtrica. En primer lloc, és bàsic saber quan cal buscar la infecció, en segon lloc cal saber quina és l'eina diagnòstica més precisa i adequada pel seu diagnòstic i en darrer lloc és imprescindible establir criteris concrets de tractament i algoritmes terapèutics eficaços. El seu sobrediagnòstic i el sobretractament que sovint es realitza, poden empitjorar les taxes de resistències a antibiòtics, que com ja s'ha dit anteriorment, serà la principal causa de mortalitat a nivell mundial, en les pròximes dècades.

En els darrers anys hi ha hagut un interès creixent en la infecció per *D. fragilis* i s'han publicat nombrosos estudis que avalen el seu rol patogènic com a causant de simptomatologia gastrointestinal i per tant justificant el seu tractament (16,18,19,21,31-33,36,49,178). La majoria d'estudis, però, no són en població pediàtrica i no es compara amb grup control.

Es per aquest motiu que vam creure necessari realitzar un estudi prospectiu, cas-control en població pediàtrica que pogués donar informació sobre la correlació entre la presència de simptomatologia digestiva d'etiologia incerta i la presència de *D. fragilis*, realitzant posteriorment un seguiment evolutiu en els casos simptomàtics positius que van rebre tractament antiparasitari.

Pel que fa a la infecció per *H. pylori*, sabem també que està àmpliament estesa i àmpliament tractada (i sovint sobretractada) en el nostre medi. Tot i que les guies pediàtriques no contempen l'estratègia *Test and Treat* (98,138), que és la recomanada en la població adulta (68,103), hem comprovat que en la pràctica clínica real, existeix poca adherència a aquestes recomanacions. Es conegut que es realitza una recerca creixent de la infecció en casos no justificats, pautant-se tractaments empírics que en molts casos contenen claritomicina, sense conèixer amb certesa quines taxes de resistència tenim l'àrea geogràfica on exercim. Es per aquest

motiu que també vam creure necessari estudiar la població pediàtrica de la nostra àrea amb simptomatologia compatible amb infecció per *H. pylori*, comparar diferents mètodes diagnòstics i conèixer les nostres taxes de resistències locals amb l'objectiu de poder elaborar algoritmes de tractament dirigits, en les casos en que realment és confirma la infecció i on el tractament realment sí és justificat.

En aquest sentit, i per tenir més informació sobre el maneig real de la infecció per *H. pylori* en el nostre àmbit assistencial, vam realitzar dues enquestes en referència a l'abordatge de l'*H. pylori* a peu de pacient: la primera enquesta va anar dirigida als gastroenteròlegs pediàtrics de tot el territori català, responsables de la consulta especialitzada (tots ells membres del Grup de Treball de Gastroenterologia Pediàtrica de la Societat Catalana de Pediatria (SCP). La segona enquesta va anar dirigida als pediatres d'Atenció Primària de la nostra àrea sanitària, és a dir de la Metropolitana Nord. Els resultats d'ambdues enquestes s'exposen en l'annex 1.

OBJECTIUS I HIPÒTESI DE TREBALL

3. OBJECTIUS I HIPÒTESI DE TREBALL

La hipòtesi principal al plantejar aquesta tesi, és demostrar i recolzar que les tècniques de biologia molecular, en concret la Real-time PCR, son superiors a les tècniques microbiològiques convencionals pel diagnòstic de dues de les infeccions més freqüents del tracte digestiu en edat pediàtrica, alhora que detecció del DNA microbià permet l'estudi de resistències antibiòtiques en infeccions amb baixa càrrega microbiològica, que podrien donar resultats falsos negatius per les tècniques microbiològiques convencionals.

La tesi, a més, té una sèrie d'objectius concrets per cada una de les dues infeccions, que es detallen a continuació:

3.1. OBJECTIUS EN LA INFECCIÓ PER *DIENTAMOEBÀ FRAGILIS*

- **Objectiu 1:** Demostrar que la *Real-time* PCR pel diagnòstic de la infecció de *D. fragilis* és més sensible que la microscòpia òptica a en mostres de femta
- **Objectiu 2:** Conèixer el paper etiopatogènic de la *D. fragilis* en nens amb simptomatologia gastrointestinal, en els quals s'hagin exclòs altres causes orgàniques (infeccioses o no).
- **Objectiu 3:** Avaluar si el tractament i l'eliminació de la *D. fragilis* en casos simptomàtics resol la clínica gastrointestinal.

3.2. OBJECTIUS EN LA INFECCIÓ PER *HELICOBACTER PYLORI*

- **Objectiu 1:** Demostrar que la *Real-time* PCR és més sensible que el cultiu convencional per la determinació de la infecció per *H. pylori* en mucosa gàstrica
- **Objectiu 2:** Descriure la correlació entre clínica digestiva, presència de *H. pylori* i lesió histològica en mucosa gàstrica

- **Objectiu 3:** Comparar la sensibilitat de les diferents tècniques de determinació de *H. pylori* (histològiques i microbiològiques)
- **Objectiu 4:** Demostrar que la nostra àrea de influència sanitària és altament resistent a claritromicina (resistència >20%)

APROVACIÓ DEL COMITÈ D'ÈTICA

4. APROVACIÓ DEL COMITÈ D'ÈTICA

Ambdós estudis compten amb l'aprovació del comitè d'ètica de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Annex 2)

- Títol del projecte: Diagnòstic de la *Dientamoeba fragilis*. Paper etiopatogènic en simptomatologia digestiva en pacients pediàtrics.

Data d'aprovació CEIC: 27 d'octubre 2017.

Codi registre: PI-17-166.

- Títol del projecte: Infecció per *Helicobacter pylori* en població pediàtrica en l'àrea Barcelonès-Metropolitana Nord. Incidència, característiques clíniques i estudi de resistències antibiòtiques.

Data d'aprovació CEIC: 11 de gener 2019.

Codi registre: PI-18-220.

Tots els pacients/ tutors legals inclosos en ambdós estudis van acceptar participar de manera voluntària i varen signar el consentiment informat.

MATERIAL I MÈTODES

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1. INFECCIÓ PER *DIENTAMOEBIA FRAGILIS*

5.1.1. Població de pacients

Estudi prospectiu cas-control realitzat en l'Hospital Germans Trias i Pujol (HGTIP) entre l'octubre de l'any 2017 i el febrer de l'any 2019. El grup cas comprèn pacients sans, entre 1 i 17 anys reclutats en l'hospital o en els centres d'atenció primària que presenten clínica digestiva, en els qual s'ha descartat prèviament altres causes (principalment malaltia celíaca, infeccions gastro-intestinals, malaltia inflamatòria intestinal i malabsorció de hidrats de carboni (lactosa i fructosa/sorbitol). Es considera símptoma digestiu dolor abdominal, meteorisme, diarrea, distensió abdominal, nàusea, vòmit, pèrdua de pes i/o anorèxia. L'existència d'un diagnòstic previ de patologia digestiva o de malaltia sistèmica amb potencial afectació del tracte gastro-intestinal es va considerar criteri d'exclusió. El grup control estava format per nens sans, entre 1 i 17 anys, sense patologia digestiva, procedents dels centres d'atenció primària o de la planta d'hospitalització on podien estar ingressats per altres patologies no relacionades amb quadres gastro-intestinals

5.1.2. Metodologia del processament de mostres

Es va recollir una mostra de femta fresca de cada participant (57 mostres del grup cas i 47 mostres del grup control). Per a l'examen de muntatge en fresc d'ous i paràsits (O&P), totes mostres es van fixar en un fixador 60 sense formalina, AlcorFix®, i tub de recollida Mini Parasep® SF (sense dissolvent) (Parasep®; Apacor; Berkshire, Anglaterra, Regne Unit). Prèviament a tots els pacients se'ls va realitzar estudi microbiològic en femta per descartar altres infeccions gastro-intestinals (bacterianes, víriques i parasitàries). Es va realitzar coprocultiu per descartar enteropatògens mitjançant tècnica microbiològica estàndard per excloure les següents infeccions: *Salmonella spp.* , *Shigella spp.* , *Campylobacter spp.* , *Arcobacter spp.* ,

Yersinia entero- colítica, *Vibrio spp.*, *Plesiomonas spp.* i *Aeromonas spp.*. La determinació de virus en femta es va realitzar mitjançant una prova de cribratge immunocromatogràfic (Adeno/Rota STAT-PAK; Chembio Diagnostic Systems Inc., Sydney) que permetia la detecció d'antígens dels serotips 40-41 d'adenovirus i d'antigen de rotavirus. Pel que fa l'estudi parasitològic es va realitzar prova de detecció d'antigen de *Giardia lamblia* i *Cryptosporidium spp* (RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi, Darmstadt, Alemanya) seguida d'un examen de muntatge en fresc O&P en mostres prèviament fixades. A més, hem estudiat la presència de *D. fragilis* en totes les mostres de femta per RT-PCR (VIASURE Dientamoeba fragilis Real Time Kit de detecció de PCR, Saragossa, Espanya) seguint les indicacions del fabricant. L'extracció d'ADN es va realitzar mitjançant Maxwell® 16 Tissue DNA Kit (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Entre el grup de casos, amb un resultat positiu per a *D. fragilis* (PCR i/o microscòpia humida amb examen en fresc) es va pautar metronidazol oral (15/mg/kg/dia) durant 10 dies. Per comprovar erradicació del paràsit, es va efectuar una segona PCR 4 setmanes després d'haver finalitzat el tractament i un registre de l'evolució dels símptomes (Figura 17). Els participants del grup control amb resultat positiu per *D. fragilis* (PCR i/o microscòpia òptica) no van rebre cap tractament.

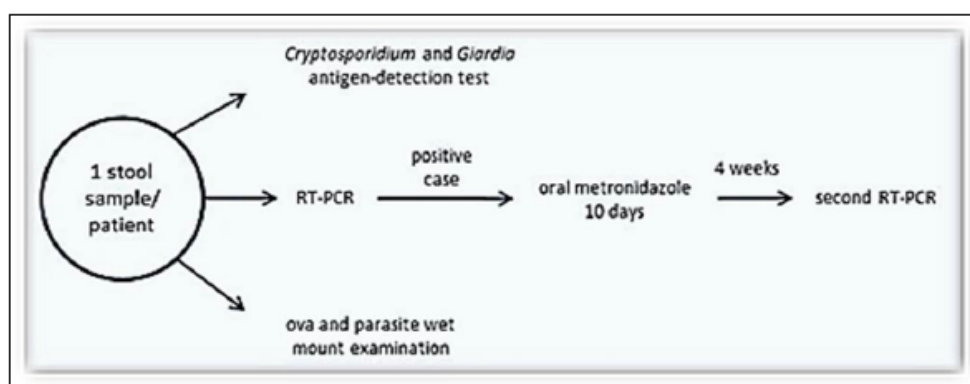


Figura 17. Workflow de l'estudi parasitològic *D. fragilis*

5.1.3. Recopilació de dades

Les dades clíniques es van obtenir en la mateixa visita mèdica. Es van recollir dades epidemiològiques (edat i gènere) en tots els pacients. En el grup cas es van recollir també les següents dades: dolor abdominal, diarrea, meteorisme, nàusees, pèrdua de pes, anorèxia i eosinofília. L'eosinofília es va definir com $\geq 0,5 \times 10^9/L$ en el recompte de sang perifèrica. Els pacients del grup cas amb resultat positiu en femta per *D. fragilis* i que van rebre tractament amb metronidazol, es va dur a terme una visita de seguiment on es va registrar l'evolució de la simptomatologia gastro-intestinal i PCR en mostra fecal a les quatre setmanes de finalització del tractament.

5.1.4. Anàlisi estadístic

Es van registrar les dades, realitzant-se una anàlisi univariada no estratificada dels grups abans i després del tractament per estudiar l'Odds Ratio (OR) entre les diferents variables, així com el resultat de la PCR. A més, es va efectuar una anàlisi univariant i multivariant per avaluar els factors de risc i els possibles factors de confusió mitjançant el paquet estadístic Stata 14 (StataCorp LP, TX, EUA).

5.2. INFECCIÓ PER *HELICOBACTER PYLORI*

5.2.1. Població de pacients

Estudi prospectiu i longitudinal realitzat a l'Hospital Germans Trias i Pujol entre gener del l'any 2019 i març de l'any 2022. El període de reclutament inicial era fins febrer de l'any 2021, però degut a la pandèmia de la COVID 19 de l'any 2020, es va alentir el reclutament dels pacients i la realització de la Real-time-PCR d'*H. pylori*, prioritzant-se les Real-time PCR de SARS CoV2 per criteris sanitaris. Aquest motiu va fer que s'allargués l'estudi fins el març del 2022. Es van incloure pacients entre 4 i 18 anys derivats a la consulta de gastroenterologia des de l'Atenció Primària, Planta d'hospitalització o Urgències de pediatria, que complien els criteris d'inclusió definits a continuació (criteris ESPGHAN (98)).

- Síntomes gastrointestinals definits com a epigastràlgia de característiques ulceroses, pirosis i sensació de plenitud post-pandrial que presentin una determinació de SAT positiva.
- Anèmia ferropènica refractària a la ferroteràpia oral, havent descartat altres causes d'anèmia, incloent patologia malabsortiva (p. e Malaltia celíaca, malaltia inflamatòria intestinal) que presentin una determinació de SAT positiva.
- Pacient amb PTI crònica refractària al tractament segons guies de pràctica clínica i que presentin una determinació de SAT positiva.

Es consideren criteris d'exclusió la presència de simptomatologia digestiva no compatible amb infecció per *H. pylori* (p. e dolor abdominal recurrent o de característiques funcionals, diarrea ...)(98) independentment de la positivitats o no del SAT.

5.2.2. Metodologia del processament de les mostres

En tots aquells pacients que complien els criteris d'inclusió se'ls va realitzar una fibrogastrosccòpia diagnòstica. En els casos on es va objectivar lesió mucosa es van prendre un total de 6 mostres de biòpsia, enviades per separat i correctament identificades.

1. Estudi histològic (quatre mostres)

- Dues mostres d'antre gàstric
- Dues mostres de cos gàstric

S'analitzen les mostres de biòpsia segons la Classificació de Sydney (112):

- Gastritis crònica/activa
- Atrofia
- Metaplàsia intestinal
- Densitat de *H. pylori*

Per la determinació d'*H. pylori* es realitza tinció amb Hematoxilina&Eosina. En cas de no objectivar-se estructures compatibles amb *H. pylori*, es realitza estudi immunohistoquímic. En cas de no identificar l'*H. pylori* per cap de les dues tècniques, es considera resultat negatiu.

2. Estudi microbiològic (una mostra)

- Una mostra d'antre gàstric

A partir de la mostra es realitza determinació de Real-time PCR per *H. pylori*.

La mostra es transporta des de la Unitat d'endoscòpia al Servei de Microbiologia, submergida en sèrum fisiològic, en un temps màxim d'una hora. Un cop rebudes, es processen, realitzant-se cultiu convencional i antibiograma mitjançant tècnica Epsilon-test (E-test) (179). L'E-test és una tècnica quantitativa que permet determinar la concentració mínima inhibidora dels antibiòtics

A l'inici del reclutament la tècnica que es va utilitzar va ser **GenoType® HelicoDR** (Hain Lifescience, Nehren, Alemanya). Aquesta tècnica es basa en la utilització d'unes sondes dissenyades per hibridar amb les seqüències dels al·lels tipus salvatge (WT sondes) o el al·lels mutats (sond4s MUT), A2142C, A2142G i A2143G pel gen 23S rRNA i N87K, D91N, D91G o D91Y pel *gyrA*. Un cop extret el DNA de les biòpsies i seguint el procediment recomanat pel fabricant es va realitzar el procés de PCR amb posterior hibridació en tira. Aquesta tècnica permet la detecció del DNA *H. pylori* i de manera simultània la detecció de resistència a fluorquinolones i claritromicina. Per poder validar la prova, és imprescindible que tant el conjugat com el control d'amplificació tinguin un resultat positiu. Una banda positiva mostra la positivitat per la detecció de *H. pylori*, i les altres bandes identifiquen el rRNA 23S i els gens *gyrA*.

En una segona fase de l'estudi es va utilitzar una real time PCR (Allplex™ *H. pylori* & ClariR Assay, Seegene) que ens permetia detectar el DNA *Helicobacter pylori*, simultàniament amb la detecció de resistències a claritromicina a través dels gens A2142C, A2142G, A2143G.

Donat que la tècnica d'hibridació en tira **GenoType® HelicoDR** (Hain Lifescience, Nehren, Alemanya) requeria d'un procés llarg per la seva realització a més d'un personal altament qualificat, i donat el dèficit de personal dedicat a la realització d'aquests estudis i la manca de recursos, es va decidir canviar la tècnica emprada per l'estudi per una més automatitzada i habitual al laboratori assistencial.

3. Test ràpid de la ureasa (RUT) (una mostra)

- Una mostra d'antre gàstric

El test ràpid de la ureasa es va realitzar mitjançant CLOtest® Kimberly-Clark (180) fabricat per Ballard Medical Products, Utha (USA). Els kits de CLOtest® es van emmagatzemar en nevera a 7° fins la seva utilització. Es va mantenir la placa a temperatura ambient entre 7-10 minuts abans de la seva utilització, segons recomanacions del fabricant. Es va procedir a la seva lectura definitiva a les 24 hores d'haver inserit la mostra de mucosa gàstrica a la placa de CLOtest®. Un viratge de color de groc a vermell es va considerar com a resultat positiu, mentre que el no viratge de color es va considerar resultat negatiu (181) (Figura 18).



Figura 18. Exemple de test de la ureasa amb resultat negatiu (a) i amb resultat positiu (b). Crowley et al. (181)

En aquells pacients en els que es confirma infecció per *H. pylori*, tant per mètode histològic o microbiològic, es realitza tractament erradicador segons guies de pràctica clínica (98,138). Posteriorment es realitza determinació de SAT a les 4-8 setmanes després de al finalització del tractament (Figura 19). La detecció en femta de l'antigen de *H. pylori* (SAT) es va realitzar mitjançant la tècnica de quimioluminescència de LIAISON[®] Meridian *H. pylori* SA (DiaSorin, Vercelli, Italy). La prova consisteix en un immunoassaig quimioluminiscent (CLIA) en format sandwich que utilitza anticossos monoclonals per la captura i detecció de l'antigen en femta de *H. pylori*. Les proves es van realitzar seguint les instruccions del fabricant. En cas de SAT negatiu, es considera infecció resolta. En cas de SAT positiu es realitza tractament de segona línia seguint les recomanacions de les mateixes guies.

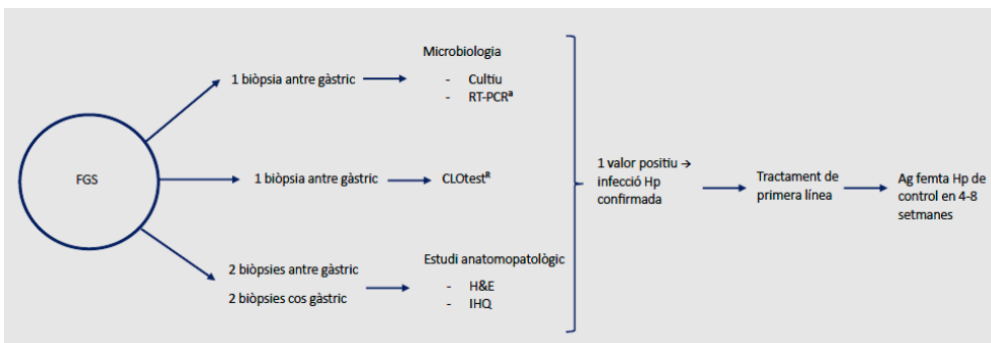


Figura 19. WorKflow del diagnòstic de la infecció *H. pylori*. FGS: fibroscòpia gastroscòpia; H&E: hematoxilina&eosina; IHQ: Immunohistoquímica

5.2.3. Recopilació de les dades

Es van recollir dades epidemiològiques (edat, gènere, raça) i dades clíniques: epigastràlgia /pirosis, anèmia ferropènica, PTI_c i hemorràgia digestiva alta (HDA). Es va preguntar també per tractament previs erradicadors. Es van recopilar les troballes endoscòpiques descrites com normal, antritis nodular, atrofia gàstrica, erosió i úlcera. Les troballes anatomopatològiques es van recopilar segons classificació de Sydney. Es van recollir el resultat del CLOtest[®], cultiu, Real-time PCR i gen de resistència

a claritromicina (A2143 G) Es va recollir el tipus de tractament prescrit així el resultat del SAT per comprovar l'erradicació.

5.2.4. Anàlisi estadístic

Les dades s'han expressat com a mitges (DE) per les variables contínues o com números/percentatges per les variables categòriques. La normalitat de la distribució i la igualtat de variàncies s'han avaluat mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov i la prova de Levene, respectivament. Per la comparació de variables contínues independents i relacionades, s'ha utilitzat la prova t de Student o U Mann-Whitney, segons mida i característiques de les variables. S'ha usat la prova de Chi-cuadrat de Pearson per comparar variables categòriques entre grups. Per mesurar l'associació, s'han calculat les odds ratio i els intervals de confiança del 95%. S'ha utilitzat el Paquet Estadístic per Ciències Socials SPSS versió 23. 00 per realitzar tots els anàlisis estadístics, establint la significança en $p < 0.005$.

RESULTATS

6. RESULTATS

6.1. RESULTATS *DIENTAMOEBÀ FRAGILIS*

Durant el període d'estudi es van incloure un total de 106 pacients. D'entre ells, 59 pacients formaven part del grup cas, dels quals se'n van excloure 2 pacients per obtenir coprocultiu positiu per *Campylobacter spp* i *Salmonella spp* respectivament, quedant finalment 57 pacients que complien els criteris d'inclusió. En el grup control es van incloure 47 pacients. No es van observar diferències significatives en relació al gènere ni a l'edat en ambdós grups. L'edat mitjana en el grup cas va ser de 7,45 anys, mentre que el grup control va ser de 6,23 anys. Pel que fa a la distribució per sexes, en el grup cas, 30 pacients eren de sexe masculí (52,64%). En el grup control 26 participants eren de sexe masculí (55%). Pel que fa a la distribució per races, aquesta va ser força homogènia en ambdós grups, tal i com mostren la Figura 20 i 21 respectivament.

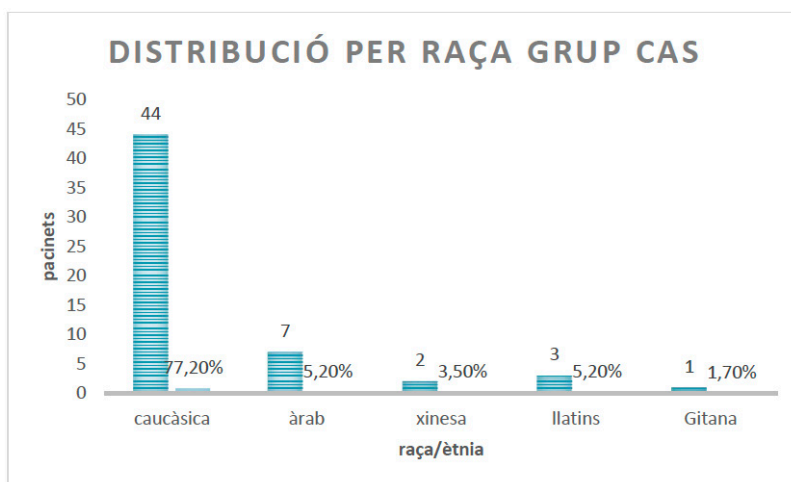


Figura 20. Distribució de raça/ètnia en el grup cas

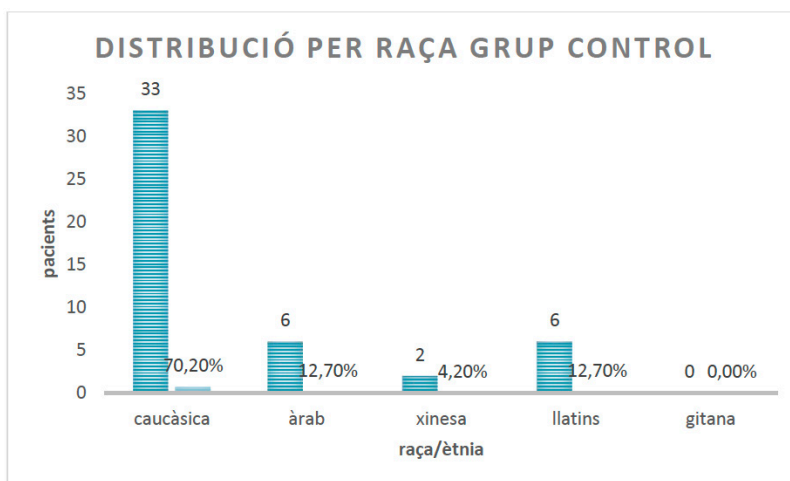


Figura 21. Distribució de raça/ètnia en el grup control

La simptomatologia en els pacients del grup cas va ser principalment dolor abdominal 46/57 (80%), diarrea 28/57 (49%), meteorisme 15/57 (31%) i amb menys freqüència distensió abdominal en 12/57 (21%), anorèxia 5/57 (8%) i pèrdua de pes 2/57 (3,5%) (Figura 22).

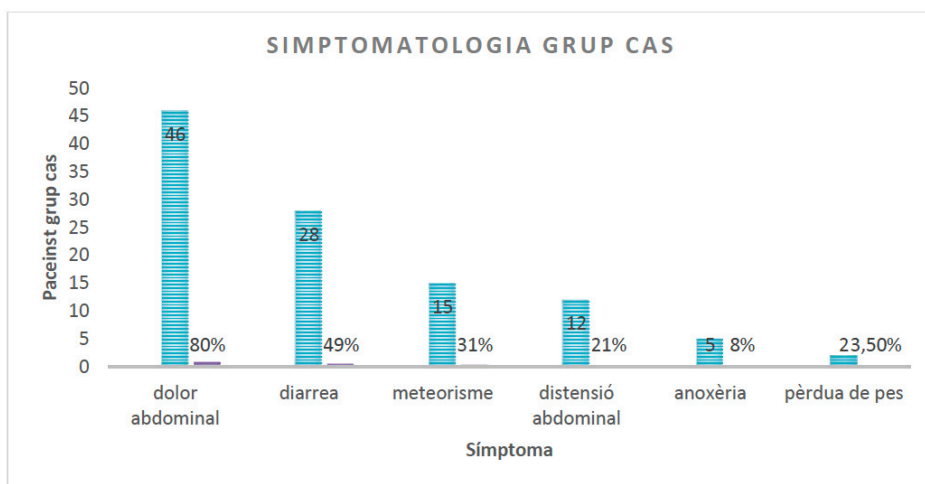


Figura 22. Simptomatologia dels pacients del grup cas

Els pacients del grup control no presentaven cap tipus de clínica gastro-intestinal. Cap dels símptomes que mostraven els pacients del grup cas es va associar significativament a l'exposició al paràsit. No obstant el valor p

per meteorisme va ser lleugerament superior a la significança ($p = 0.0967$). Els valors p per tots els símptomes estan recollits en la Taula 16.

Taula 16. Dades obtingudes del grup cas. associació entre els símptomes i la presència de *D. fragilis*

Symptoms N=57	PCR+	PCR-	IC (95%)	
Abdominal pain n=46 (80%)	15	31	.37-22.9	(OR 2.17)
Diarrhea n=28 (49%)	6	22	.11-1.65	(OR .44)
Meteorism N=15 (31%)	7	8	.66-11.38	(OR 2.8)
Abdominal distension N=12 (21%)	4	8	.22-5.62	(OR 1.2)
Anorexia N=5 (8%)	1	4	.01-6.3	(OR .56)
Weight loss N=2 (3.5%)	0	2	0-4.6	(OR 0)

Dels 57 nens amb simptomatologia, 17 presentaven PCR *D. fragilis* positiva (29,8%), mentre que en el grup control es va trobar PCR *D. fragilis* positiva en 11/47 (23,4%) (Taula 17).

Taula 17. Resultat de la PCR *D. fragilis* del grup cas i del grup control. PCR positiva en el grup cas 29,8%. PCR positiva en el grup control 23,4%. OR: 1,39 (IC 95% 0.53-3.75, $p=0.46$).

	GRUP CAS	GRUP CONTROL	N TOTAL
PCR POSITIVA	17	11	28
PCR NEGATIVA	40	36	76
N TOTAL	57	47	104

La relació entre la presència de clínica digestiva i la troballa del paràsit en femta va ser significativa, amb un odds ratio (OD) de 1,39. Tot i així, malgrat aquesta associació positiva, es va observar una manca de significança estadística (interval de confiança (IC) 95% 0,53-3.75, $p=0,46$) L'estudi amb microscòpia òptica no va permetre la detecció del paràsit en cap mostra, diagnosticant-se la seva presència només mitjançant la Real-time PCR. Els 17 pacients amb símptomes i amb PCR positiva van ser tractats amb MTZ, segons protocol. Es va realitzar en tots ells tractament a dosis de 15-20 mg/kg/dia repartits en 3 dosis durant 10 dies. Els pacients del grup control

amb PCR positiva no van rebre cap tractament. Es va sol·licitar control microbiològic en mostra fecal en tots els pacients tractats a les 4 setmanes de finalització del tractament antiparasitari. Es van obtenir mostres de 11/17 pacients, perdent-se el seguiment en 6/17 (35%). De les mostres obtingudes 3/11 (27%) continuava detectant-se *D. fragilis*, mentre que en 8/11 el paràsit s'havia erradicat. L'anàlisi univariant no estratificat va mostrar que 5/11 pacients van continuar amb la mateixa simptomatologia (4/11 dolor abdominal i 1/11 amb meteorisme), però només 1/5 presentava PCR *D. fragilis* positiva. Les 2 mostres positives restants corresponien a pacients que ja no presentaven clínica digestiva, tot i continuar amb PCR + en femta. Es va analitzar també la presència d'eosinofília en sang perifèrica. Només van presentar eosinofília 9/57 pacients (15%) motiu pel qual, aquesta variable es va acabar exclouent de l'anàlisi final. Malgrat la escassa prevalença d'eosinofília en el grup cas, la persistència d'eosinofília post-tractament sembla que estava associada significativament a la persistència de PCR positiva ($p= 0,02$). Tot i així, aquesta dada s'ha d'interpretar amb cura, donat que el número de casos era molt baix ($n=6$).

Aquest estudi es va publicar el mes d'octubre de l'any 2022 a la revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica sota el títol de «*Should Dientamoeba fragilis be looked for in pediatric digestive pathology of an unknown cause? A proposed pilot case-control study*» (Annex 3).

6.2. RESULTATS *HELICOBACTER PYLORI*

6.2. 1. Anàlisi descriptiva

Durant el període d'estudi es van incloure un total de 71 pacients. En 7 d'ells es va perdre el seguiment, quedant finalment 64 pacients que van completar tot l'estudi. L'edat mitja dels pacients va ser 11,56 anys (6-16 anys). Sexe femení 37/64 (57,8%) La distribució per raça es mostra en la Figura 23, següent el 57,1% dels pacients inclosos d'origen caucàsic

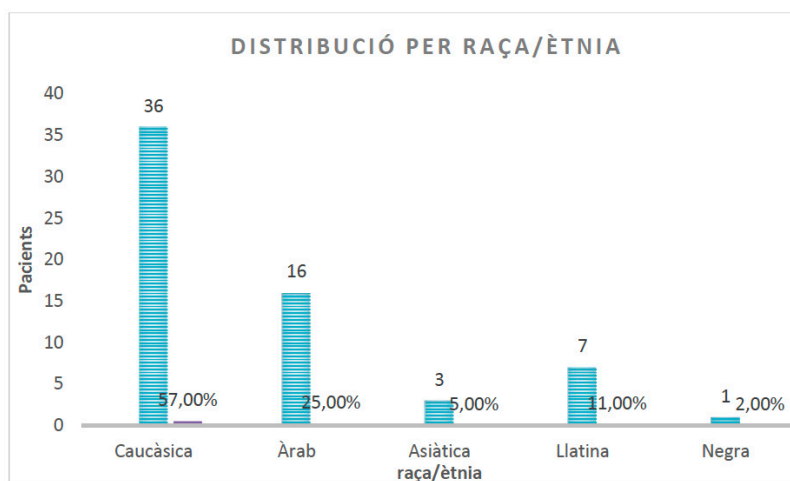


Figura 23. Distribució per raça/ètnia

Tots els pacients inclosos presentaven un SAT positiu, donat que aquest el vam definir com un criteri d'inclusió obligat. El 84,4% (54/64) no havien rebut cap tractament erradicador previ. Dels 10 pacients (15,6%) que si van rebre tractament previ, aquest va ser empíric en tots els casos, sense especificar quina teràpia es va realitzar ni quina durada.

Pel que fa als símptomes, la simptomatologia digestiva alta va ser la més freqüent (epigastràlgia, pirosis/o sensació de plenitud post-pandrial). Només un dels pacients inclosos (corresponent a raça asiàtica) es va presentar com un quadre d'hemorràgia digestiva alta (HDA). En la nostra sèrie cap dels pacients estava diagnosticat de PTIc. Els resultats es mostren en el gràfic (Figura 24).

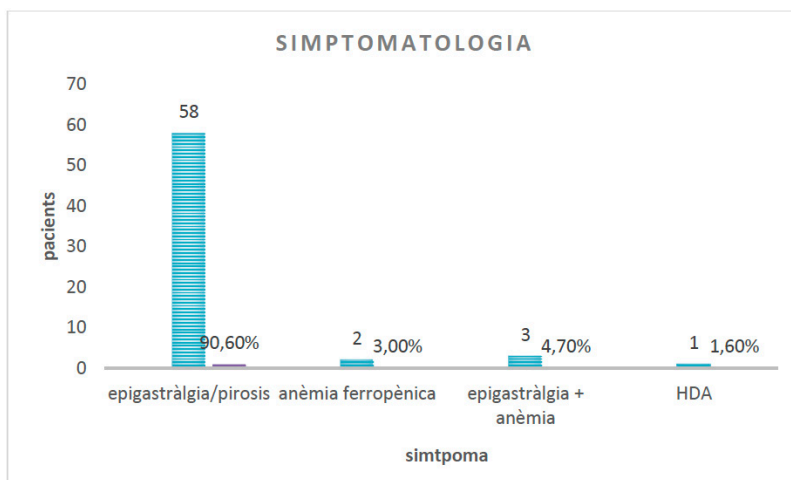


Figura 24. Simptomatologia presentada en els pacients de la nostra sèrie

Es va realitzar FGS en tots els pacients. La gastroscòpia va ser normal en 17/64 (26,6%) i patològica en 47/64 (73,4%) dels casos, sent l’antritis nodular la troballa més freqüent, o aïllada o bé associada a una altra alteració endoscòpica (40/47 (85,1%)). Els resultats endoscòpics es detallen en la Figura 25.

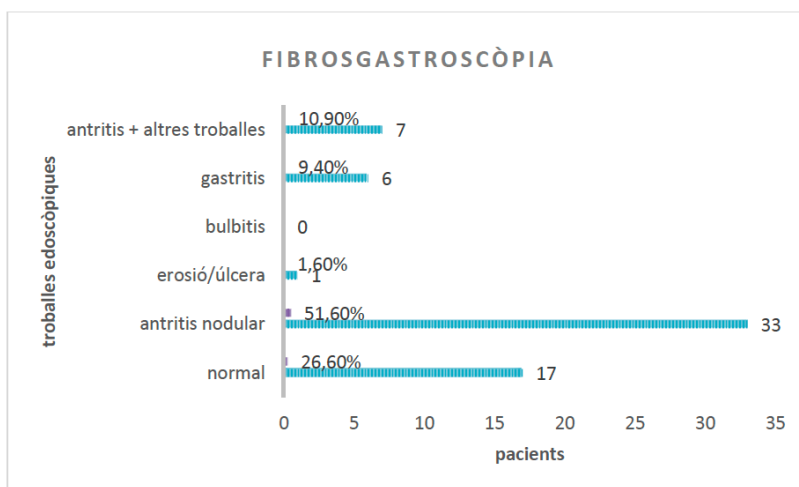


Figura 25. Troballes macroscòpiques en la FGS

Es va realitzar Test ràpid de la ureasa (Clotest®) en mostra de biòpsia gàstrica en tots els pacients, excepte un. El resultat va ser positiu en 57/63 (90,4%) (Figura 26).

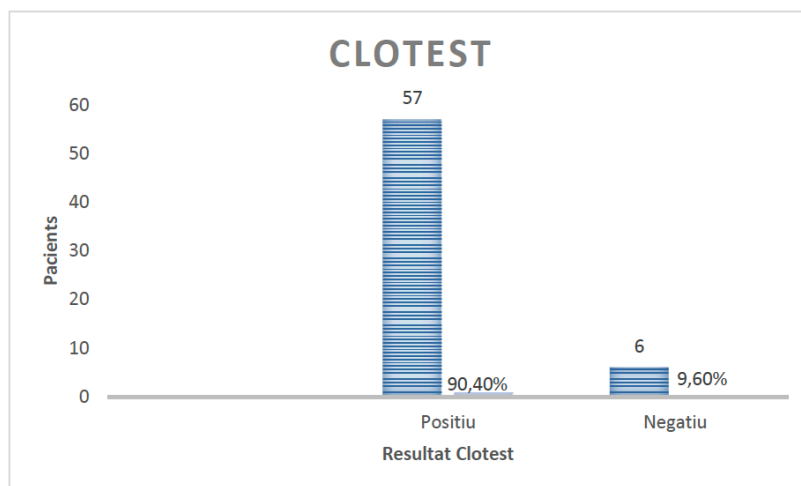


Figura 26. Resultat Test ràpid ureasa en mucosa gàstrica

Es va realitzar estudi anatómo-patològic en totes les mostres segons el protocol descrit en l'apartat de material i mètodes. La histologia va mostrar presència de gastritis crònica activa en 60/64 (94%) dels pacients i va ser normal en 3/64 (5%). Una mostra no va ser valorable per mal processament de la mateixa en el moment de la recollida (Figura 27). Cap pacient va mostrar displàsia, metaplàsia o bé histologia compatible amb gastroenteropatia eosinofílica.

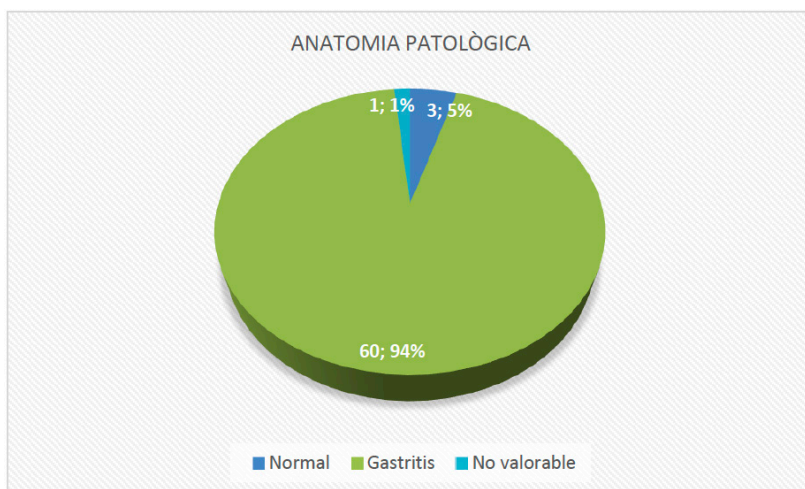


Figura 27. Resultat anatomia patològica de les biòpsies d'antre gàstrica

Es va realitzar recerca de *H. pylori* per histologia en totes les mostres, tant en les que presentaven gastritis crònica activa com en les que tenien una histologia normal. Es va detectar *H. pylori* en 58/64 (90,6%). Es va fer tinció de H&E en totes les biòpsies. Van presentar una tinció positiva 26/64 (40,6%). En els casos en que la H&E va ser negativa es va realitzar estudi mitjançant IHQ, la qual va ser positiva en 32/64 (50%). Els resultats s'exposen en la Figura 28.

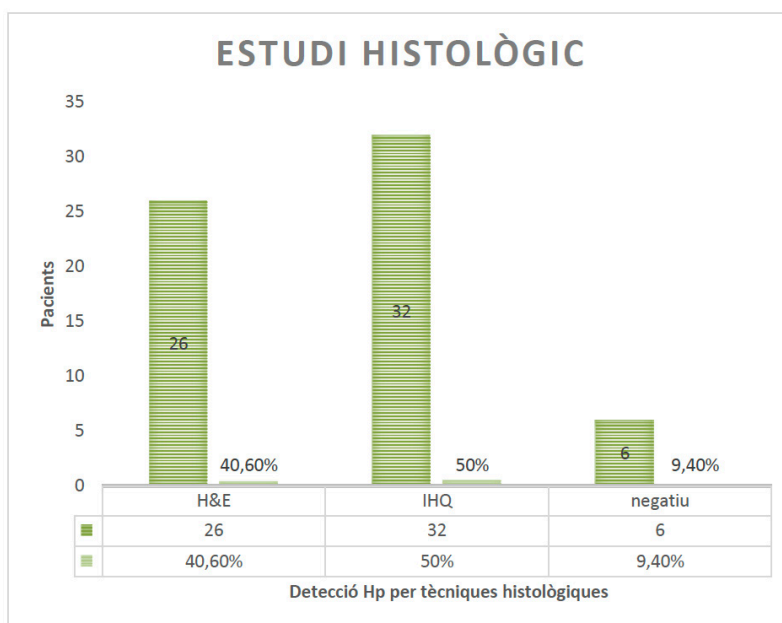


Figura 28. Resultat detecció *H. pylori* mitjançant la tècnica de H&E i /o mitjançant IHQ

En relació a l'estudi microbiològic, degut al baix rendiment del cultiu en les mostres processades inicialment, es va decidir no realitzar cultiu durant tot el període de la pandèmia COVID 19 per la sobrecàrrega assistencial que el servei de Microbiologia va patir durant gran part del període d'estudi. Per aquest motiu no disposem del seu resultat. Les mostres gàstriques es van congelar a -80° i es van processar posteriorment. Es van obtenir resultat en 60/64, essent en 4 casos no valorable per estat no òptim de la mostra. De les mostres en les que si es va poder realitzar la detecció de *H. pylori* mitjançant PCR, 54/60 (90%) van ser positives, tal i com s'observa en la Figura 29 (resultat obtinguts en el total de les mostres) i en Figura 30 (resultat obtinguts en les mostres vàlides).

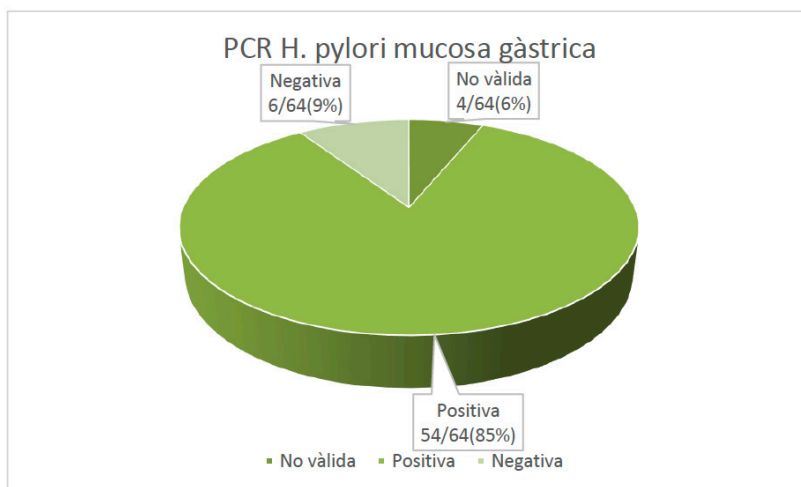


Figura 29. Resultats de la PCR *H. pylori* en el total de les mostres gàstriques processades

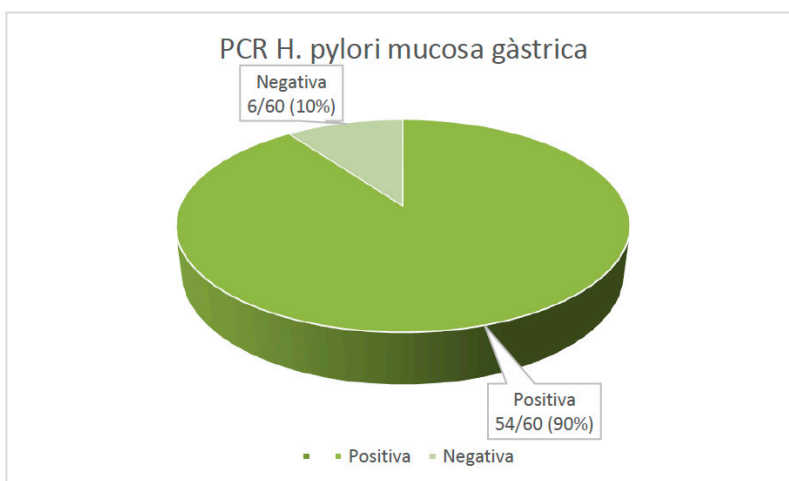


Figura 30. Resultats obtinguts en les mostres gàstriques que es van considerar vàlides

En les 54 mostres en les que va identificar PCR *H. pylori*, es va realitzar recerca de la mutació A2143G que confereix la resistència a la claritromicina. Aquesta mutació es va trobar en 22/54 (40,7%) (Figura 31).

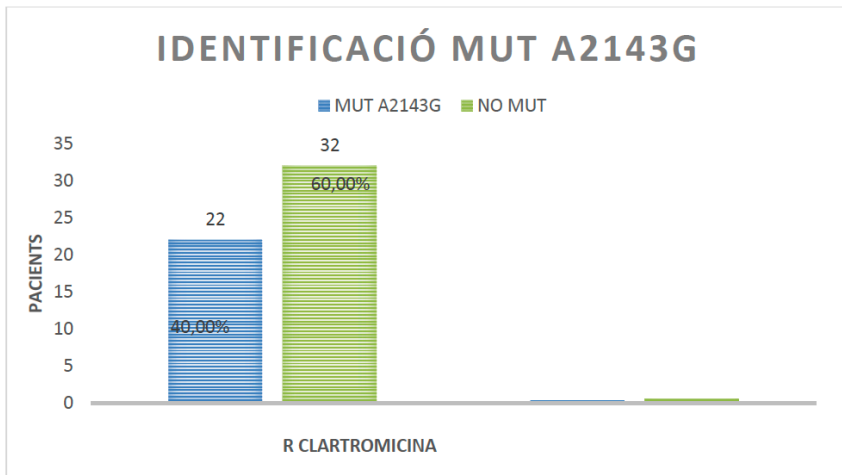


Figura 31. Identificació de la mutació A2143G responsable de la majoria de casos de resistència (R) a macròlids en el nostre medi.

Donat que no es va realitzar cultiu i que el processament de la PCR en mucosa gàstrica es va realitzar en un segon temps, es va decidir realitzar tractament empíric en els pacients (60/64) que o bé van presentar un Test de la ureasa positiu o bé estudi histològic positiu (H&E o IHQ). Els tractaments de primera línia pautats es mostren en la Figura 32.

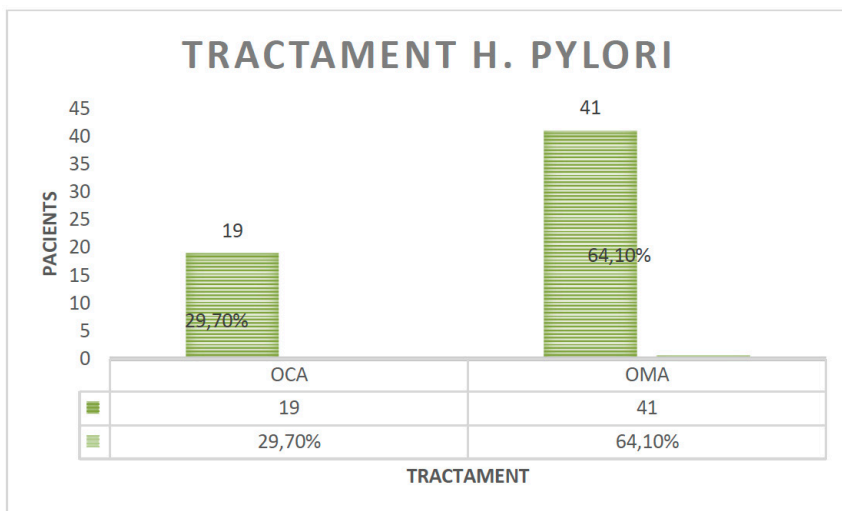


Figura 32. Tractament de primera línia. oca: omeprazol, claritromicina i amoxicilina; oma: omeprazol, metronidazol i amoxicilina.

Es va procedir a control post-erradicació amb determinació de SAT de tots els pacients tractats (60). Es va aconseguir mostra de femta en 58/60, amb 2 pèrdues de seguiment post-tractament. El 83% dels pacients que van rebre tractament i dels que van obtenir mostra de femta per control, van presentar negativització del SAT a les 8 setmanes d'haver finalitzat la teràpia erradicadora. Els resultats obtinguts es detallen en la Figura 33.

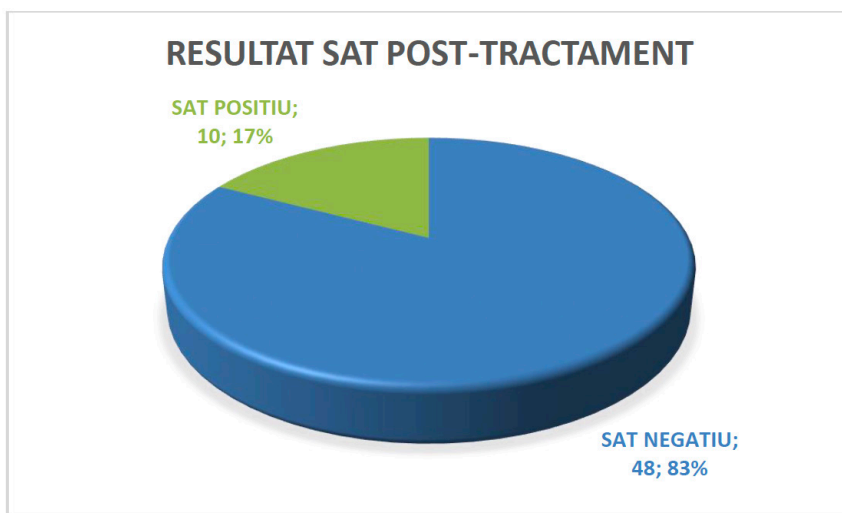


Figura 33. Resultat de SAT post tractament erradicador.
SAT: Stool Antigen Test

Dels 58/60 pacients dels quals es va poder fer seguiment, es va interrogar sobre simptomatologia post-tractament erradicador. 50/58 (86%) van presentar remissió de tots els símptomes mentre que 8/58 (13,7%) van referir epigastràlgia. Cap d'ells va referir piroxis ni cap altra símptoma digestiu (Figura 34).

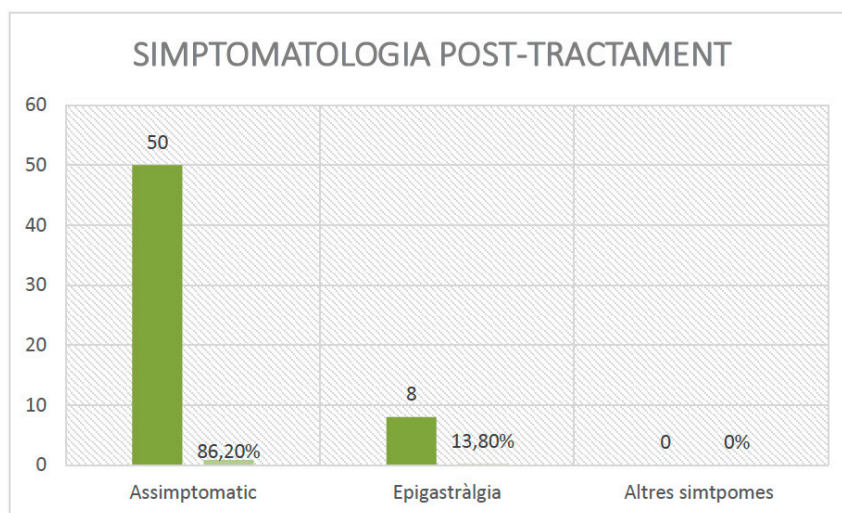


Figura 34. Evolució de la simptomatologia després de la realització del tractament erradicador

6.2.2. Anàlisi estadística

6.2.2.1. Anàlisi comparatiu en relació a les troballes de la FGS

Per l'anàlisi estadística es va simplificar el resultat de la fibrosgastrosòpia en normal o patològica, sense especificar tipus de troballa endoscòpica. El motiu d'aquesta simplificació va ser la dispersió de dades en massa subgrups que contenen pocs pacients en cada un d'ells, no permetent trobar associacions significatives entre les diferents variables.

En Figura 35 es detalla l'anàlisi comparatiu en relació a la FGS i les diferents variables exposades.



Figura 35. Associacions que vam analitzar en relació al resultat de la FGS

• **Relació entre FGS patològica i gènere**

En la Taula 18 es mostra els valors p obtinguts en relació al gènere, observant que no hi ha associació entre el gènere masculí/femení i una FGS patològica (p=0,63). OR 0,93 (IC 95%: 0,682-1,26).

Taula 18. Relació entre la troballa d'alteracions en la FGS i el gènere.
No s'ha trobat associació entre ambdues variables

Gènere	FGS patològica	FGS normal	Valor p	OR
masculí	19	8	0,63	0,93
femení	28	9		
total	47	17		

- **Relació entre tipus de símptoma i resultat FGS**

L'Associació entre el tipus de símptoma i les troballes en la FGS tampoc no va ser significativa amb un valor $p = 0,311$ (Taula 19). Per tant el tipus de símptoma no ens és útil per predir les troballes macroscòpiques de la FGS

Taula 19. Associació no estadísticament significativa entre el tipus de símptoma i la trobada de FGS patològica. AF: Anèmia Ferropènica.

SÍMPTOMA	FGS NORMAL	FGS PATOLÒGICA	TOTAL	Valor p
Epigastràlgia	14	44	58	0,311
A. Ferropènica (AF)	1	1	2	
Epigastràlgia + AF	2	1	2	
HDA	0	1	1	
TOTAL	17	47	64	

- **Relació entre FGS i resultat del Clotest®**

L'associació entre el resultat de la prova ràpida de la ureasa (Clotest®) i les troballes en FGS tampoc no van ser estadísticament significatives amb una $p = 0,31$ (Taula 20). Aquesta dada indica que una FGS normal no descarta la presència *H. pylori* en mucosa gàstrica.

Taula 20. Associació entre el resultat del Test ràpid de la ureasa (RUT) i les troballes endoscòpiques. $p=0,31$

Resultat Clotest	N total	FGS normal	FGS patològica	Valor p
RUT positiu	57	14	43	0,31
RUT negatiu	6	3	3	

- **Relació entre la FGS i les troballes histològiques**

En aquest cas si que es va trobar una associació estadísticament significativa entre la FGS patològica i alteració de la histologia (gastritis crònica activa amb un valor p de 0,04. (Taula 21)

Taula 21. Associació entre les troballes endoscòpiques i la presència d'alteració en l'anatomia patològica. p=0,04

Resultat histologia	FGS normal	FGS patològica	Valor p
Histologia Normal	3	0	0,04
Gastritis crònica activa	14	47	
Total	17	47	

- **Relació entre FGS i identificació de *Helicobacter pylori* en estudi anatomo-patològic**

No es va trobar relació estadísticament significativa entre les troballes endoscòpiques i la presència de *H. pylori* en estudi histològic, ja que aquest va ser positiu en 58/64 (90,6%). Només va ser negatiu en 6 pacients, dels quals 4/6 tenien FGS normal i 2/6 tenien alteració endoscòpica amb valor p de 0,51 (Taula 22) En els casos en que la H&E va ser negativa, es va realitzar la IHQ.

Aquesta dada, a l'igual que el Clotest®, indica que una FGS macroscòpicament normal, no descarta la presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica.

Taula 22. Relació entre la identificació *H. pylori* per tècniques histològiques i la FGS.
H&E: hematoxilina& eosina; IHQ: immunohistoquímica

Identificació <i>H. pylori</i>	Total	FGS normal	FGS patològica	Valor p
H&E i IHQ negativa	6	4	2	0,51
H&E positiva	26	7	19	
IHQ positiva	32	6	26	
Total	64	17	47	

- **Associació entre FGS patològica i identificació PCR *H. Pylori* positiva**

L'associació entre FGS patològica i determinació de PCR *H. pylori* positiva en mucosa gàstrica va ser estadísticament significativa amb una valor p de 0,038 (<0,05). Els resultats es mostren en la Figura 36. Aquesta dada senyala que una FGS patològica s'associa a la troballa de *H. pylori* en mucosa gàstrica mitjançant la tècnica de PCR.

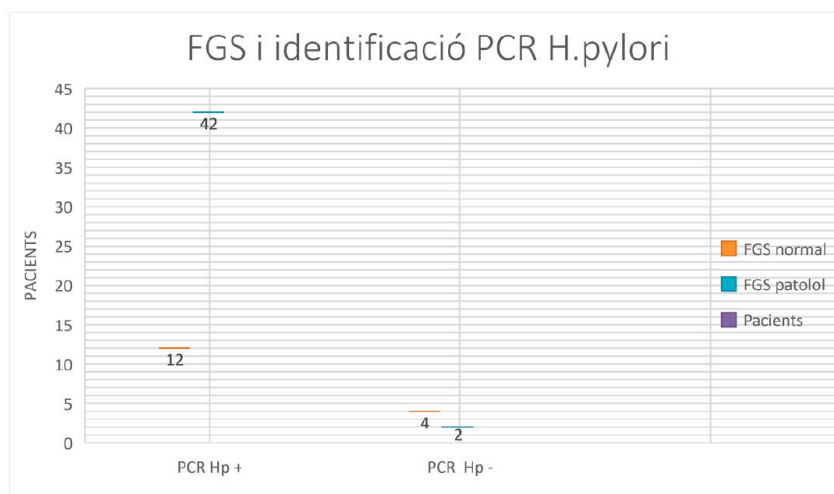


Figura 36. En 42/44 pacients amb FGS patològica es va identificar PCR+ d'*H. pylori* en mucosa gàstrica ($p= 0,038$), així com en 12/16 que tenien fgs macroscòpicament normal.

- **Associació entre les troballes FGS i la resistència a claritromicina**

L'associació entre la FGS patològica i la identificació de la mutació A2143G que confereix resistència a claritromicina, no va ser estadísticament significativa, amb un valor p de 0,161. Taula 23. Aquesta dada mostra que no existeix més lesió endoscòpica en els casos en els que *H. pylori* és claritomicin-resistent.

Taula 23. El gen de R a claritromicina es va trobar en 18/42 pacients amb FGS patològica i en 4/12 amb FGS normal. No es va observar una relació estadísticament significativa entre FGS patològica i més risc de resistència a cla (p 0,161)

Mutació A 2143G	FGS NORMAL	FGS PATOLÒGICA	TOTAL	Valor p
Si	4	18	22	0,161
No	8	24	32	
	12	42	54	

- **Associació entre FGS patològica i erradicació post-tractament**

En aquest cas tampoc es va trobar una associació significativa. Es va realitzar l'anàlisi estadístic en base als 58 pacients dels que si es disposa control post-erradicació amb SAT amb un valor p de 0,64. (Taula 24). De manera que els pacients que mostraven lesió endoscòpica no van presentar taxes d'erradicació menors que els presentaven una FGS normal.

Taula 24. Resultat de l'erradicació de la infecció per *H. pylori* amb SAT en funció dels resultats endoscòpics

RESULTAT SAT	FGS NORMAL	FGS PATOLÒGICA	TOTAL	Valor p
POSITIU	2	8	10	0,64
NEGATIU	11	37	48	
TOTAL	13	45	58	

6.2.2.2. Anàlisi comparatiu en relació la identificació de *Helicobacter pylori* per histologia (H&E o IHQ)

- **Associació amb simptomatologia presentada**

No s'ha trobat associació estadísticament significativa entre les diferents tècniques histològiques (H&E i IHQ) d'estudi de l'*H. pylori* i el tipus de símptoma presentat. Els casos en que s'ha determinat *H. pylori* mitjançant la tècnica de IHQ, era en aquells que presentaven una tinció d'H&E negativa, i que per tant tenien una càrrega bacteriana més baixa. Es a dir, els pacients en els que s'identificava l'*H. pylori* per tinció H&E tenien major càrrega bacteriana que en aquells que s'identificava per IHQ. No es va trobar per tant, associació entre el tipus de simptomatologia presentada i la càrrega bacteriana d'*H. pylori* ($p=0,768$) (Figura 37). Tot i així, com és lògic esperar, l'únic pacient de la nostra sèrie que va presentar HDA, es va identificar l'*H. pylori* per la tècnica de H&E, mostrant que aquest pacient presentava una càrrega bacteriana elevada.

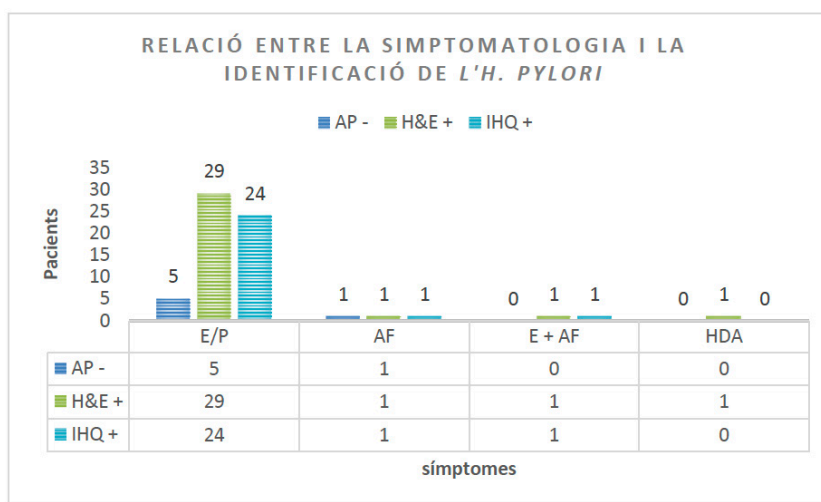


Figura 37. Associació entre clínica presentada i identificació *H. pylori* per tècniques histològiques. e:epigastràlgia; p:pirosis; AF:anèmia ferropènica; HDA: hemorràgia digestiva alta. AP -: anatomia patològica per determinació de *H. pylori* negativa. H&E: hematoxilina&eosina; IHQ: immunohistoquímica. valor $p=0,768$

- **Associació amb la realització de tractament previ**

No s'ha trobat tampoc associació entre el tipus tècnica pel qual s'ha identificat l'*H. pylori* i l'haver rebut o no tractament previ erradicador ($p=0,751$), per tant en la nostra cohort, els pacients que havien rebut ja un tractament previ no van presentar una menor càrrega bacteriana en comparació amb el grup naïf (Figura 38).

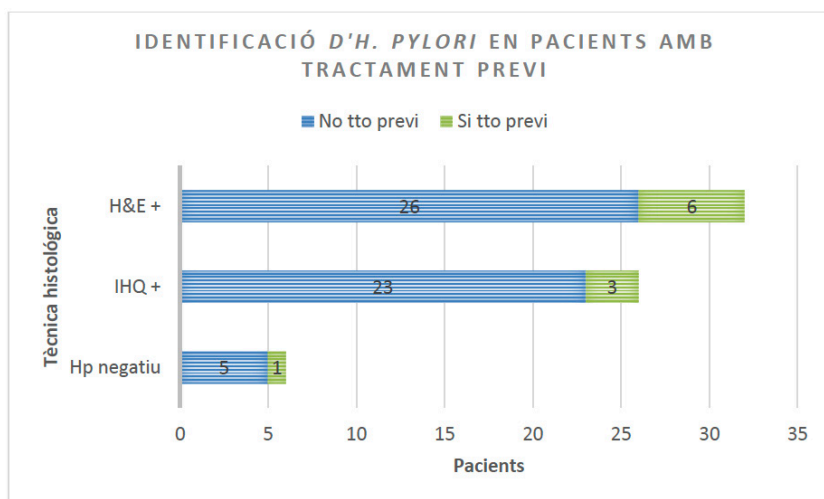


Figura 38. Associació entre la identificació de la *H. pylori* per H&E i/o IHQ i haver rebut tractament erradicador previ. TTO: tractament. ($p 0,751$)

- **Associació amb resultat Clotest®**

L'associació entre Clotest® positiu i la identificació de *H. pylori* per histologia va ser estadísticament significativa amb una valor p de 0,0. 6/62 pacients van tenir un resultat de Clotest® negatiu. En 5 d'ells tampoc es va identificar l'*H. pylori* per histologia. Només en un pacient de la nostra cohort va tenir un resultat de Clotest® negatiu, identificant-se l'*H. pylori* en la IHQ. En aquest pacients es va considerar el Clotest® com a fals negatiu. En aquest pacient la H&E va ser també negativa, degut a que presentava una càrrega bacteriana baixa. Aquest resultat indica que un Clotest® positiu, es correlaciona amb la presència de l'*H. pylori* per tècnica de H&E o IHQ (Figura 39).

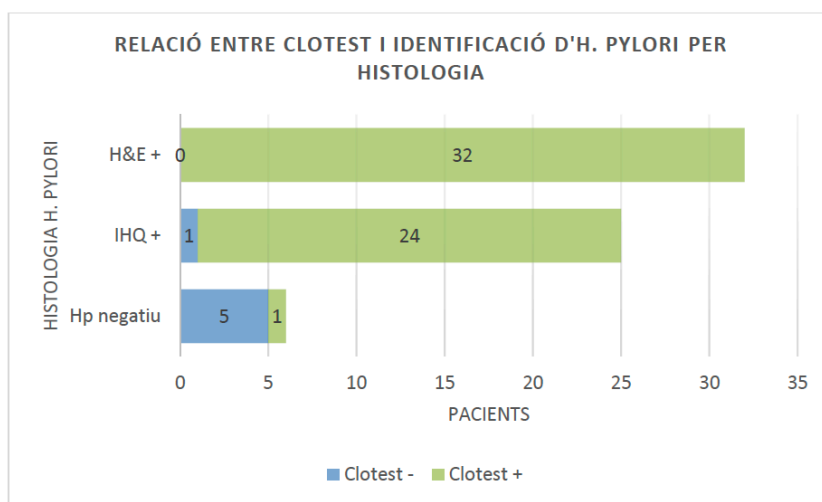


Figura 39. Associació entre Clotest® positiu i identificació de l'*H. pylori* per IHQ o H&E. p value de 0,0

- **Associació amb la identificació de PCR *H. pylori* positiva en mucosa gàstrica**

L'associació entre la identificació de l'*H. pylori* per IHQ o H&E i la presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica per tècnica PCR va ser estadísticament significativa amb un valor p de 0,0. Només en un cas es va obtenir un resultat de PCR positiu, amb un estudi histològic negatiu. Dels 5 casos restants en els que tant la H&E com la IHQ van ser negatives, no es va identificar tampoc *H. pylori* per PCR. Aquest resultat indica, doncs, la fiabilitat de les tècniques histològiques pel que fa a la determinació de la presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica (Figura 40).

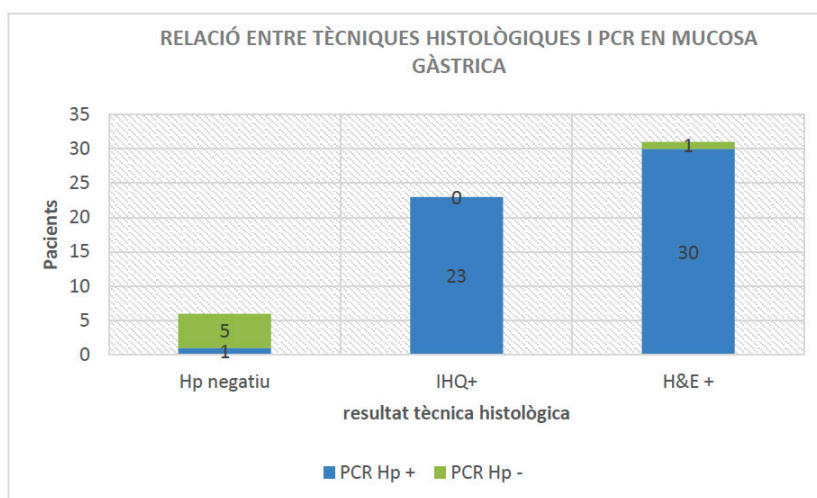


Figura 40. Associació entre histologia *H. pylori* i pcr en mucosa gàstrica. p value 0,0

6. 2. 2. 3. Anàlisis comparatiu en relació a la PCR en mucosa gàstrica

- **Associació entre el resultat de la PCR *H. pylori* en mucosa gàstrica i el resultat del SAT**

En la nostra cohort no vam trobar associació entre la PCR d'*H. pylori* en la mucosa gàstrica i un SAT positiu ($p=0,89$). Tots els pacients inclosos en el nostre estudi presentaven un SAT positiu, donat que era un criteri d'inclusió. En 6 casos (tots ells amb, doncs, SAT positiu), no es va detectar PCR d'*H. pylori* en mucosa gàstrica. Per tant, malgrat complir criteris clínics i tenir SAT positiu, no vam poder atribuir la simptomatologia a la infecció per *H. pylori* (Figura 41). Interpretem aquest resultat negatiu com a conseqüència de la petita mida mostral.

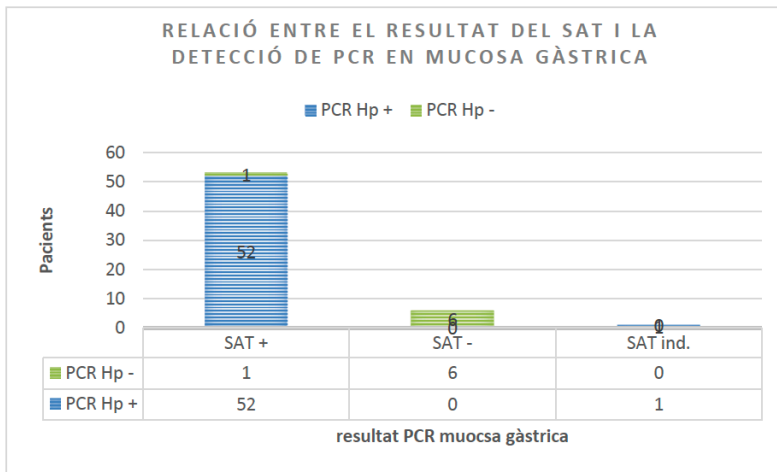


Figura 41. Correlació entre sat i pcr *H. pylori* en mucosa gàstrica. Valor p 0,89

- **Associació amb el Clotest®**

L'associació entre un resultat de Clotest® positiu i la detecció de PCR *H. pylori* en mucosa gàstrica va ser estadísticament significativa amb un valor p de 0,04 (Figura 42), indicant l'elevada sensibilitat del test ràpid de la ureasa per predir la presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica.

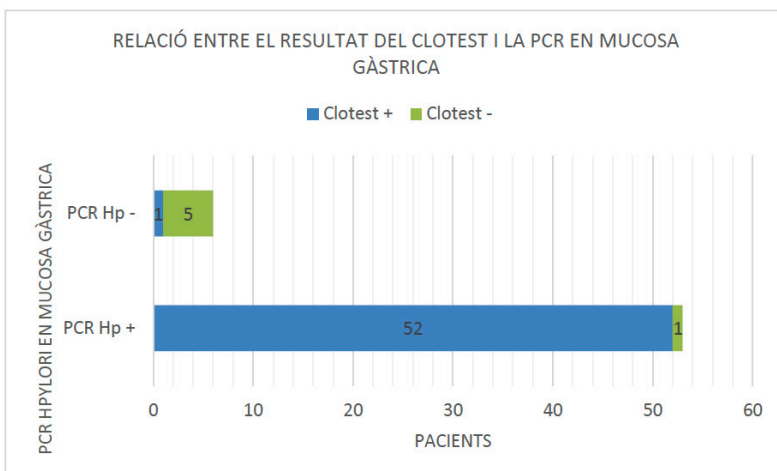


Figura 42. Associació entre resultat de la PCR en mucosa gàstrica i Clotest®. p=0,041

6.2.2.4. Anàlisi comparatiu en relació l'erradicació de *Helicobacter pylori*

- **Associació entre tipus de tractament prescrit (OMA o OCA)**

La comprovació de l'erradicació de *H. pylori* es va realitzar amb control de SAT a les 8 setmanes de la finalització del tractament. Es va realitzar en 58/64 pacients, donat que vam perdre el seguiment post-tractament en 6 casos. No es va trobar associació estadísticament significativa entre la taxa d'erradicació i la teràpia erradicadora prescrita ($p=0,458$). Tot i així, si que van presentar una major erradicació de la infecció els pacients que van rebre OMA (OR: 1,215) que els que els pacients que van rebre OCA (OR: 0,67) (Figura 43).

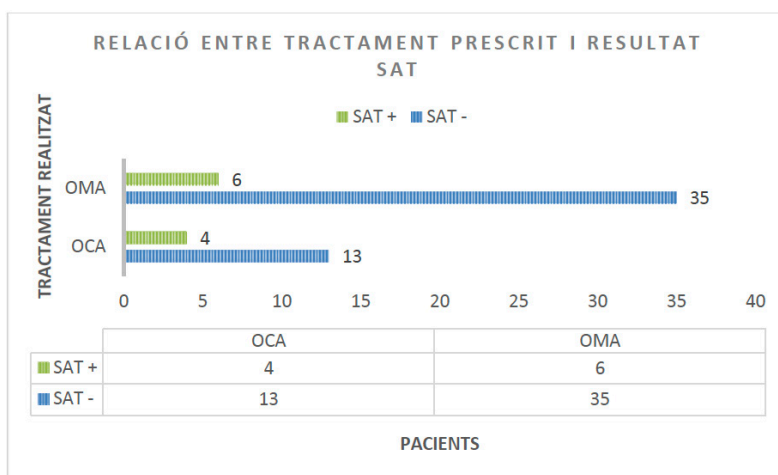


Figura 43. Correlació entre la teràpia erradicadora prescrita (OCA/OMA) i l'erradicació aconseguida, determinada per control de SAT. ($p=0,458$)

- **Associació amb la identificació de la mutació A2143G**

No s'ha trobat associació estadísticament significativa entre les taxes de erradicació, mesurades pel resultat de SAT post-tractament i la presència de la mutació A2143G, que confereix resistència a la claritromicina (valor $p=1$) (Figura 44). Aquesta dada indica que no va haver-hi diferències en les taxes d'erradicació obtingudes entre els pacients que mostraven resistència i els que no. Aquesta dada, s'analitza en la discussió.

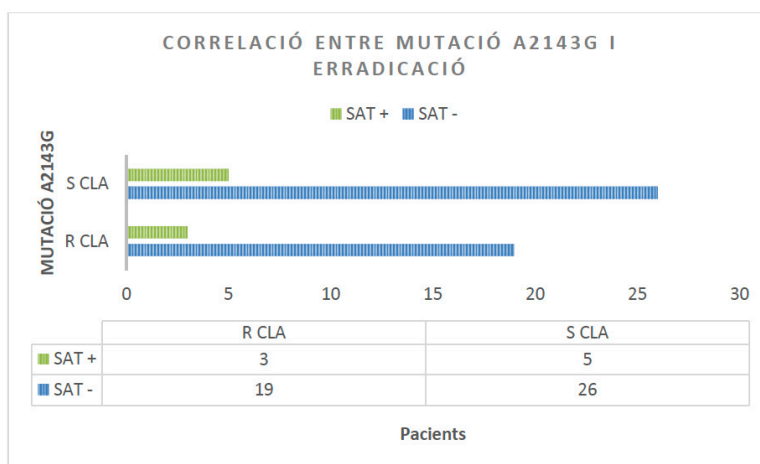


Figura 44. Associació entre la presència de la mutació A2143G i l'erradicació de l'*H. pylori* ($p=1$)

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

7. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

7.1. DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI DE DIENTAMOEBIA FRAGILIS

El paper etiopatogènic de la *D. fragilis* és, a dia d'avui, encara objecte de debat. Alguns autors defensen el seu paper etiopatogènic en la simptomatologia gastrointestinal per la seva capacitat de produir inflamació local en la mucosa del budell (12,13,32,42,178), mentre que d'altres autors continuen defensant la seva benignitat i el seu rol purament comensal, ja que s'ha aïllat tant en pacients simptomàtics com asimptomàtics (11,16,33,34,182). Els estudis publicats són difícils d'interpretar i de comparar donat que hi ha diferències importants en els seus dissenys, en la mostra seleccionada, en el mètode diagnòstic utilitzat (microscòpia òptica, cultiu o tècniques de biologia molecular) etc. Per altra banda, la majoria d'ells no compten amb un grup control per poder comparar els resultats obtinguts, fet que és una important limitació. Els estudis realitzats en població infantil també són molts escassos, per tant la literatura publicada fins a dia d'avui no permet treure conclusions definitives sobre el paper de la *D. fragilis* com a causant de patologia digestiva en pediatria. El nostre estudi va comparar la presència de *D. fragilis* en mostres fecals de nens sans i asimptomàtics amb mostres fecals de nens amb clínica intestinal en els quals s'havien exclòs altres causes. Malgrat que vam trobar més incidència del paràsit en el grup cas, la diferència no va ser estadísticament significativa ($p= 0,46$). El mètode microbiològic utilitzat va ser la Real-time PCR en tots els casos, no trobant en cap d'ells una microscòpia positiva. En el nostre estudi no vam determinar els nivells de CPF com a marcador d'inflamació intestinal ni per tant de la capacitat patògena del paràsit. Hi ha pocs estudis que avaluïn els nivells de CPF en la infecció per *D. fragilis*, i en els pocs estudis publicats que existeixen no mostren diferències estadísticament significatives entre la CPF de nens infectats simptomàtics o asimptomàtics (34,37). En referència als grups d'edat, en estudis poblacionals on es cerca la presència de *D. fragilis*, aquesta ha estat més present en el grup d'edat de 0-14 anys. Röser et al

(182), va analitzar mostres fecals de 9945 individus, trobant *D. fragilis* en el 39,9% total de les mostres, amb variacions entre el 12-71% en funció de la franja d'edat analitzada, presentant un pic d'incidència als 7 anys i amb un predomini de casos positius en el sexe femení. Girginkardesler et al (183), va analitzar 400 mostres fecals de pacients amb clínica digestiva entre 3 i 60 anys. Va identificar *D. fragilis* (aïllada o amb altres paràsits com la *Giardia lamblia*) en el 8,8% dels pacients, amb una incidència més elevada ($p < 0,05$) en el grup de 8 a 15 anys (14,8%). Menéndez et al (12), en una estudi realitzat a Astúries en 892 pacients, va trobar una incidència global de infecció per *D. fragilis* del 18,2%, amb un pic del 23,3% en menors de 14 anys. En un metaanàlisi realitzat per Wong et al. (184) es reporten taxes en població infantil del 36% si el diagnòstic ha estat realitzat mitjançant PCR, mentre que les taxes de prevalença quan el mètode diagnòstic utilitzat es la microscòpia, disminueixen per sota del 10%. En el nostre estudi, la incidència en el grup cas va ser del 29,8%, mentre que en el grup control va ser del 23,4%, dades similars a les publicades. En els estudis on el mètode diagnòstic utilitzat han estat les tècniques de biologia molecular, les taxes d'incidència han estat superiors, fet que demostra una major sensibilitat de la PCR enfront les tècniques convencionals.

Pel que fa a la distribució per sexes, no es va avaluar en el nostre estudi. En població adulta Röser et al (182) va descriure un pic d'incidència als 40 anys amb un clar predomini del sexe femení, però no hi ha estudis en edat pediàtrica que corroborin aquests resultats. Pel que fa a la diferència entre població autòctona i immigrant, Menéndez et al. (12) no va descriure resultats estadísticament significatius en aquest sentit. Aquesta variable no es va analitzar tampoc en el nostre estudi.

En referència a la simptomatologia presentada, en la nostra cohort, el dolor abdominal i la diarrea van ser els símptomes més freqüents (80,7% i 49,1% respectivament), coincidint amb els resultats publicats a la literatura (11,13,16,32,178,183). Aquests dos símptomes van ser més freqüents en els pacients del grup cas positius per *D. fragilis* que en els que no presentaven el paràsit. El meteorisme va ser el tercer símptoma més descrit (31%), però sense significació estadística ($p = 0,09$). L'eosinofília en sang perifèrica també va ser una de les variables

associades a la infecció parasitària, però amb resultats entre grup cas i grup control no estadísticament significatius. Degut als pocs casos que vam poder recopilar, finalment aquesta variable la vam excloure de la anàlisi. Curiosament, l'eosinofília va ser un dels paràmetres que es va associar a la persistència de PCR positiva després del tractament erradicador ($p=0,02$). Tot i que és un resultat molt preliminar i amb una mida mostral petita, l'eosinofília es podria correlacionar amb més fracàs del tractament antiparasitari.

En relació al tractament antiparasitari, els fàrmacs recomanats habitualment són el metronidazol, la paromomicina i el clioquinol. Alguns estudis recents recomanen paromomicina o clioquinol per tenir menys efectes secundaris, sobretot el clioquinol, i taxes d'erradicació més altes. Van Hellemond et al. (48) va descriure taxes d'erradicació amb paromomicina del 98% enfront del 57% d'erradicació amb metronidazol. Burgaña et al (50) va reportar taxes d'erradicació amb paromomicina del 81,8% davant del 65,4% amb metronidazol. Van Gestel et al. (49), recomana com a tractament de primera elecció el clioquinol. Tot i així, la majoria del estudis estan realitzats en població adulta i per tant cal extrapolar els resultat a població pediàtrica. Nagata et al. (185) va comparar la susceptibilitat de la *D. fragilis* in vitro de diferents fàrmacs, suggerint que els derivats del 5 nitromidazol (metronidazol, ornidazol, tinidazol) són els antimicrobians més efectius contra els trofozoïts de *D. fragilis*. Per altra banda el clioquinol no està comercialitzat a Espanya. La suspensió de paromomicina sovint presenta problemes de dispensació, a part que presenta tots els efectes secundaris dels aminoglicòsids, fet que ens va fer limitar el seu us. En la nostra cohort es va decidir per tant, tractar tots els pacients del grup cas amb PCR positiva amb metronidazol, donat que està comercialitzat en el nostre país tant en comprimit com en suspensió, alhora que és un fàrmac amb àmplia experiència en població pediàtrica. Es van tractar un total de 17 pacients, però només es va obtenir femta per control erradicació en 11. Els pacients del grup control que van presentar PCR positiva no van realitzar tractament. Es va aconseguir erradicació post-tractament en el 72,5%, taxes similars o inclús superiors a les descrites a la literatura (12,14,18,48-50,178,185).

Malgrat la negativització de la PCR, el 57% dels pacients continuava presentant clínica digestiva. En la nostra cohort es va observar una associació positiva (OD= 1,39) entre la presència del paràsit i la presència de clínica digestiva, però sense significança estadística ($p=0,46$), dada que no permet per tant, demostrar causalitat. Els nostres resultats coincideixen amb altres publicacions, on es posa en dubte la patogenicitat real de la *D. fragilis* (16,33,34,186). En el metaanàlisi publicat per Wong et al. (184), s'inclouen 47 estudis (tant pediàtrics com de població adulta), en el que acaben concloent que la relació entre la presència de *D. fragilis* i la diarrea com a símptoma de patologia digestiva és actualment inconsistent. Tot i així, tal i com hem esmentat prèviament, encara hi ha diversos autors que encara continuen defensant la seva patogenicitat (11,18,21,27,178) motiu pel qual el debat continua obert.

Com a resum final, el nostre estudi no recolza el paper etiopatogènic de la *D. fragilis* com a responsable de patologia gastrointestinal en població pediàtrica alhora que, com és d'esperar, posa en relleu la superioritat de les tècniques de biologia molecular en comparació a les tècniques convencionals. Un tret rellevant de la nostra investigació és que és un dels pocs estudis publicats en edat pediàtrica, prospectiu i comparat amb grup control.

Tot i així, hem detectat diverses limitacions importants, com ara la petita mida mostral, la pèrdua de seguiment d'alguns pacients per realitzar el control post-erradicació i finalment el tractament escollit, que segons l'evidència actual seria una opció de segona línia, sent el fàrmac d'elecció la paromomicina. Són necessaris estudis més amplis que permetin confirmar els nostres resultats i que avaluïn també el paper de l'*Enterobius vermicularis* com a vehiculitzador de la transmissió, variable que el nostre estudi no es va avaluar. Aquestes limitacions ens obliguen a interpretar els nostres resultats amb cautela.

7.2. DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI D'*HELICOBACTER PYLORI*

La infecció per *H. pylori*, al igual que la infecció per *D. fragilis*, és també molt prevalent i amb adquisició habitualment en edat pediàtrica. És àmpliament conegut i demostrat el seu paper etiopatogènic en el desenvolupament de malaltia ulcerosa gastro-duodenal així com també el seu potencial poder carcinogènic (53-55,65,68,74,76,83,122,127,138,149,154,156,168,187-190). Tot i així és important saber quan i com l'hem de buscar i quan i com l'hem de tractar. La presència d'un test no invasiu positiu no sempre indica patologia gàstrica ni justifica sempre la simptomatologia presentada, i per tant el tractament de la bactèria en aquesta situació no presentarà cap benefici.

Per aquesta raó, les guies actuals de maneig de la infecció en pediatria (98,138) recomanen restringir la cerca de l'*H. pylori* només en aquells casos en els que la clínica sigui compatible (és a dir en els casos de sospita de patologia ulcerosa, anèmia refractària a la ferroteràpia oral i en els casos de PTI crònica) i insisteixen en evitar la investigació de la bactèria com a causa de dolor abdominal inespecífic o recurrent, de patologia gastro-intestinal no ulcerosa i en nens amb antecedents familiars de neoplàsia gàstrica. Sovint es realitza estudi de SAT o test de l'alè en població pediàtrica amb clínica no compatible amb infecció amb *H. pylori*, fet que comporta tractament del mateix sense justificació. En l'enquesta que vam realitzar als pediatres d'Atenció Primària de la nostra àrea, el 40% va admetre iniciar estudi de *H. pylori* (97% dels enquestats va realitzar SAT) en dolor abdominal de característiques funcionals. En els casos en que es va obtenir un resultat positiu, el 60% dels pediatres prescrivia tractament erradicador de manera empírica, quedant palès l'escàs seguiment de les recomanacions dels experts.

La raó per la qual en pediatria es recomana la investigació directe en mucosa gàstrica, és perquè sovint la presència de l'antigen en femta no es correlaciona amb la presència del mateix en mucosa gàstrica ni amb la presència de dany histològic. Per tant el tractament de l'*H. pylori* no millorarà en aquests casos la simptomatologia, donat que no és l'agent

causal del quadre clínic a estudiar. Es per aquest motiu, doncs, que les guies pediàtriques recomanen limitar la seva recerca només en els pacients que presentin clínica compatible amb la infecció alhora que desaconsellen la utilització de l'estratègia «test and treat». Aquestes mateixes guies posen èmfasi en la realització de FGS en tots els pacients en el que es sospita patologia ulcerosa, amb realització de cultiu, test ràpid de la ureasa, tècniques histològiques (H&E / IHQ) i sempre que es pugui, recomanen demostrar la presència de DNA bacterià en mucosa gàstrica mitjançant tècniques de biologia molecular, donada la poca sensibilitat del cultiu. L'objectiu final és sempre poder objectivar de manera directa el microorganisme in situ per poder establir una relació causal entre el dany histològic, la simptomatologia del pacient i la presència de *H. pylori* com agent etiològic. En la realitat, però, tot i l'ampli coneixement d'aquestes guies per la majoria dels professionals, la seva aplicació en la pràctica clínica del dia a dia és escassa. Bonilla et al. (191), en un article publicat el 2021 refereix que a USA l'adherència dels gastroenteròlegs pediàtrics a les guies de ESPGHAN/NASPGHAN (98) es molt baixa. Només en un 3% dels casos es realitza FGS i cultiu, amb un ús extremadament elevat de l'estratègia «test and treat», utilitzant els mètodes no invasius com a única eina diagnòstic. Per altra banda, en el mateix article es refereix que es prescriu tractament amb règims que contenen claritromicina en 2/3 dels pacients, quan les guies recomanen evitar l'ús de la claritromicina quan es desconeix la sensibilitat antibiòtica. Aquests resultats a USA, coincideixen en força mesura als que nosaltres vam obtenir amb l'enquesta que vam realitzar als gastroenteròlegs del grup de treball de Gastroenterologia Pediàtrica de la SCP. En el nostre estudi els resultats van ser una mica millors pel que fa al diagnòstic. Tot i així, el 31% dels especialistes realitzaven el diagnòstic sense FGS, emprant directament l'estratègia "test and treat". El desconeixement en el nostre àmbit de les resistències antibiòtiques era també molt alt (el 76% dels enquestats referien no conèixer la sensibilitat antibiòtica de *H. pylori* en la seva àrea geogràfica). El motiu d'aquest desconeixement era per la no realització de cultiu o be per la baixa rendibilitat del mateix. Tot i no conèixer la sensibilitat antibiòtica, i en contra de les recomanacions, gairebé el 30% dels gastroenteròlegs

pediàtrics i aproximadament la meitat dels pediatres d'atenció primària, pauten claritromicina com a tractament de primera línia.

Probablement la «millor» adherència a les guies a Catalunya es deu al fet de que gaudim d'una sanitat pública, a diferència dels USA, cosa que facilita la realització de més proves diagnòstiques. Malgrat tot, sorprèn la moderada adherència a les recomanacions dels experts, amb presència de l'ús de tècniques no invasives (i per tant indirectes) pel diagnòstic de la infecció i a l'elevada prescripció de claritromicina. Hi ha diversos motius que podrien justificar aquesta manca de seguiment per part dels professionals, com pot ser el temps d'espera per la visita amb l'especialista, el temps d'espera per la realització de la FGS, la necessitat d'anestèsia (anestèsia general en el cas de nens per sota de 5 anys) etc. . motius que enredereixen el diagnòstic i per tant l'inici del tractament. Per altra banda, un dels objectius de la FGS és obtenir mostres de mucosa gàstrica per poder realitzar cultiu i estudi d'antibiograma a fi de prescriure una teràpia dirigida. En la pràctica clínica real, la rendibilitat del cultiu és baixa (al voltant del 50%) (101,105), fet que obliga a prescriure tractament empíric malgrat haver realitzat la FGS.

Aquesta realitat obliga a investigar mètodes alternatius fiables i que es puguin realitzar en mostres de fàcil obtenció (com ara la saliva o la femta). El desenvolupament de les tècniques de biologia molecular amb les NGS i l'estudi de resistències per PCR podrien solucionar en gran mesura aquests obstacles. Diversos autors han publicat recentment la bona correlació de la PCR en mostres fecals i la infecció per *H. pylori* (121,147,192). Beckman et al. (192), a més va descriure una bona correlació entre la PCR en femta i el SAT. És important per tant, conèixer aquesta correlació, per poder confirmar que l'estudi en femta és suficientment sensible i específic per poder obviar l'estudi en mucosa gàstrica. En la nostra cohort, els pacients es van seleccionar en funció de clínica compatible segons les guies actuals i amb SAT positiu. En tots ells es va realitzar FGS. La FGS mostrava lesió macroscòpica en el 73,4%, sense significació estadística pel que fa a la relació amb el tipus de símptoma ($p=0,3$). En tots els pacients es van obtenir mostres de mucosa gàstrica per histologia i cultiu,

independentment del resultat macroscòpic de la FGS. El 94% de les biòpsies van mostrar alteració histològica (principalment gastritis crònica activa) amb un valor p estadísticament significatiu ($p=0,04$). La troballa de *H. pylori* per tècniques de tinció (H&E) o per IHQ va ser del 90,6%. L'associació entre histologia positiva, independentment de la tècnica, i la PCR *H. pylori* en mucosa gàstrica va ser estadísticament significativa amb un valor $p=0,0$. Només és un cas es va obtenir una PCR positiva amb estudi histològic negatiu. Per tant, podríem deduir que en pacients seleccionats per símptomes compatibles amb infecció *H. pylori* i amb SAT positiu, la correlació amb identificació de *H. pylori* per histologia i per PCR en mucosa gàstrica és molt alta, confirmant que en pacients seleccionats, el SAT positiu indica presència de *H. pylori* en mucosa gàstrica. Segons l'estudi de Beckman la PCR en femta es correlaciona amb SAT positiu, per tant podríem extrapolar que en aquest pacients l'estudi de PCR en femta seria suficient pel diagnòstic de infecció per *H. pylori*, alhora que permetria realitzar estudi de resistències antibiòtiques. Graham (147), en un article publicat aquest any 2023, basant-se en la premissa que l'*H. pylori* present en mucosa gàstrica es desprèn cap a la llum intestinal, amb eliminació d'antígens i material genètic per la femta, defensa que les mostres fecals son una font fiable de DNA bacterià, podent detectar-lo mitjançant tècniques de PCR, alhora que aquestes tècniques ens permetrien detectar mutacions que es correlacionen amb resistències antibiòtiques. Actualment a Europa encara no hi ha kits comercialitzats i validats per l'estudi en mostres fecals. A USA l'únic kit comercialitzat detecta només resistència claritromicina (Mayo Clinical Laboratory). Les proves de susceptibilitat basades amb les NGS poden detectar resistència fins a 6 antibiòtics en mostres fresques, congelades i fins i tot en mostres gàstriques fixades amb formalina. Tot i així l'ús de les NGS a la pràctica clínica pot ser complexa, ja que el formol pot degradar el DNA, obtenint-se fragments més petits que són insuficients per l'aplicació d'algunes tècniques de NGS. En aquest aspecte s'obre tot un camp de futur, amb la validació d'aquestes tècniques en mostres fecals, pas definitiu per poder obviar la realització de FGS per l'obtenció de mostres gàstriques. En la nostra cohort hem pogut correlacionar la presència de *H. pylori* en

mucosa gàstrica i l'antigen en femta positiu en 54/60 dels casos (90%). En 6/60 (10%) l'antigen en femta va ser positiu, però la PCR en mucosa gàstrica va ser negativa, amb un resultat no estadísticament significatiu ($p=0,81$). Atribuïm aquesta manca de significança estadística a la petita mida mostral. Tot i així, en el 90% dels casos vam demostrar una bona correlació, indicant, per tant, que probablement que les mostres fecals son una bona font de material genètic d'*H. pylori*.

En referència a les resistències antibiòtiques, tal i com hem esmentat an l'apartat de material i mètodes, vam decidir no realitzar cultiu degut a la pressió assistencial del servei de microbiologia durant els pràcticament dos anys de pandèmia. En les 15 mostres inicials (reclutades entre el 2019 i principis del 2020), no vam obtenir cap cultiu positiu. Donada aquesta baixa rendibilitat i la necessitat d'optimitzar recursos, es va decidir obviar el cultiu. Les mostres gàstriques es van congelar, i es va realitzar la PCR en un segon temps. Els kits actualment comercialitzats permeten només identificar la resistència a claritromicina i a quinolones. En la nostra cohort, de les 54/60 PCR positives que vam obtenir, en 22/54 es va identificar la mutació A2143G que indica resistència a claritromicina. Per tant, segons les nostres dades, en la nostra població hi ha un 40% de resistència a claritromicina, indicant que la nostra àrea te una alta taxa de resistència a aquest antibiòtic (>15%). Aquesta és, segons el nostre coneixement, la primera dada reportada de resistència a claritromicina en la nostra zona geogràfica. Aquesta evidència obliga a eliminar la claritromicina com a tractament empíric de primera línia. Malfertheiner et al (55) en un article publicat aquest any 2023 refereix una resistència mundial global a claritromicina del 25-30%, sensiblement inferior a la trobada en la nostra cohort. Al no tenir cultiu, no hem pogut avaluar la resistència a metronidazol. Tot i així, sabem que la resistència in vitro no s'equival exactament a la resistència in vivo, degut a que aquesta disminueix quan s'administra conjuntament dosis altes de IBP i/o sals de bismut. En la nostra sèrie vam realitzar tractament empíric en tots els casos, donat que no vam realitzar cultiu (o aquest va ser negatiu) i que la PCR es va dur a terme en un segon temps. En el 85,4% dels pacients tractats amb pautes que contenien metronidazol (64,1% del total de tractaments)

es va aconseguir erradicar l'*H. pylori*, obtenint un SAT post- tractament negatiu. En el cas de la les pautes que contenien claritromicina (29,7% del total de tractaments), es va aconseguir erradicació en el 76,5%. No vam trobar diferències estadísticament significatives ($p=0,458$) entre les taxes d'erradicació i el tractament antibiòtic prescrit, resultat que s'ha atribuït també a la petita mida mostral. Una altra de les raons d'aquesta escassa diferència, és el fet de que el gen de resistència a Claritromicina només es va trobar en 7 dels pacients tractats amb la mateixa. La resta de mutacions de resistència es van trobar en el grup que va rebre tractament amb metronidazol. El fet de que no s'obtinguessin taxes d'erradicació més altes en els pacients que van rebre metronidazol, podria ser degut a una falta d'adherència al tractament prescrit, efectes secundaris del mateix o be resistència a metronidazol, que com hem dit no va ser avaluada. Actualment es considera que cal aconseguir unes taxes d'erradicació superiors al 90%. En la nostra cohort aquestes taxes va ser molt més baixes quan el tractament administrat contenia claritromicina (76,5%) i més altes quan contenia metronidazol (85,4%), però ambdues inferiors a les aconsellades.

Aquest estudi presenta dues limitacions molt importants. La primera limitació ha estat la petita mida mostral. Al tractar-se d'un estudi pilot s'han inclòs pocs pacients, i aquesta és una de les raons per les quals molts resultats no han aconseguit obtenir significança estadística. La segona limitació important ha estat el no haver realitzat cultiu ni estudi de resistències per antibiograma, motiu pel qual només hem pogut estudiar les taxes de resistència a claritromicina. Desconeixem per tant, quines són les taxes de resistència a metronidazol i a quinolones en el nostre medi. Aquestes limitacions ens obliguen a interpretar els nostres resultats amb cautela.

7.3. DISCUSSIÓ CONJUNTA

La infecció per *H. pylori* i la infecció per *D. fragilis* son dues infeccions molt prevalent en el nostre medi, tal i com s'ha anat mostrant al llarg de la tesi. Per altra banda la presència de simptomatologia del tracte gastro-intestinal és un dels motius de consulta més freqüent tant en l'Atenció Primària com

en la consulta especialitzada. Per tant la presència de *H. pylori* i de *D. fragilis* en aquests pacients, pot fer establir una relació de causalitat entre el microorganisme i la clínica digestiva. És per aquesta raó que és important saber quan està justificat buscar aquestes infeccions i quan està justificat tractar-les. En el nostre estudi no hem trobat una relació etiopatogènica de la *D. fragilis* amb clínica digestiva, motiu pel qual no aconsellem la seva investigació ni el seu tractament en cas d'identificar el paràsit. En el cas de *H. pylori*, hi ha situacions concretes en les que si cal investigar-lo. Ha quedat àmpliament demostrat que les tècniques de biologia molecular són molt més sensibles que les tècniques microbiològiques clàssiques, i que el desenvolupament d'aquestes no només ens ajudarà al diagnòstic de l'agent infecciós sinó també a l'estudi de resistències antibiòtiques en mostres de fàcil obtenció, com ara la femta. Aquest avenç és un pas de gegant que permetrà realitzar tractaments antibiòtics dirigits, evitant l'empirisme i per tant evitant el desenvolupament de resistències. Un missatge bàsic del nostre estudi, és transmetre la no necessitat de tractament de la *D. fragilis*, evitant així un sobre ús del metronidazol, antibiòtic de primera línia en el tractament de *H. pylori* en el nostre medi, donada l'alta taxa de resistència que hem trobat a claritromicina. Tenir una política racional de l'ús d'antibiòtics és la clau per tenir un millor control de les resistències, primera causa de mort mundial en les pròximes dècades.

CONCLUSIONS

8. CONCLUSIONS

1. Les tècniques de biologia molecular (Real time-PCR) són superiors a les tècniques microbiològiques convencionals per determinar la presència de *Dientamoeba fragilis* i d'*Helicobacter pylori* en mostres fecals i en mucosa gàstrica respectivament
2. Segons el nostre estudi, el tractament de la *Dientamoeba fragilis* no està justificat, donat que no s'ha demostrat que tingui un paper etiopatogènic clar ni que sigui responsable de simptomatologia gastro-intestinal en pacients pediàtrics.
3. En pacients seleccionats, la positivitat de l'antigen d'*Helicobacter pylori* en femta es correlaciona amb lesió histològica i amb la presència de DNA bacterià en mucosa gàstrica.
4. Les tècniques histològiques per determinar *Helicobacter pylori* (H&E i IHQ) es correlacionen amb la presència de DNA bacterià en mucosa gàstrica. En cas de no poder realitzar cultiu o PCR, la negativitat de la H&E /IHQ pot descartar la infecció.
5. La taxa de resistència a claritromicina en l'àrea de la Metropolitana Nord de Barcelona és del 40%, considerant aquest territori altament resistent.
6. En la nostra àrea, el tractament empíric de primera línia de la infecció per *Helicobacter pylori* no pot contenir Claritromicina.
7. El metronidazol és un antibiòtic imprescindible en les teràpies erradicadores de l'*Helicobacter pylori*. Cal evitar el seu sobre ús no justificat en altres infeccions, com és el cas de la infecció per *Dientamoeba fragilis* a fi de reduir el desenvolupament de resistències.
8. Les mostres fecals són una font apta per obtenir DNA bacterià, que poden permetre el diagnòstic de la infecció i l'estudi de resistències antibiòtiques.

9. L'avenç en les tècniques de biologia molecular en mostres de fàcil obtenció pot ajudar a simplificar les guies actuals de *Helicobacter pylori*, facilitant un millor seguiment per part dels clínics.

ANNEXOS

9. ANNEXOS

9.1. ANNEX 1

9.1.1. Enquesta a Gastroenteròlegs Pediàtrics de la Societat Catalana de Pediatria)

Enquesta realitzada mitjançant un qüestionari Google Forms als membres del Grup de Treball de Gastroenterologia la SCP. Van participar un total de 42 facultatius. El 68% dels enquestats exercien en l'àmbit de la sanitat pública, la majoria d'ells en hospitals de segon nivell (68%) i tercer nivell (32%). El 70% dels enquestats treballen a la província de Barcelona

9.1.1.1. Resultats

- Els 100% afirmava conèixer les guies de Maneig de la infecció per *H. pylori* de la SEGHN (138) i/o de la ESPGHAN/NASPGHAN (98)
- El 97% dels pacients que arribaven a la Consulta especialitzada eren remesos des de l'Atenció Primària.
- El 93% dels pacients remesos aportaven un test no invasiu (SAT o TAU C¹³) positiu. Només un 5% es remetien per serologia positiva (IgG *H. pylori*)
- El 49% dels casos es va remetre després d'haver realitzat tractament erradicador empíric, a fi de realitzar seguiment des de la consulta especialitzada.
- En cas de positivitat de Test no invasiu, el 31% dels gastroenteròlegs NO realitzaven gastroscòpia i tractaven de manera empírica, és a dir, una tercera part dels especialistes van reconèixer realitzar l'estratègia *Test and Treat*, en contra de les recomanacions de les guies pediàtriques

- Del 69% d'especialistes que si feien fibroscopios amb presa de biòpsies, el 84% agafaven mostres per cultiu. Per tant, un 16% no realitzava cultiu.
- Quan es va preguntar per la tècnica de detecció de *H. pylori* per tècnica de PCR, aquesta només era accessible en el 22% dels centres.
- El 76% dels gastroenteròlegs referien realitzar RUT en una de les mostres de biòpsia gàstrica.
- Pel que fa a les resistències antibiòtiques, el 76% dels gastroenteròlegs va afirmar no conèixer les resistències antibiòtiques de la seva àrea.
- En referència al tractament el 71,4 % afirmava prescriure tractament de primera línia amb triple teràpia amb pautes que inclouen metronidazol mentre que el 28,6% prescrivia tractament empíric amb claritromicina, tot i no tenir dades sobre la sensibilitat antibiòtica ni sobre les taxes de resistència de la seva àrea.
- El 95% dels especialistes pautava tractament durant 14 dies de tractament. Només un 5% dels enquestats realitzava pautes curtes.
- El 95% dels especialistes realitzava un test no invasiu per comprovar erradicació post-tractament.
- El 59% prescrivien tractament coadjuvant amb probiòtics.

Segons els resultats obtinguts en aquesta enquesta als especialistes de Gastroenterologia pediàtrica, podem concloure que malgrat el coneixement de les guies de maneig de la infecció per *H. pylori*, l'adherència a les mateixes és discreta/moderada en una gran part dels hospitals. Cal destacar el baix coneixement de les resistències antibiòtiques locals i amb un ús de claritromicina empírica com a tractament de primera línia molt elevat, en contra de recomanacions actuals. Aquests resultats ens haurien de fer reflexionar del motiu pel qual, en la pràctica clínica real, tot i ser coneixedors de les guies, una part important dels especialistes no segueixen les recomanacions. Els resultats d'aquesta enquesta es van presentar en el XXIX Congreso de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediàtrica (SEGHNP) realitzat a Còrdova el maig 2023, com a comunicació oral.

9.1.2. Enquesta als pediatres d'Atenció Primària de la Regió Metropolitana Nord de Barcelona

Enquesta realitzada a través d'un qüestionari Google Forms que es va enviar als pediatres que exerceixen en l'àrea sanitària de la Metropolitana Nord de Barcelona. Van contestar el qüestionari un total de 58 facultatius.

9.1.2.1. Resultats

- El 57% dels pediatres enquestats va afirmar no seguir cap guia de maneig de la infecció per *H. pylori*. Del 43% que si afirmava seguir guies de maneig, el 75% es basaven els protocols de la Asociación Española de Pediatría (AEP) publicades per Perdomo et als (193).
- El 40 % afirmava realitzar estudi de infecció per *H. pylori* en dolor abdominal recurrent o de característiques funcionals, en contra de les recomanacions actuals.
- El test no invasiu més emprat pel diagnòstic de l'*H. pylori* va ser el SAT, en un 97% dels casos.
- El 60% dels pediatres, en cas de prova no invasiva positiva, afirmava realitzar directament tractament de manera empírica.
- Quan es va preguntar sobre el tractament, el 26% dels pediatres no va respondre a la pregunta. Dels que si que va respondre, el 34% realitzava tractament de primera línia amb triple teràpia amb pautes que contenien claritromicina, el 29% ho feia amb pautes que contenien metronidazol, el 5% realitzava teràpia quàdruple amb sals de bismut i el 6% restant no tractava. La majoria dels enquestats (81%) va prescriure pauta erradicadora durant 14 dies.
- El 58% sol·licitava control post-erradicació amb un test no invasiu (98% dels casos la prova realitzada va ser SAT).
- Gairebé el 30% de pediatres no realitzava control per comprovar erradicació si els símptomes s'havien resolt.
- En cas de no erradicació o no resolució de la simptomatologia després del tractament, el 62% dels pediatres remetia el pacient a la consulta especialitzada

- Pel que fa referència al coneixement de resistències antibiòtiques, el 98% dels pediatres va admetre no saber les taxes de resistència a claritromicina de la seva àrea geogràfica.

Segons els resultats obtinguts en aquesta enquesta, podem concloure que en la pràctica clínica real, en els centres d'Atenció Primària també s'observa en general, una baixa adherència a les guies publicades.

Els dos col·lectius enquestats mostren globalment un elevat desconeixement de les taxes de resistència antibiòtica de l'*H. pylori*, amb un alt ús empíric de la claritromicina.

En resum, segons aquestes dades, en el nostre medi existeix un elevat diagnòstic d'infecció per *H. pylori* sense comprovació de la seva presència en mucosa gàstrica, fet que comporta segurament un sobrediagnòstic i per tant a un sobretractament del mateix. Aquest fet esdevé una de les justificacions fonamentals del nostre estudi.

9.2. ANNEX 2

9.2.1. Aprovació Comitè Ètica estudi *Dientamoeba fragilis*

 <p>Germans Trias i Pujol Hospital</p>	 <p>Institut Català de la Salut</p>																
Comitè d'Ètica de la Investigació																	
DICTAMEN DEL COMITÈ D'ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ																	
El Dr. Magí Farré Albaladejo, President del Comitè d'Ètica de la Investigació de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,																	
CERTIFICA																	
Que aquest Comitè ha avaluat la proposta de realització del projecte d'investigació:																	
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 15%;">CODI</td> <td style="width: 45%;">DIENTA</td> <td style="width: 20%;">REF.CEI</td> <td style="width: 20%;">PI-17-166</td> </tr> <tr> <td>TÍTOL</td> <td colspan="3">Diagnòstic de <i>Dientamoeba fragilis</i>. Paper etiopatogènic en simptomatologia gastrointestinal en pacients pediàtrics. Versió 2</td> </tr> <tr> <td>PROMOTOR</td> <td colspan="3">Servei de Microbiologia (HUGTIP)</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat grup cas" versió (no consta) ; Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat "grup control" versió (no consta)</td> </tr> </table>	CODI	DIENTA	REF.CEI	PI-17-166	TÍTOL	Diagnòstic de <i>Dientamoeba fragilis</i> . Paper etiopatogènic en simptomatologia gastrointestinal en pacients pediàtrics. Versió 2			PROMOTOR	Servei de Microbiologia (HUGTIP)			Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat grup cas" versió (no consta) ; Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat "grup control" versió (no consta)				
CODI	DIENTA	REF.CEI	PI-17-166														
TÍTOL	Diagnòstic de <i>Dientamoeba fragilis</i> . Paper etiopatogènic en simptomatologia gastrointestinal en pacients pediàtrics. Versió 2																
PROMOTOR	Servei de Microbiologia (HUGTIP)																
Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat grup cas" versió (no consta) ; Full d'Informació al Pacient i Consentiment Informat "grup control" versió (no consta)																	
i considera que:																	
<ul style="list-style-type: none"> ➢ Es compleixen els requisits necessaris d'adequació del protocol en relació amb els objectius de l'estudi i que l'estudi compleix amb els aspectes que es recullen a la Llei d'Investigació Biomèdica 14/2007. ➢ El procediment per obtenir el consentiment informat, incloent el full d'informació per als subjectes i el pla de reclutament de subjectes previstos són adequats. ➢ El procediment previst per al maneig de dades personals és adequat. ➢ La capacitat de l'investigador i els seus col·laboradors, així com els mitjans disponibles són apropiats per realitzar el projecte. ➢ En cas d'obtenció i processament de mostres biològiques, aquesta s'adequarà al que preveu el Reial Decret 1716/2011. 																	
Que aquest Comitè ha decidit emetre DICTAMEN FAVORABLE en la reunió celebrada el dia 27/10/2017 acceptant que l'esmentat estudi sigui realitzat a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol per la Dra. Gema Fernández Rivas del servei de Microbiologia com investigadora principal.																	
Que a l'esmentada reunió es van complir els requisits que estableix la legislació vigent perquè la decisió de l'esmentat CEI sigui vàlida.																	
Que el CEI de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol tant en la seva composició com en els seus procediments, compleix amb les normes de BPC (CPMP/ICH/135/95) i amb la legislació vigent que regula el seu funcionament, i que la composició del CEI és la indicada en l'annex I.																	
Que en el supòsit que algun membre del CEI sigui investigador principal o col·laborador de l'estudi avaluat, aquest s'absentarà de la reunió durant la deliberació i presa de decisió.																	
Signat a Badalona, a 27 d'octubre de 2017																	
 Dr. Magí Farré Albaladejo	 Comitè d'Ètica de la Investigació																
REF.CEI: PI-17-166 Pàgina 1 de 2																	



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació



Institut Català
de la Salut

ANNEX I: COMPOSICIÓ CEI HOSPITAL UNIVERSITARI GERMANS TRIAS I PUJOL

President

Farré Albaladejo, Magí. Farmacologia Clínica

Vicepresidenta

Balañá Quintero, Carme. Oncologia Mèdica (ICO)

Secretària

López Andrés, Anna. Farmacologia Clínica (IGTP)

Secretària Tècnica

Fortes Villegas, Àngels. (IGTP)

Vocals

Alonso Fernández, Sergio. Infermeria

Avecilla Palau, M^a Àngels. Ginecologia y Obstetrícia (BSA)

Bayés Genís, Beatriu. Direcció de Centre

Cabrera Jaime, Sandra. Infermeria

Casanovas Cuellar, Cristina. Infermeria

Dachary Jiménez, Natàlia. Jurista

Jiménez López, Irene. Unitat d'Atenció a la Ciutadania

López Sisamón, David. Farmàcia (ICO)

Montané Esteva, Eva. Farmacologia Clínica

Oriol Rocafiguera, Albert. Hematologia i Hemoteràpia (ICO)

Peláez de Loño, Jordi. Farmàcia (CATSALUT)

Puyalto Depablo, Paloma. Radiologia

Ramo Tello, Cristina. Neurologia

Romeu Fontanillas, Joan. Medicina Interna -VIH

Sánchez Fernández, M^a del Carmen. Biologia-Genètica (IJC)

Solà Suárez, Montserrat. Medicina Nuclear

Vilaró Jaques, Laia. Farmàcia



Germans Trias i Pujol
Hospital

Direcció Centre
C/la. Dr. Camet, s/n
08916 Badalona



Institut Català
de la Salut

CONFORMITAT DE LA DIRECCIÓ DEL CENTRE

La Dra. Beatriu Bayés Genís, Directora de centre de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, i vista l'autorització del Comitè d'Ètica de la Investigació.

CERTIFICA

Que coneix la proposta realitzada pel **Servei de Microbiologia (HUGTIP)**, per tal que sigui realitzat al nostre Centre l'estudi titulat:

"Diagnòstic de Dientamoeba fragilis. Paper etiopatogènic en simptomatologia gastrointestinal en pacients pediàtrics."

Codi de protocol: **DIENTA**, versió: 2,

í que serà realitzat per la **Dra. Gema Fernández Rivas** del Servei de Microbiologia com a investigadora principal.

Que està d'acord amb la seva viabilitat des del punt de vista econòmic.

Que accepta la realització d'aquest al Centre.

Signat a Badalona a 2 de novembre de 2017

Dra. Beatriu Bayés Genís

Ref. CEI: PI-17-166

9.2.2. Aprovació Comitè Ètica estudi *Helicobacter pylori*



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació



Institut Català
de la Salut

DICTAMEN DEL COMITÈ D'ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ

El Dr. Magí Farré Albaladejo, President del Comitè d'Ètica de la Investigació de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,

CERTIFICA

Que aquest Comitè ha avaluat la proposta de realització del projecte d'investigació:

CODI	Hppedia 18	REF.CEI	PI-18-220
TÍTOL	Infecció per l' <i>Helicobacter pylori</i> en població pediàtrica en l'àrea Barcelonès-Metropolitana Nord: incidència, característiques clíniques i estudi de resistències antibiòtiques. Versió: no consta		
PROMOTOR	Servei de Pediatria i Servei de Microbiologia (HUGTIP)		
Full Informatiu i Consentiment Informat del pare, mare o tutor legal per a menors de 12 anys (10/12/2018) + Full Informatiu i Consentiment Informat per a menors d'edat entre 16 i 18 anys (10/12/2018) + Full Informatiu i Consentiment Informat "assentiment >12 anys" (10/12/2018)			

i considera que:

- Es compleixen els requisits necessaris d'adequació del protocol en relació amb els objectius de l'estudi i que l'estudi compleix amb els aspectes que es recullen a la Llei d'Investigació Biomèdica 14/2007.
- El procediment per obtenir el consentiment informat, incloent el full d'informació per als subjectes i el pla de reclutament de subjectes previstos són adequats.
- El procediment previst per al maneig de dades personals és adequat.
- La capacitat de l'investigador i els seus col·laboradors, així com els mitjans disponibles són apropiats per realitzar el projecte.
- En cas d'obtenció i processament de mostres biològiques, aquesta s'adequarà al que preveu el Reial Decret 1716/2011.

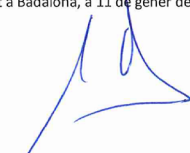
Que aquest Comitè ha decidit emetre DICTAMEN FAVORABLE en la reunió celebrada el dia 11/01/2019 acceptant que l'esmentat estudi sigui realitzat a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol per la **Dr. Montserrat Montraveta Querol** del servei de Pediatria com investigadora principal.

Que a l'esmentada reunió es van complir els requisits que estableix la legislació vigent perquè la decisió de l'esmentat CEI sigui vàlida.

Que el CEI de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol tant en la seva composició com en els seus procediments, compleix amb les normes de BPC (CHMP/ICH/135/95) i amb la legislació vigent que regula el seu funcionament, i que la **composició del CEI** és la indicada en l'**annex I**.

Que en el supòsit que algun membre del CEI sigui investigador principal o col·laborador de l'estudi avaluat, aquest s'absentarà de la reunió durant la deliberació i presa de decisió.

Signat a Badalona, a 11 de gener de 2019.


Dr. Magí Farré Albaladejo

Generalitat de Catalunya
Departament de Salut


Germans Trias i Pujol
Hospital
Institut Català de la Salut

Comitè d'Ètica de la Investigació



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació



Institut Català
de la Salut

ANNEX I: COMPOSICIÓ CEI HOSPITAL UNIVERSITARI GERMANS TRIAS I PUJOL

President

Farré Albaladejo, Magí. Farmacologia Clínica

Vicepresidenta

Balañá Quintero, Carme. Oncologia Mèdica (ICO)

Secretària Tècnica

Fortes Villegas, Àngels. (IGTP)

Vocals

Alonso Fernández, Sergio. Infermeria

Avecilla Palau, M^a Àngels. Ginecologia y Obstetrícia (BSA)

Bayés Genís, Beatriu. Direcció

Bret Garriga, Esteve. Representant del Pacient

Cabrera Jaime, Sandra. Infermeria

Casanovas Cuellar, Cristina. Infermeria

Dachary Jiménez, Natàlia. Jurista

Jiménez López, Irene. Unitat d'Atenció a la Ciutadania

López Andrés, Anna. Farmacologia Clínica (IGTP)

Montané Esteve, Eva. Farmacologia Clínica

Moreira Porta, Berna. Representant del Pacient

Oriol Rocafiguera, Albert. Hematologia i Hemoteràpia (ICO)

Peláez de Loño, Jordi. Farmàcia (CATSALUT)

Puyalto de Pablo, Paloma. Radiologia

Ramo Tello, Cristina. Neurologia

Romeu Fontanillas, Joan. Medicina Interna -VIH

Solà Suárez, Montserrat. Medicina Nuclear

Vilaró Jaques, Laia. Farmàcia

9.3.ANNEX 3

**9.3.1. Publicació article: Should *Dientamoeba fragilis* be looked for in pediatric digestive pathology of an unknown cause?
A proposed pilot case-control study**



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Should *Dientamoeba fragilis* be looked for in pediatric digestive pathology of an unknown cause? A proposed pilot case–control study



Montse Montraveta-Querol^{a,b,*}, Maria Victoria Bovo^a, Neus Roig-Abraham^a, Nona Romaní^c, Alba Alcaraz^a, Gema Fernández-Rivas^{c,d}

^a Paediatric Gastroenterology Unit, Department of Pediatrics, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^b Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology and Preventive Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Spain

^c Department of Microbiology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^d Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2021

Accepted 22 March 2022

Available online 1 June 2022

Keywords:

D. fragilis

Abdominal pain

Metronidazole

ABSTRACT

Introduction: *Dientamoeba (D.) fragilis* is a common intestinal protozoan with an unresolved clinical significance. The association between *D. fragilis* and the etiology of gastrointestinal symptoms in children is unclear. Metronidazole is often used for treatment. The aims of this study are to clarify the clinical relevance of *D. fragilis* in children with gastrointestinal symptoms, and to determine the clinical and microbiological efficacy of metronidazole in *D. fragilis*-infected children with gastrointestinal complaints.

Methods: A prospective case–control study was performed from October 2017 to February 2019. A total of 106 individuals aged 1–17 were included. Out of the 106; 59 showed gastrointestinal symptoms (case group), and 47 were without gastrointestinal symptoms (control group). We excluded 2 patients from the case group. *D. fragilis* was diagnosed by real-time PCR in stool samples. A 10-day course of oral Metronidazole was prescribed in *D. fragilis* positive children with GI symptoms. Clinical data before and after the treatment as well as peripheral eosinophilia in previous blood samples, were recorded.

Results: Of the 104 participants, *D. fragilis* was found in 17 (29.8%) children from the case group, whereas in the control group the parasite was detected in 11 patients (23.4%) with an odds ratio (OR) of 1.39 (IC95% 0.53–3.75, $p = 0.46$). The most prevalent clinical manifestation was abdominal pain (46/57, 80.7%). Seventeen cases with a positive PCR received anti-parasitic treatment according to the established protocol, although during the collection period we received only 11 stool samples to perform the post-treatment follow-up. The PCR of the *D. fragilis* remained positive in 3 patients (3/11, 27.27%). Despite achieving the eradication of the parasite, 4/8 patients (50%) continued with digestive symptoms.

Conclusions: According to our study there were no differences between the *D. fragilis* infection in children with or without gastrointestinal symptoms. No relation was found between the clinical and microbiological responses after said *D. fragilis* treatment. Therefore, we conclude that it is not justified to look specifically for *D. fragilis* in pediatric patients with abdominal symptoms.

© 2022 Sociedad Española de

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

¿Se debe investigar la infección por *Dientamoeba fragilis* en niños con enfermedad digestiva de causa desconocida? Estudio piloto caso-control

RESUMEN

Introducción: *Dientamoeba (D.) fragilis* es un protozoo intestinal muy común pero con una relevancia clínica incierta. El papel etiopatogénico de la *D. fragilis* en sintomatología gastro-intestinal no está claramente establecido. El metronidazol es con frecuencia el fármaco de elección. El objetivo de nuestro estudio fue determinar la relación entre *D. fragilis* y la presencia de clínica digestiva en población pediátrica así como valorar la eficacia del metronidazol en la resolución de los síntomas.

Palabras clave:

D. fragilis

Dolor abdominal

Metronidazol

* Corresponding author.

E-mail address: montse.montraveta@hotmail.com (M. Montraveta-Querol).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.03.007>

0213-005X/© 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Material y métodos: Estudio prospectivo caso-control realizado entre octubre 2017 y febrero 2019. Se incluyeron un total de 106 pacientes entre 1-17 años. 59 pacientes presentaban síntomas digestivos (grupo caso) y 47 pacientes asintomáticos (grupo control). Se excluyeron 2 pacientes del grupo caso. La presencia de *D. fragilis* se determinó por técnica de PCR real-time (PCR-RT) en muestra de heces. En los pacientes del grupo caso con PCR-RT positiva se realizó tratamiento con metronidazol durante 10 días. Se recogieron datos clínicos antes y después del tratamiento así como presencia de eosinofilia periférica.

Resultados: De los 104 participantes, se detectó *D. fragilis* en el 17/59 (29,8%) en el grupo caso y en 11/47 pacientes del grupo control (23,4%) con una odds ratio (OR) de 1.39 (IC95% 0.53-3.75, p=0.46). El síntoma más frecuente fue el dolor abdominal (46/57, 80,7%). Los 17 pacientes del grupo caso recibieron metronidazol según protocolo y se realizó PCR-TR *D. fragilis* post-tratamiento en 11/17 pacientes. La PCR-RT persistió positiva en 3 pacientes (3/11, 27,27%). De los 8 pacientes que negativizaron PCR-RT, 4 (50%) continuaron con dolor abdominal.

Conclusión: Según nuestro estudio no se encontró relación significativa entre la presencia de infección por *D. fragilis* y la existencia de sintomatología digestiva. Tampoco se observó mejoría clínica significativa en aquellos pacientes infectados que recibieron tratamiento.

© 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Introduction

Dientamoeba fragilis is a protozoan reported worldwide as a common microorganism present in the human gastrointestinal tract, with an estimated prevalence in Spain of around 17.7%,¹ which is equal or exceeds the incidence of giardiasis.² It remains controversial whether *D. fragilis* is a commensal parasite or a pathogen. Several studies were published to describe its role, mainly in the adult population,³ but so far, there are few pediatric studies designed with a specific control group.⁴

The complete life cycle of *D. fragilis* has not yet been elucidated. It is suggested that the cyst stage is the vehicle that mediates fecal-oral transmission of *D. fragilis* between hosts.^{5,6} Although it is unknown how trophozoites can remain outside the body, some authors postulate that they can survive within the eggs of helminths such as *Enterobius vermicularis*, but, on the other hand, other studies have not shown the correlation between infections caused by *D. fragilis* and *E. vermicularis*.⁷ The classic method to diagnose the parasite is by optic microscopy (permanent stains or a microscopic wet mount examination), but this can be hard to identify due to its morphological similarity to other protozoa. Additionally, the method requires rapid fixation of the stool samples, and even specific stains such as trichrome or another permanent stains which are not routinely used in clinical microbiology laboratories. In any case, highly trained technologist is also required for a correct diagnosis of *D. fragilis* infection. Another difficulty is the phasic secretion of the parasite and the intermittent elimination of *D. fragilis* on different days, as in other intestinal parasites, with the risk that in the absence of *D. fragilis*, a single stool sample conducted a false negative result. To avoid this problem, it is recommended to send 3 samples taken on different days to investigate its presence.⁸ Introduction of the Polymerase Chain Reaction (PCR) as a diagnostic technique, with a higher sensitivity than a microscopic examination,⁹⁻¹² makes the diagnosis easier and it has made its prevalence increase in recent years. Another advantage of the PCR is the possibility of using a single sample instead of three.⁸

Although its real prevalence is not known, the published data presents a high variability with figures ranging between 1% and 70% according to the studies (accurately in developed countries the incidence has been described between 1 and 20%).^{1,8} The highest incidence rates have been described in patients under 15 years old and in adults with close contact with infected children. The variation in prevalence may be due to the different study designs and specially, the type of diagnostic technique applied. The use of molecular biology techniques would probably increase the prevalence.^{8,10,13,14} Results based on PCR analysis should be

regarded with caution because of the variability from different platforms and the potential for low specificity. These data could be false positive results so there is a need for a standardization of detection assays across all nations screening for *D. fragilis*.²⁰

The most frequent symptoms described in individuals with *D. fragilis* are abdominal pain (frequently lasting longer than two weeks) and diarrhea. Less frequently reported symptoms included weight loss, anorexia, flatulence, vomiting and anal itching.¹⁵

In the last few years an increasing interest toward *D. fragilis* has emerged. More studies have been published^{4,13,14} in which symptoms were correlated with the presence of the parasite in the gastrointestinal tract (the colon). But on the other hand, other recent studies question the role of this parasite^{13,16,17} because many individuals with *D. fragilis* were asymptomatic carriers.¹⁵

There is no consensus in clinical guidelines about eradication treatment of *D. fragilis*. Although there are several treatments options, oral metronidazole in monotherapy seems to be the one with the lowest minimal lethal concentration in the moment of treatment.⁸ Another treatment options are paromomycin, an intraluminal antiparasitic and clioquinol.¹⁵ The aim of this study was to assess the prevalence and, to understand the role of *D. fragilis* in children with gastrointestinal symptoms excluding other causes (infectious or otherwise like celiac disease) in our settings. We designed a pilot case control study to compare the presence of the parasite in children who did and didn't refer gastrointestinal symptoms.

Materials and methods

Patient population

This is a prospective case-control study performed at the Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona (HGTIP), Spain, between October 2017 and February 2019. The chosen case group comprises of individuals aged between 1 and 17 that attended the hospital or the associated primary care centers from when they have had any kind of gastrointestinal (GI) disorder (abdominal pain, diarrhea, meteorism, nausea, weight loss, abdominal bloating and/or hyporexia) when other organic/infectious causes have been excluded. The existence of a previously diagnosed digestive pathology or a systemic disease, with a possible involvement of the gastrointestinal tract, is considered as an exclusion criterion. The control group was formed by healthy children aged between 1 and 17 years old recruited at the HGTIP or the associated primary care centers for any other reason apart from a GI disorder.

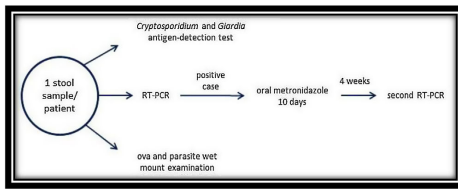


Fig. 1. Parasitological study workflow.

Microbiological analysis

We collected one fresh stool sample for each participant (57 samples of the case group and 47 samples of the control group). Subsequently for the Ova and Parasite (O&P) wet mount examination, samples were fixed in a formalin-free 60 fixative, AlcorFix®, and Mini Parasep® SF (solvent free) collection tube (Parasep®; Aparcor; Berkshire, England, UK) for every individual from both the case and the control groups that were treated as routine samples according to the protocol in our settings. Stool cultures for enteropathogens were performed using standard microbiological techniques to exclude the following infections: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Arcobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Plesiomonas* spp. and *Aeromonas* spp. Virology testing was performed by an Immunochromatographic screening test (Adeno/Rota STAT-PAK; Chembio Diagnostic Systems Inc., Sydney) for detection of Adenovirus serotypes 40–41 and Rotavirus antigens in stool samples, according to the manufacturer's recommendations.

This parasitological study (Fig. 1) consisted in a *Cryptosporidium* spp. and *Giardia lamblia* antigen-detection test (RIDA® QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi, Darmstadt, Germany) followed by an O&P wet mount examination. For the antigen detection test, notified stool sample was used but for the O&P examination, we used fixed samples. Furthermore, we studied the presence of *D. fragilis* in all the samples by RT-PCR (VIASURE *Dientamoeba fragilis* Real Time PCR Detection Kit, Zaragoza, Spain) following the manufacturer's instructions. DNA extraction was performed by using the Maxwell® 16 Tissue DNA Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) with the fixed samples used in the O&P wet mount examination. Among the case group, individuals with a positive result for *D. fragilis* (PCR and/or wet mount microscopy) were treated with oral metronidazole (15/mg/kg/day) for 10 days. A second PCR was performed 4 weeks after the end of the treatment to verify the eradication of the parasite in stools, and the evolution of the symptoms was also recorded (Fig. 1).

Data collection

Clinical data was obtained from medical records in the pediatric facilities. We collected the following data on abdominal pain, diarrhea, meteorism, nausea, loss of weight, hyporexia and eosinophilia. Eosinophilia was defined as $\geq 0.5 \times 10^9/L$ in peripheral blood. Once a patient received anti-parasitic treatment according to the protocol, information about the new clinical status was also compiled. For all individuals, epidemiological data such as age and gender was registered.

Statistical analysis

Data was recorded and a univariate non-stratified analysis for the pre-treatment and post-treatment groups was performed to study the Odds Ratio (OR) among the variables, as well as the result

of the PCR. Additionally, a univariate and multivariate analysis to assess risk and confusion factors was performed by using the Stata 14 (StataCorp LP, TX, USA) statistical package.

Ethical approval

This study was approved by the Ethics committee of our hospital (PI-17-166). Parents of the children were informed about the study and written consents were obtained, and when appropriate, consent from the child was also retrieved.

Results

During the period of study, a total of 106 individuals were enrolled. Out of them, 59 children were included in the case group but 2 were excluded because they were diagnosed with *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. infections. Ultimately 57 children met the inclusion criteria for the case group. The control group was composed of 47 participants. There were no significant differences between gender and age in both groups. The average age of the cases was 7.45 years old and 6.23 for the control group. Out of the 57 participants of the case group 27 were females and 30 were males (47.36% and 52.64% respectively).

Among children with symptomatology, *D. fragilis* was found in 17 patients (29.8%), whereas in the control group the parasite was detected in 11 patients (23.4%). The effect of the parasite on the clinical features is positive with an odds ratio (OR) of 1.39. Despite this positive association, there is still a lack of statistical significance (IC 95% 0.53–3.75, $p=0.46$). Light microscopy did not allow detecting the presence of *D. fragilis* in any of the cases.

The most prevalent clinical manifestation was abdominal pain (in 46 cases, 80.7%), followed by diarrhea (28, 49.1%), meteorism (15, 26.3%), abdominal distension (12, 21.1%), hyporexia (5, 8.8%) and weight loss (2, 3.5%). None of these symptoms were significantly associated with the exposure to the parasite. Nevertheless, the p value for meteorism is slightly greater than the significance ($p=0.0967$). The p values can be seen in Table 1.

Seventeen cases with a positive PCR received anti-parasitic treatment according to the established protocol: although during the collection period we only received 11 stool samples to perform the post-treatment PCR. The Univariate non-stratified analysis in post-treatment cases of the clinical symptoms shows five patients (5/11) who continued with gastrointestinal symptoms (4 had abdominal pain and one had meteorism), but only in one did the PCR of *D. fragilis* remain positive (1/11). Two other samples (2/11) were positive for the parasite, but those children no longer had gastrointestinal complaints.

Eosinophilia in peripheral blood was also recorded but only 9 patients met these criteria, so we excluded it in the final analysis. Despite this fact, the persistence of eosinophilia in the post-treatment group does appear to be significantly associated with the persistence of a positive PCR ($p=0.02$). But there are very few cases ($n=6$), so this data must be carefully considered.

The persistence of meteorism does appear to be almost significantly associated with the persistence of a positive PCR in the post-treatment group ($p=0.09$), but there are also very few registered cases.

Discussion

Several authors have tried to determine the role of *D. fragilis* as an etiology of a gastrointestinal disorder, but it seems that this question has been left unanswered. Some authors suggest that it is a real pathogen. Nevertheless, several publications consider this

Table 1
Data obtained in the case group.

Symptoms N = 57	PCR+	PCR–	IC (95%)	
Abdominal pain n = 46 (80%)	15	31	.37–22.9	(OR 2.17)
Diarrhea n = 28 (49%)	6	22	.11–1.65	(OR .44)
Meteorism N = 15 (31%)	7	8	.66–11.38	(OR 2.8)
Abdominal distension N = 12 (21%)	4	8	.22–5.62	(OR 1.2)
Anorexia N = 5 (8%)	1	4	.01–6.3	(OR .56)
Weight loss N = 2 (3.5%)	0	2	0–4.6	(OR 0)

parasite to be a commensal protozoan since it has been recovered from both symptomatic and asymptomatic individuals.¹⁸

This fact also explains the epidemiological variations in the incidence of the *D. fragilis* infection. The wide range of prevalence levels of Dientamoebiasis established by different authors can be explained by the lack of standardization of a *D. fragilis* diagnosis.¹⁹ Direct comparisons between regions can be misleading due to different study designs: fixed or direct sample, diagnosis using molecular techniques or light microscopy, or the type of PCR, smear, and study population, or the number of samples sent to the laboratory, etc. Furthermore, this information is sometimes not detailed, so results cannot be accurately interpreted, and experiments cannot be replicated.²⁰ It seems that children are one of the groups with the highest prevalence of Dientamoebiasis, and for this reason we decided to focus on this demographic. In our study, *D. fragilis* was found more often amongst children with symptomatology than in the control group. Despite this tendency, results are not statistically significant. Several authors defend the commensal nature of *D. fragilis*, through different approaches. Detection of the *D. fragilis* was higher among healthy children and was not associated with an increase in fecal calprotectin concentration, compared with children with chronic abdominal pain and diarrhea in whom other somatic gastrointestinal disorders were excluded.¹⁷ Moreover, in other European countries the estimated prevalence was around 68.3% in children attending day care centers, and no statistical association between a history of infant colic or recent –gastrointestinal symptoms and testing positive for *D. fragilis*, was observed.^{13,21}

On the other hand, we can also find authors who support the pathogen role of *D. fragilis*. Wit et al. found that *D. fragilis* infections were more common in control patients (15–75 years old) than in case patients, except for the 0–14-year age group, where the percentage of positive cases was higher in the case group.²² Similarly, Girginkardeşler et al. described in their group of cases, 35 patients (8.8%) aged between 3 and 60 years old that were positive for *D. fragilis*. Of all the cases, the infection rates were found to be significantly higher in the 8–15-year age group (14.8%).²³ This could correlate with our data, but despite this fact, the low number of patients included is a limitation.

In our cohort, abdominal pain (80.7%) and diarrhea (49.1%) are the most frequent symptoms, and this is also in accordance with other authors research.^{13,23,24} These two symptoms were found to be significantly more frequent in patients with only Dientamoebiasis, when the cases were compared. But our results show a positive effect of the parasite, with no statistical significance, especially for meteorism. We think that this result should be interpreted carefully due to the low number of cases involved.

Regarding an antiparasitic treatment, the case group patient received metronidazole when *D. fragilis* was detected. Only 17 patients were checked up upon after the first PCR, and only 11

samples were sent to the laboratory to perform a second PCR. Despite the treatment, 45% of the patients continued to have gastrointestinal symptoms and the PCR remained positive in one of them. Two other samples were positive for the parasite, but children no longer had gastrointestinal complaints. One explanation may be because the PCR detected the parasite due to its high sensitivity, but it was not viable anymore. Another explanation may be a failure of the treatment. There is evidence of the wide use of metronidazole to treat dientamoebiasis, although treatment failures are also reported, and more frequently so than with other antiparasitic agents such as secnidazol.^{14,23,25,26} Paromomycin or clioquinol are antibiotics of choice based on their small spectrum of activity, fewer side effects and better eradication rates than metronidazole.¹⁵ Metronidazole is widely used as an antiparasitic treatment despite some authors suggesting that its resistance and failures to comply with the whole treatment are reasons for which some patient cases who are on dientamoebiasis do not respond to the metronidazole treatment.²⁰ Our choice of treatment with metronidazole was due to its high availability and its frequent use for other protozoan infections. Further studies with more participants should be performed and other treatments will be evaluated in case the role of *D. fragilis* is finally established. Eosinophilia in peripheral blood was also one of the parameters that was associated with a *D. fragilis* infection,²⁷ but our results show that there are not statistically significant outcomes when comparing case and control groups. Little data was collected so we finally excluded it from the analysis. Curiously, it was one of the clinical data that showed a positive association ($p=0.02$) with the persistence of a positive PCR. This is a very preliminary conclusion, but it could be considered as a marker for a positive outcome for any antiparasitic treatment.

Other clinical data that has shown a positive association, is meteorism, but no sufficient evidence of this was observed. These kinds of symptoms must be carefully analyzed because some of the side effects of metronidazole are gastrointestinal symptoms, so a confusion factor must be excluded before considering it as reliable data with a sound evolution.

We detected several limitations in our study. First of which being the number of patients enrolled is low so the statistical results must be regarded carefully. Secondly, we have the loss in the follow-up of the patients in the case group. Only 17 patients were enrolled in the second part of the study but in only 11 cases could we obtain a stool sample to confirm the eradication of the *D. fragilis* by the PCR and O&P examination. Even then, the PCR is not the best tool to assess the eradication due to the high sensitivity of the molecular techniques. And finally, there is the chosen treatment. Other authors have already observed that metronidazole provides no clinical benefit for children with chronic GI complaints who have *D. fragilis* in their stools, and the microbiological effect of metronidazole is only moderate and transient.²⁶

More studies with more extensive samples are needed in order to confirm our results. In addition, further studies should be performed to investigate household transmission of the *D. fragilis*. As *E. vermicularis* has been postulated to have a role in the transmission of the parasite, studies of the presence of the pinworm in *D. fragilis* infected patients and studies assessing the treatment of both parasites, are also needed.

Conclusion

To our knowledge this is the first prospective case–control study focused on a pediatric demographic, with the control group consisting of asymptomatic children. Since healthy children and children with a GI symptomatology present similar frequency of the *D. fragilis* infection, we consider that *D. fragilis* could be considered as a commensal parasite of the gastrointestinal tract. When a treatment is proposed our results show that we do recommend avoiding metronidazole because of its high rates of therapeutic failures and the lack of improvement in gastrointestinal symptoms. We conclude that it is not justified to look specifically for *D. fragilis* in pediatric patients with abdominal symptoms. Further cohort studies with bigger sample, double-blind, randomized and placebo-controlled trials are necessary.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Menéndez C, Fernández-Suarez J, Boga Ribeiro JA, Rodríguez-Pérez M, Vázquez F, Gonzalez-Sotorrios N, et al. Epidemiological and clinical characteristics of *Dientamoeba fragilis* infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37:290–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2018.07.008>.
- García LS. *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal protozoa. *J Clin Microbiol*. 2016;54:2243–50, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00400-16>.
- Miguel L, Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Molina-Morant D, López I, et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients with *Dientamoeba fragilis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99:1170–3, <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.18-0433>.
- De Jong MJ, Korterink JJ, Benninga MA, et al. *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Arch Dis Child*. 2014, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2014-305942>.
- Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, Windsor PA, Stark D. Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* – the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol*. 2013;43:879–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.003>.
- Stark D, García LS, Barratt JLN, Phillips O, Roberts T, Marriot D, et al. Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2680–3, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00813-14>.
- Ögren J, Dienus O, Löfgren S, Iveroth P, Matussek A. *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. *Pathog Dis*. 2013. Nov;69:157–8, <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632X.12071>. Published online 2013 Aug 12.
- Van Gestel RSFE, Kusters JG, Monkelbaan JF. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology*. 2018;1–9, <http://dx.doi.org/10.1017/S003182018001385>.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriot D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:411–6, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-0876-4>.
- Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T, Marriot D, et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49:257–62, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01796-10>.
- Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67:239–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.016>.
- Stensvold CR, Nielsen HV. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J Clin Microbiol*. 2012;50:540–1, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06012-11>.
- Jokelainen P, Hebbelstrup Jensen B, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Krogfelt KA, et al. *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish Day Care Centre. *J Clin Microbiol*. 2017, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00037-17>.
- Banik G, Barratt J, Marriot D, Harkness J, Ellis J, Stark D. A case-controlled study of *Dientamoeba fragilis* infection in children. *Parasitology*. 2011, <http://dx.doi.org/10.1017/S003182011000448>.
- Van Kalleveen MW, van Gool T, Klarenbeek N, Benninga MA, Savelkoul PHM, de Meij T, et al. *Dientamoeba fragilis* in children: a systematic review on diagnostic considerations and efficacy of treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;14:231–42, <http://dx.doi.org/10.1080/17474124.2020.1739520>.
- Wong Z, Faulder K, Robinson JL. Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. *Parasitol Res*. 2018 Apr;117:971–80, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-5771-4>.
- Brands MR, Van de Vijver E, Haitsma SM, Heida A, van Rheenen PF. No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Arch Dis Child*. 2019;104:686–9, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2018-316383>.
- Röser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Mølbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:1303–10, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2>.
- Van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22:284–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-003-0919-1>.
- Gough R, Ellis J, Stark D. Comparison and recommendations for use of *Dientamoeba fragilis* real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2019;57:e01466–1518, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01466-18>. Published 2019 Apr 26.
- Jokelainen P, Hebbelstrup Jensen B, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Krogfelt KA, et al. *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish day care centers. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1707–13, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00037-17>.
- de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Vinjé J, van Duynhoven YT. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Clin Infect Dis*. 2001;33:280–8, <http://dx.doi.org/10.1086/321875>.
- Girginardesler N, Coşkun S, Cüneyt Balcıoğlu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:110–3, <http://dx.doi.org/10.1086/321875>.
- Pietilä JP, Meri T, Siikamäki H, Tyyni E, Kerttula AM, Pakarinen L, et al. *Dientamoeba fragilis* – the most common intestinal protozoan in the Helsinki Metropolitan Area Finland, 2007–2017. *Euro Surveill*. 2019;24:1800546, <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.29.2019241800546>.
- Norberg A, Nord CE, Evengård B. *Dientamoeba fragilis* – a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:65–8, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00459.x>.
- Röser D, Simonsen J, Stensvold CR, Olsen KE, Bytzer P, Nielsen HV, et al. Metronidazole therapy for treating *dientamoebiasis* in children is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2014;58:1692–9, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu188>.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriot D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:614–9, <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0478>.

BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

1. Shampo MA, Kyle RA. Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic. 2002;77 (7):606.
2. Mellado O. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. NPunto. Vol III. Número 30. Septiembre. 2020.
3. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis Genes (Basel). 2022 Dec 16;13 (12):2387
4. Sander F, Goulson AR. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. J Mol Biol. 1975 May 25;94 (3):441-8
5. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-generation sequencing technologies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019 Nov 1;9 (11).
6. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran T Bin, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. J Infect Public Health. 2021 Dec;14 (12):1750-1766.
7. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. Infect Dis Clin North Am. 2016 Jun;30 (2):313-322
8. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]. 2015. Available from: www.paprika-annecy.com

9. Govindaraj Vaithinathan A, Vanitha A. WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: an urgent need for action to integrate One Health data. *Perspect Public Health*. 2018 Mar;138 (2):87-8.
10. Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53 (12):3723-8
11. Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul 1;29 (3):553-80.
12. Menéndez C, Fernández-Suarez J, Boga Ribeiro JA, Rodríguez-Pérez M, Vázquez F, Gonzalez-Sotorrios N, et al. Epidemiological and clinical characteristics of *Dientamoeba fragilis* infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019 37 (5)p 290-295
13. Garcia LS. *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal protozoa. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep 1;54 (9):2243-50.
14. Clemente L, Pasut M, Carlet R, Ruscio M, Fontana F. *Dientamoeba fragilis* in the North-East of Italy: Prevalence study and treatment. *Parasitol Int*. 2021 Feb 1;80:102227.
15. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T, Marriott D, et al. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp. , *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49 (1):257-62.
16. Jokelainen P, Jensen BH, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Krogfelt KA, et al. *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish day care centers. *J Clin Microbiol*. 2017 Jun 1;55 (6):1707-13.
17. Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Jul 1;67 (3):239-45.

18. Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*. 2011 Jan-Feb;2 (1):3-12.
19. Norberg A, Nord CE, Evengård B. *Dientamoeba fragilis* - A protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Jan;9 (1):65-8.
20. Clark CG, Röser D, Stensvold CR. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Pinworm or cysts? *Trends Parasitol*. 2014 Mar;30 (3):136-40
21. Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Apr;82 (4):614-9.
22. Ögren J, Dienus O, Löfgren S, Iveroth P, Matussek A. *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. *Pathog Dis*. 2013;69 (2):157-8.
23. Girginkardeşler N, Kurt Ö, Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitol Int*. 2008 Mar 1;57 (1):72-5.
24. Röser D, Nejsum P, Carlsbart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Exp Parasitol*. 2013 Jan 1;133 (1):57-61.
25. Stark D, Garcia LS, Barratt JLN, Phillips O, Roberts T, Marriott D, et al. Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *J Clin Microbiol*. 2014;52 (7):2680-3.
26. Munasinghe VS, Vella NGF, Ellis JT, Windsor PA, Stark D. Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol*. 2013 Oct 1;43 (11):879-83.

27. Stark D, Barratt J, Ellis J, Harkness J, Marriott D. Repeated *Dientamoeba fragilis* infections: a case report of two families from Sydney, Australia. *Infect Dis Rep*. 2009 Sep 14;1 (1).
28. Stark D, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Detection and transmission of *Dientamoeba fragilis* from environmental and household samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Feb;86 (2):233-6.
29. Chan D, Barratt J, Roberts T, Phillips O, Šlapeta J, Ryan U, et al. Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Vet Parasitol*. 2016 Aug 30;227:42-7.
30. Kauppinen A, Pitkänen T, Al-Hello H, Maunula L, Hokajärvi AM, Rimhanen-Finne R, et al. Two drinking water outbreaks caused by wastewater intrusion including sapovirus in Finland. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Nov 2;16 (22).
31. Ter Schure JMA, De Vries M, Weel JFL, Van Roon EN, Faber TE. Symptoms and treatment of *dientamoeba fragilis* infection in children, a retrospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2013 Apr;32 (4).
32. Miguel L, Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Molina-Morant D, López I, et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients with *dientamoeba fragilis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2018;99 (5):1170-3.
33. Jong MJ de, Korterink JJ, Benninga MA, Hilbink M, Widdershoven J, Deckers-Kocken JM. *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Arch Dis Child*. 2014 Dec;99 (12):1109-13
34. Brands MR, Van De Vijver E, Haisma SM, Heida A, Van Rheenen PF. No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Arch Dis Child*. 2019 Jul 1;104 (7):686-9.
35. Röser D, Simonsen J, Stensvold CRune, Olsen KEP, Bytzer P, Nielsen H v. , et al. Metronidazole therapy for treating *dientamoebiasis*

- in children is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2014 Jun 1;58 (12):1692-9.
36. van Kalleveen MW, van Gool T, Klarenbeek N, Benninga MA, Savelkoul PHM, de Meij T, et al. *Dientamoeba fragilis* in children: a systematic review on diagnostic considerations and efficacy of treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2020. Vol. 14 p. 231-42.
 37. Aykur M, Armagan G, Vardar R, Dagci H. Fecal calprotectin as a factor that supports the pathogenicity of *Dientamoeba fragilis*. *Microb Pathog*. 2020 Feb 1;139.
 38. Chan FTH, Xu Guan M, Mackenzie AMR. Application of Indirect Immunofluorescence to Detection of *Dientamoeba fragilis* Trophozoites in Fecal Specimens. *J Clin Microbiol* 1993 Vol. 31 p1710-1714
 39. Öncel K. Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 2018 Dec 1;42 (4):268-76.
 40. Amin OM. Evaluation of a new system for the fixation, concentration, and staining of intestinal parasites in fecal specimens, with critical observations on the trichrome stain. *J Microbiol Methods*. 2000 Jan 1;39 (2):127-32.
 41. Hamidi N, Meamar AR, Akhlaghi L, Rampisheh Z, Razmjou E. *Dientamoeba fragilis* diagnosis by fecal screening: Relative effectiveness of traditional techniques and molecular methods. *J Infect Dev Ctries*. 2018 Jan 1;12 (1):52-9.
 42. Van Gestel RSFE, Kusters JG, Monkelbaan JF. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology*. 2019. Vol. 146 p. 1131-9.
 43. van Gool T, Weijts R, Lammerse E, Mank TG. Triple faeces test: An effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003 May 1;22

- (5):284-90.
44. Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 Apr;29 (4):411-6.
 45. Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SKA, Whiteside TM. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br J Biomed Sci*. 2003;60 (2):79-83.
 46. Munasinghe VS, Stark D, Ellis JT. New advances in the in-vitro culture of *Dientamoeba fragilis*. *Parasitology*. 2012 Jun;139 (7):864-9.
 47. Gough R, Ellis J, Stark D. Comparison and Recommendations for Use of *Dientamoeba fragilis* Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol*. 2019 Apr 26;57 (5):e01466-18.
 48. Van Hellemond JJ, Molhoek N, Koelewijn R, Wismans PJ, van Genderen PJJ. Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Dientamoeba fragilis* in adults? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012 Dec;2:162-5.
 49. Van Gestel RSFE, Kusters JG, Monkelbaan JF. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. , *Parasitology*. ; 2019. Vol. 146. p. 1131-9.
 50. Burgaña A, Abellana R, Yordanov SZ, Kazan R, Pérez Ortiz AM, Ramos CC, et al. Paromomycin is superior to metronidazole in *Dientamoeba fragilis* treatment. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019 Dec 1;11:95-100.
 51. Santos MLC, De Brito BB, Da Silva FAF, Sampaio MM, Marques HS, Oliveira E Silva N, et al. *Helicobacter pylori* infection: Beyond gastric manifestations. *World J Gastroenterol*. 2020. Vol. 26 p. 4076-93.
 52. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei

- R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. , *Aliment Pharmacol Ther.* 2018. Vol. 47 p. 868-76.
53. Sjomina O, Pavlova J, Niv Y, Leja M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Vol. 23, *Helicobacter.* 2018. Vol 23 e12514
 54. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017 Aug 1;153 (2):420-9.
 55. Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou JM, Peek R, Schulz C, Smith SI, Suerbaum S. *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2023 Apr 20;9 (1):19
 56. Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig Liver Dis.* 2017. Vol 49 p. 742-9.
 57. Bastos J, Peleteiro B, Pinto H, Marinho A, Guimarães JT, Ramos E, et al. Prevalence, incidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Portuguese adolescents. *Dig Liver Dis.* 2013 Apr;45 (4):290-5.
 58. Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factors of *helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the 13 C-Urea breath test. *BMC Public Health.* 2013 Dec 21;13:1215
 59. Suzuki T, Matsuo K, Ito H, Sawaki A, Hirose K, Wakai K, et al. Smoking increases the treatment failure for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Med.* 2006. Vol. 119 p. 217-24.
 60. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Intern Immunopharmacol* 2001. Vol. 1. p 983-93
 61. Genta RM, Turner KO, Sonnenberg A. Demographic and

- socioeconomic influences on *Helicobacter pylori* gastritis and its pre-neoplastic lesions amongst US residents. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Aug 1;46 (3):322-30.
62. Wen X, Wen D, Yang Y, Chen Y, Wang G, Shan B. Urban-Rural Disparity in *Helicobacter Pylori* Infection-Related Upper Gastrointestinal Cancer in China and the Decreasing Trend in Parallel with Socioeconomic Development and Urbanization in an Endemic Area. *Ann Glob Health.* 2017 May 1;83 (3-4):444-62.
63. Venneman K, Huybrechts I, Gunter MJ, Vandendaele L, Herrero R, van Herck K. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Europe and the impact of lifestyle on its natural evolution toward stomach cancer after infection: A systematic review. , *Helicobacter.* 2018. Vol 23 e 12483.
64. Cheng XJ, Lin JC, Tu SP. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. *Gastrointest Tumors.* 2016;3 (1):25-36.
65. Quaglia NC, Dambrosio A. *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World J Gastroenterol.* 2018. Vol 24. p. 3472-87.
66. Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shokri-Shirvani J. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. *Caspian J Intern Med.* 2017 Summer;8 (3):146-152
67. Mladenova I, Durazzo M. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2018. Vol. 64p. 251-4.
68. Öztekin M, Yılmaz B, Ağagündüz D, Capasso R. Overview of *Helicobacter pylori* Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects. *Diseases.* 2021 Sep 23;9 (4):66.
69. Payão SLM. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2016;7 (1):126.
70. Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter* 2017. Vol. 22. 10. 1111
71. Cervantes-García E. *Helicobacter pylori*: mecanismos de

- patogenicidad, *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2016. Vol. 63
72. Martínez LE, Hardcastle JM, Wang J, Pincus Z, Tsang J, Hoover TR, et al. *Helicobacter pylori* strains vary cell shape and flagellum number to maintain robust motility in viscous environments. *Mol Microbiol*. 2016 Jan 1;99 (1):88-110.
 73. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis. *Toxins*. 2017. Vol. 9. P101
 74. Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2017 Sep;22 Suppl 1.
 75. Cao P, Kerry JL, Blaser MJ, Cover TL. Analysis of hopQ alleles in East Asian and Western strains of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Oct 1;251 (1):37-43.
 76. De Brito BB, Da Silva FAF, Soares AS, Pereira VA, Cordeiro Santos ML, Sampaio MM, et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2019. Vol. 25 p. 5578-89.
 77. Stasiewicz M, Karpiński TM. The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2022 Nov 1;86:633-42.
 78. Fakharian F, Asgari B, Nabavi-Rad A, Sadeghi A, Soleimani N, Yadegar A, et al. The interplay between *Helicobacter pylori* and the gut microbiota: An emerging driver influencing the immune system homeostasis and gastric carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022. Vol. 12. 12:953718
 79. Yang L, Zhang J, Xu J, Wei X, Yang J, Liu Y, et al. *Helicobacter pylori* Infection Aggravates Dysbiosis of Gut Microbiome in Children With Gastritis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Nov 7;9.
 80. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, MacHado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2018 Feb 1;67 (2):226-36.
 81. Llorca L, Pérez-Pérez G, Urruzuno P, Martínez MJ, Izumi T, Gao

- Z, et al. Characterization of the gastric microbiota in a pediatric population according to *Helicobacter pylori* status. . *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Feb;36 (2) p. 173-8.
82. Brawner KM, Kumar R, Serrano CA, Ptacek T, Lefkowitz E, Morrow CD, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with an altered gastric microbiota in children. *Mucosal Immunol*. 2017 Sep 1;10 (5):1169-77.
83. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007 Apr;21 (2):237-59.
84. Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence. *Cancer Science*. 2005. Vol. 96. p. 1-6.
85. Ge S, Feng X, Shen L, Wei Z, Zhu Q, Sun J. Association between habitual dietary salt intake and risk of gastric cancer: A systematic review of observational studies. *Gastroenterol Res Pract*. 2012; 808120
86. Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence. *Cancer Science*. 2005. Vol. 96. p. 1-6.
87. Grabowska M, Wawrzyniak D, Rolle K, Chomczyński P, Oziewicz S, Jurga S, et al. Let food be your medicine: Nutraceutical properties of lycopene. *Food Funct*. 2019 Jun 19;10 (6):3090-3102.
88. Judaki A, Rahmani A, Feizi J, Asadollahi K, Hafezi Ahmadi MR. Cúrcuma em combinação com os regimes de terapia tríplice melhora o estresse oxidativo e as alterações histopatológicas em gastrite crônica associada à infecção por *helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol*. 2017 Jul 1;54 (3):177-82.
89. Zardast M, Namakin K, Kaho JE, Hashemi SS. Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test. *Avicenna J Phytomed*. 2016 Sep-Oct;6 (5):495-501.

90. Violeta Filip P, Cuciureanu D, Sorina Diaconu L, Maria Vladareanu A, Silvia Pop C. MALT lymphoma: epidemiology, clinical diagnosis and treatment. *J Med Life*. 2018. Vol. 11. p. 187-93.
91. Kato S, Osaki T, Kamiya S, Zhang XS, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* sabA gene is associated with iron deficiency anemia in childhood and adolescence. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12 (8).
92. Ahmed AZE, Radwan AM, Rizk HL. The role of *Helicobacter pylori* infection in idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 2021; 82 (2): 193-198.
93. Ikuse T, Toda M, Kashiwagi K, Maruyama K, Nagata M, Tokushima K, et al. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication therapy on platelet recovery in pediatric immune thrombocytopenic purpura-case series and a systematic review. *Microorganisms*. 2020;8 (10).
94. Ihtesham A, Maqbool S, Nadeem M, Janjua MBA, Sundus O, Naqqash AB, et al. *Helicobacter pylori* induced immune thrombocytopenic purpura and perspective role of *Helicobacter pylori* eradication therapy for treating immune thrombocytopenic purpura. *AIMS Microbiology*. 2021. Vol 7. p. 284-303.
95. Marshall BJ, Armstrong JA, Mcgechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. *Med J Aust*. 1985 Apr 15;142 (8):436-9.
96. Serin E, Gumurdulu Y, Kayaselcuk F, Ozer B, Yilmaz U, Boyacioglu S. Halitosis in patients with *Helicobacter pylori*-positive non-ulcer dyspepsia: an indication for eradication therapy? *Eur J Intern Med*. 2003 Feb;14 (1):45-48.
97. Anbari F, Ashouri Moghaddam A, Sabeti E, Khodabakhshi A. Halitosis: *Helicobacter pylori* or oral factors. *Helicobacter*. 2019 Feb 1;24 (1).

98. Jones NL, Koletzko S, Goodman K, Bontems P, Cadranel S, Casswall T, et al. Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* in Children and Adolescents (Update 2016). *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Jun;64 (6):991-1003
99. Buhigas-García I, Herrero-Alonso MC, Barrio-Merino A. Desde el laboratorio a la clínica: Test de urea marcada con carbono 13. *Anales de Pediatría Continuada.* 2008 Jun;6 (3):155-8.
100. Sabbagh P, Javanian M, Koppolu V, Vasigala VKR, Ebrahimpour S. *Helicobacter pylori* infection in children: an overview of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Jun;38 (6):1035-1045
101. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SSW, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 28;21 (40):11221-35.
102. Zhou X, Su J, Xu G, Zhang G. Accuracy of stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014 Oct 1;38 (5):629-38.
103. Koletzko S, Konstantopoulos N, Bosman D, Feydt-Schmidt A, van der Ende A, Kalach N, et al. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. *Gut.* 2003 Jun;52 (6):804-6.
104. Wu DC, Wu IC, Wang SW, Lu CY, Ke HL, Yuan SSF, et al. Comparison of stool enzyme immunoassay and immunochromatographic method for detecting *Helicobacter pylori* antigens before and after eradication. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Dec 1;56 (4):373-8.
105. Resina E, Donday MG, Martínez-Domínguez SJ, Laserna-Mendieta EJ, Lanás Á, Lucendo AJ, et al. Evaluation of a New Monoclonal Chemiluminescent Immunoassay Stool Antigen

- Test for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection: A Spanish Multicentre Study. *J Clin Med*. 2022 Aug 29;11 (17):5077.
106. Raguza D, MacHado RS, Ogata SK, Granato CFH, Patrício FRS, Kawakami E. Validation of a monoclonal stool antigen test for diagnosing *helicobacter pylori* infection in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Apr;50 (4):400-3.
 107. Gisbert JP, De La Morena F, Abraira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101 (8):1921-30.
 108. Gatta L, Vakil N, Ricci C, Osborn JF, Tampieri A, Perna F, et al. Effect of proton pump inhibitors and antacid therapy on ¹³C urea breath tests and stool test for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99 (5):823-9.
 109. Shimoyama T. Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2013;19 (45):8188-91.
 110. Demirtürk L, Yazgan Y, Tarçın O, Özel M, Diler M, Öncül O, et al. Does N-acetyl Cystein Affect the Sensitivity and Specificity of *Helicobacter pylori* Stool Antigen Test? *Helicobacter*. 2003 Apr;8 (2):120-3
 111. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: Review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr*. 2010 Jan;169 (1):15-25.
 112. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26 Suppl 1:31-4
 113. Do LH, Vi TT, Le HT, Do TM, Do DK, Nguyen DD, et al. The Inhibitory Effect of Anti-urease IgY on *Helicobacter Pylori* Infection in Swiss Albino Mice. *Pharmaceutical Sciences Asia*. 2021;48 (3):255-68.

114. Batts KP, Ketover S, Kakar S, Krasinskas AM, Mitchell KA, Wilcox R, et al. Appropriate Use of Special Stains for Identifying *Helicobacter pylori* Recommendations From the Rodger C. Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. *Am J Surg Pathol*. 2013 Nov;37 (11):e12-22.
115. Calvet X. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in the Proton Pump Inhibitor Era. Vol. 44, *Gastroenterology Clinics of North America*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2015 Sep;44 (3):507-18.
116. Mejía-Parra JLJ, Guerrero-Espinoza AE, Flores-Arrascue CP, Chiclayo-Padilla AS. Estandarización de nuevo protocolo Inmunohistoquímico para identificar *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas y valoración frente a la tinción Hematoxilina-Eosina. *Revista del Cuerpo Médico del HNAAA*. 2020 Dec 21;13 (3):291-8.
117. Wang XI, Zhang S, Abreo F, Thomas J. The role of routine immunohistochemistry for *Helicobacter pylori* in gastric biopsy. *Ann Diagn Pathol*. 2010 Aug;14 (4):256-9.
118. Smith SB, Snow AN, Perry RL, Qasem SA. *Helicobacter pylori*: To stain or not to stain? *Am J Clin Pathol*. 2012 May;137 (5):733-8.
119. Hartman DJ, Owens SR. Are routine ancillary stains required to diagnose *Helicobacter* infection in gastric biopsy specimens? An institutional quality assurance review. *Am J Clin Pathol*. 2012 Feb;137 (2):255-60.
120. Batts KP, Ketover S, Kakar S, Krasinskas AM, Mitchell KA, Wilcox R, et al. Appropriate Use of Special Stains for Identifying *Helicobacter pylori* Recommendations From the Rodger C. Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. *Am J Surg Pathol*. 2013 Nov;37 (11):e12-22.
121. Pohl D, Keller PM, Bordier V, Wagner K. Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. *World J Gastroenterol*. 2019 Aug 28;25 (32):4629-4660

122. Peng C, Hu Y, Ge Z, Zou Q, Lyu N. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infections in children and elderly populations. *Chronic Dis Transl Med*. 2019;5 (4).
123. Manfredi M, Gaiani F, Kayali S, Bizzarri B, Iuliano S, Minelli R, et al. How and when investigating and treating *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89 (8-S):65-71
124. José M, Martínez F, Rincón MR, María Blázquez De Castro A, García Sánchez E, García Sánchez JE, et al. Comparative Evaluation of Selective and Nonselective Media for Primary Isolation of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsies. *Helicobacter*. 1997 Mar;2 (1):36-9.
125. Ndip N, Mackay G, Farthing JG, Weaver T. Culturing *Helicobacter pylori* from Clinical Specimens: Review of Microbiologic Methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003 May;36 (5):616-22.
126. Hirschl AM, Makristathis A. Methods to Detect *Helicobacter pylori*: From Culture to Molecular Biology. *Helicobacter*. 2007 Nov;12 Suppl 2:6-11
127. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022 Sep 1;71 (9):1724-62.
128. Saez J, Belda S, Santibáñez M, Rodríguez JC, Sola-Vera J, Galiana A, et al. Real-time PCR for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with upper gastrointestinal bleeding: Comparison with other classical diagnostic methods. *J Clin Microbiol*. 2012 Oct;50 (10):3233-7.
129. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol*. 2012;18 (17):2105-11.
130. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 7;20 (29):9912-21

131. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. Vol. 21, Helicobacter. 2016. Vol. 21 p. 349-63.
132. Lehours P, Mégraud F. Helicobacter pylori molecular diagnosis. Expert Rev Mol Diagn. 2011. Vol 11. p. 351-5.
133. Marques AT, Vítor JMB, Santos A, Oleastro M, Vale FF. Trends in helicobacter pylori resistance to clarithromycin: From phenotypic to genomic approaches. Microb Genom. 2020 Mar;6 (3):e000344. .
134. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? Front Microbiol. 2013 Feb 5;4:7.
135. Alba C, Blanco A, Alarcón T. Antibiotic resistance in Helicobacter pylori. Curr Opin Infect Dis. 2017 Oct;30 (5):489-497.
136. Jeng YW, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. Tetracycline-resistant clinical Helicobacter pylori isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb;49 (2):578-83.
137. Kunin CM. Antimicrobial Activity of Rifabutin. Clin Infect Dis. 1996 Apr;22 Suppl 1:S3-13
138. Galicia Poblet G, Alarcón Caveró T, Alonso Pérez N, Borrell Martínez B, Botija Arcos G, Cilleruelo Pascual ML, et al. Management of Helicobacter pylori infection in the pediatric age. An Pediatr (Engl Ed). 2021;95 (5).
139. Power MH, Orlando ;, Zamora R, Rodríguez González BL. The resistance to antibiotics in Helicobacter pylori.
140. Tsugawa H, Suzuki H, Satoh K, Hirata K, Matsuzaki J, Saito Y, et al. Two Amino Acids Mutation of Ferric Uptake Regulator Determines Helicobacter pylori Resistance to Metronidazole. Antioxid Redox Signal. 2011 Jan 1;14 (1):15-23
141. Fallone CA, Moss SF, Malfertheiner P. Reconciliation of Recent Helicobacter pylori Treatment Guidelines in a Time of Increasing

- Resistance to Antibiotics. , *Gastroenterology*. 2019. Vol. 157. p 44-53
142. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2016. Vol. 43, p. 514-33.
 143. Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier JC, Celiński K, Giguère M, Rivière M, et al. Éradication de *Helicobacter pylori* avec une gélule contenant du sous-citrate de bismuth, du métronidazole et de la tétracycline donnée avec oméprazole versus trithérapie à base de clarithromycine : essai phase 3 randomisé ouvert de non infériorité. *Cancéro digest*. 2011; (2).
 144. Pih GY, Noh JH, Ahn JY, Han GS, Jung HS, Jung HY, et al. Objective Interpretation of the Rapid Urease Test for *Helicobacter pylori* Infection Using Colorimetry. *J Korean Med Sci*. 2022;37 (29).
 145. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?, *World J Gastroenterol*. 2014. Vol. 20 p. 12847-59.
 146. Lian DW, Xu YF, Deng QH, Lin XM, Huang B, Xian SX, et al. Effect of patchouli alcohol on macrophage mediated *Helicobacter pylori* digestion based on intracellular urease inhibition. *Phytomedicine*. 2019 Dec 1;65.
 147. Graham DY. Implications of the paradigm shift in management of *Helicobacter pylori* infections. *Therap Adv Gastroenterol*. 2023 Mar 18;16:17562848231160858
 148. Flores-Treviño S, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Maldonado-Garza HJ, Garza-González E. *Helicobacter pylori* drug resistance: therapy changes and challenges. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018. Vol. 12. p. 819-27.
 149. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol*. 2017. Vol. 112. p. 212-38.

150. Nyssen OP, Bordin D, Tepes B, Pérez-Aisa Á, Vaira D, Caldas M, et al. European Registry on *Helicobacter pylori* management (Hp-EuReg): Patterns and trends in first-line empirical eradication prescription and outcomes of 5 years and 21 533 patients. *Gut*. 2021 Jan 1;70 (1):40-54.
151. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ; European *Helicobacter* Study Group. The Maastricht IV_ Florence consensus report *Gut*. 2012 May;61 (5):646-64.
152. Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, Domingo D, Llorca L, Correa A, et al. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 May 1;35 (5):278-82.
153. Suzuki S, Kusano C, Horii T, Ichijima R, Ikehara H. The Ideal *Helicobacter pylori* Treatment for the Present and the Future. *Digestion*. 2022. Vol. 103 p. 62-8.
154. Liu WZ, Xie Y, Lu H, Cheng H, Zeng ZR, Zhou LY, et al. Fifth Chinese National Consensus Report on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2018 Apr 1;23 (2).
155. Jung HK, Kang SJ, Lee YC, Yang HJ, Park SY, Shin CM, et al. Evidence-based guidelines for the treatment of *helicobacter pylori* infection in korea. *Gut Liver*. 2020. Vol. 15. p. 168-95.
156. Kato M, Ota H, Okuda M, Kikuchi S, Satoh K, Shimoyama T, et al. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2016 Revised Edition. *Helicobacter*. 2019 Aug 1;24 (4).
157. Furuta T, Graham DY. Pharmacologic Aspects of Eradication Therapy for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010 Sep 1;39 (3):465-80.
158. McNicholl AG, Linares PM, Nyssen OP, Calvet X, Gisbert JP.

- Meta-analysis: Esomeprazole or rabeprazole vs. first-generation pump inhibitors in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Sep;36 (5):414-25.
159. García-García J. A. . ¿Qué debemos conocer de los inhibidores de bomba protones, para su uso en las unidades de dolor?. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2007 Oct 14 (7): 501-510.
 160. El Rouby N, Lima JJ, Johnson JA. Proton pump inhibitors: from CYP2C19 pharmacogenetics to precision medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018 Apr;14 (4):447-460
 161. Okubo H, Akiyama J, Kobayakawa M, Kawazoe M, Mishima S, Takasaki Y, et al. Vonoprazan-based triple therapy is effective for *Helicobacter pylori* eradication irrespective of clarithromycin susceptibility. *J Gastroenterol.* 2020 Nov 1;55 (11):1054-61.
 162. Li M, Oshima T, Horikawa T, Tozawa K, Tomita T, Fukui H, et al. Systematic review with meta-analysis: Vonoprazan, a potent acid blocker, is superior to proton-pump inhibitors for eradication of clarithromycin-resistant strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2018 Aug;23 (4):e12495.
 163. Graham DY, Lu H, Shiotani A. Vonoprazan-containing *Helicobacter pylori* triple therapies contribution to global antimicrobial resistance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021 May;36 (5):1159-1163.
 164. Graham DY, Lee SY. How to Effectively Use Bismuth Quadruple Therapy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015 Sep;44 (3):537-63.
 165. Muñoz JM, Regino WO, Zuleta MG. How can *helicobacter pylori* eradication therapies be improved?, *Rev Colomb Gastroenterol.* 2018. Vol 33. p. 437-47.
 166. Keogan DM, Griffith DM. Current and potential applications of bismuth-based drugs, *Molecules.* 2014. . Vol. 19. p. 15258-97.
 167. Zagari RM, Romano M, Ojetti V, Stockbrugger R, Gullini S,

- Annibale B, et al. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Italy: The III Working Group Consensus Report 2015. *Dig Liver Dis.* 2015 Nov;47 (11):903-12
168. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, et al. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology.* 2016 Jul 1;151 (1):51-69. e14.
169. Gisbert JP, Alcedo J, Amador J, Bujanda L, Calvet X, Castro-Fernández M, et al. V Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol.* 2022 May 1;45 (5):392-417.
170. Suzuki S, Kusano C, Horii T, Ichijima R, Ikehara H. The Ideal *Helicobacter pylori* Treatment for the Present and the Future. *Digestion.* 2022. Vol. 103. p. 62-8.
171. Gisbert JP, Pajares JM. Review Stool Antigen Test for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection: a Systematic Review. *Helicobacter.* 2004 Aug;9 (4):347-68.
172. Goderska K, Agudo Pena S, Alarcon T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Jan;102 (1):1-7
173. Shi X, Zhang J, Mo L, Shi J, Qin M, Huang X. Efficacy and safety of probiotics in eradicating *Helicobacter pylori*. *Medicine (Baltimore).* 2019 Apr;98 (15):e15180
174. Li S, Huang XL, Sui JZ, Chen SY, Xie YT, Deng Y, et al. Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy in children. *Eur J Pediatr.* 2014 Feb;173 (2):153-61.
175. Szajewska H, Berni Canani R, Domellöf M, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, et al. Probiotics for the Management of Pediatric Gastrointestinal Disorders: Position Paper of the ESPGHAN Special Interest Group on Gut Microbiota and Modifications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2023 Feb 1;76 (2):232-47.

176. Abadi ATB. Vaccine against *Helicobacter pylori*: Inevitable approach. *World J Gastroenterol*. 2016 Mar 21;22 (11):3150-7
177. Dos Santos Viana I, Cordeiro Santos ML, Santos Marques H, Lima de Souza Gonçalves V, Bittencourt de Brito B, França da Silva FA, et al. Vaccine development against *Helicobacter pylori*: from ideal antigens to the current landscape. *Expert Rev Vaccines*. 2021 Aug;20 (8):989-999.
178. Banik GR, Barratt JLN, Marriott D, Harkness J, Ellis JT, Stark D. A case-controlled study of *Dientamoeba fragilis* infections in children. *Parasitology*. 2011 Jun;138 (7):819-23.
179. Smaill F, Chb MB. Antibiotic susceptibility and resistance testing: An overview. *Can J Gastroenterol*. 2000 Nov;14 (10):871-5
180. Jamaludin S, Mustaffa N, Che Hamzah NA, Syed Abdul Aziz SH, Lee YY. Diagnostic accuracy of reused Pronto Dry® test and CLOtest® in the detection of *Helicobacter pylori* infection. *BMC Gastroenterol*. 2015 Aug 12;15 (1).
181. Crowley E, Bourke B, Hussey S. How to use *Helicobacter pylori* testing in paediatric practice. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013 Feb;98 (1):18-25.
182. Röser D, Simonsen J, Nielsen H V. , Stensvold CR, Mølbak K. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: Epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013 Oct;32 (10):1303-10.
183. Girginkardeşler N, Coşkun Ş, Cüneyt Balcioğlu I, Ertan P, Ok ÜZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Feb;9 (2):110-3
184. Wong ZW, Faulder K, Robinson JL. Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. *Parasitol Res*. 2018 Apr 1;117 (4):971-80.

185. Nagata N, Marriott D, Harkness J, Ellis JT, Stark D. In vitro susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan;56 (1):487-94.
186. Holtman GA, Kranenberg JJ, Blanker MH, Ott A, Lisman-van Leeuwen Y, Berger MY. *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Fam Pract*. 2017 Feb 1;34 (1):25-9.
187. Roma E, Miele E. *Helicobacter pylori* Infection in Pediatrics. *Helicobacter*. 2015 Sep;20 Suppl 1:47-53.
188. Mišak Z, Hojsak I, Homan M. Review: *Helicobacter pylori* in pediatrics. *Helicobacter*. 2019 Sep;24 Suppl 1:e12639. .
189. Santos MLC, De Brito BB, Da Silva FAF, Sampaio MM, Marques HS, Oliveira E Silva N, et al. *Helicobacter pylori* infection: Beyond gastric manifestations. *World J Gastroenterol*. 2020 Jul 28;26 (28):4076-4093
190. Kotilea K, Kalach N, Homan M, Bontems P. *Helicobacter pylori* Infection in Pediatric Patients: Update on Diagnosis and Eradication Strategies. *Paediatr Drugs*. 2018 Aug;20 (4):337-351.
191. Bonilla S, Mitchell PD, Mansuri I. Low Adherence to Society Guidelines for the Management of *Helicobacter Pylori* Among Pediatric Gastroenterologists. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021;73 (2).
192. Beckman E, Saracino I, Fiorini G, Clark C, Slepnev V, Patel D, et al. A novel stool PCR test for *Helicobacter pylori* may predict clarithromycin resistance and eradication of infection at a high rate. *J Clin Microbiol*. 2017 Aug 1;55 (8):2400-5.
193. Perdomo M, Martínez MJ. Infección por *Helicobacter pylori* en niños. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. Asociación Española de Pediatría 2020

AGRAÏMENTS

10. AGRAÏMENTS

Finalment hem arribat a l'última part de la tesi, però que per mi potser és la part més important. Aquesta tesi ha estat possible gràcies a un treball d'equip, on han participat d'alguna manera o una altra moltes persones.

En primer lloc vull fer especial menció al Dr. Carlos Rodrigo, el meu director i tutor. Gràcies Carlos per haver confiat sempre en mi, gràcies per haver-me insistit en fer aquesta tesi, gràcies per transmetre'm il·lusió, sentit comú, objectivitat i criteri. Gràcies per «obligar-me» sempre a saber justificar les meves decisions, a fomentar l'esperit crític i a incentivar-me sempre a voler aprendre més.

En segon lloc, vull agrair profundament el seu suport incondicional a les meves dues microbiòlogues «de capçalera»: La Gema i la Sònia. Sense elles dues aquesta tesi no hauria estat possible. Gràcies per ensenyar-me i intentar fer-me entendre els conceptes bàsics de la biologia molecular. Gràcies per tota la vostra tasca i el vostre recolzament inclús en moments especialment difícils, com han sigut els anys de pandèmia, on el COVID no us va donar cap treva. Gràcies per posar sempre les coses fàcils!

Gràcies a la Paula Sol. Gràcies Paula per fer-me un curs accelerat d'estadística aplicada. Gràcies per la teva paciència i per ajudar-me en una de les parts que per mi ha estat una de les més complicades.

També un agraïment molt especial i sincer a l'Alba, la Victòria i l'Anna. Com he dit abans, aquesta tesi i tota la feina que hi ha al darrera és un treball d'equip. Sense elles hauria estat impossible dur-la a terme. Gràcies per haver-me ajudat a reclutar pacients, a fer les endoscòpies, a portar les mostres corrent escales amunt cap al laboratori. Gràcies per formar part d'aquesta petita, però gran, Unitat de Gastroenterologia Pediàtrica.

Gràcies a la Neus Roig i la Nona Romaní, per la vostra implicació en l'estudi de la *Dientamoeba*, en el reclutament de pacients i el processament de les mostres.

Hi ha persones que potser sense saber-ho, també m'han ajudat a que aquesta tesi vegi la llum. Entre elles, tot el personal de Consultes Externes de Pediatria. Aquest darrer any ha estat especialment intens, i la veritat és que els dies de consultes han estat com un oasi mental que he agraït molt. Vull donar les gràcies especialment a la Núria, la Glòria i la Laura. Gràcies pel vostre bon humor, per la vostra predisposició, per la vostra professionalitat i per haver-me ajudat a fer més fàcils aquest últims mesos.

Com no pot ser d'altra manera, un agraïment profund a l'Emma i al Roger, els meus fills. Ells són el motor que em motiva a no parar, a superar-me i a tirar endavant. Gràcies Emma per ajudar-me en l'elaboració d'algunes taules i gràfics mentre et recuperaves de la intervenció de genoll. Gràcies a tots dos pels dies que hem coincidit tancats a casa, vosaltres per exàmens i jo per la tesi, compartint cafè i mini-sobretaula! Aquests petits espais de relax han sigut una inesperada meravella!

Gràcies als meus pares, el Ramon i la M^a Rosa, pel seu suport incondicional en tots els meus projectes.

I finalment gràcies al Joan. El meu company de vida, de viatge i de somnis. T'he posat a prova en infinites ocasions (primer el MIR, després la residència, les guàrdies i ara amb la tesi). La teva empenta, el teu pragmatisme i positivisme s'encomana. Gràcies per posar-me sempre el camí fàcil i per recolzar-me en tot allò que em proposo.

Vull donar les gràcies també a tots els companys/amics del Servei de Pediatria. Gràcies pels moments compartits, pels consells, per les rialles. Gràcies per formar part del meu dia a dia.

I per acabar, vull donar les gràcies a tots els nens (i als seus pares) que van acceptar participar en aquest estudi. Ser metge és una sort, però ser pediatra és un regal!

