

Artículo de Revisión**Cultivo y métodos fenotípicos para determinar el perfil de susceptibilidad en *Helicobacter pylori***

María Alejandra Buitrago Gómez¹, Laura Díaz Ramírez¹, Michelle Mejía Romero¹, Adalucy Álvarez Aldana².

Resumen

Introducción: Numerosos métodos han sido desarrollados para detectar la resistencia de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a los antimicrobianos. Se tiene al método dilución en agar como referencia recomendada por *The Clinical Laboratory Standards Institute*. Igualmente se tienen diversas técnicas que surgen como alternativa de análisis, entre ellas la prueba de E-test y difusión en disco.

Metodología: mediante una revisión sistemática de la literatura describir la reproducibilidad de las pruebas y su adecuada utilización. Conclusiones: establecer si las pruebas utilizadas para tal fin reúnen las condiciones necesarias para seleccionarla como prueba de rutina capaz de generar resultados confiables que ayuden a direccionar el tratamiento adecuado basado en la susceptibilidad y no de manera empírica.

Palabras clave:

Helicobacter pylori, farmacorresistencia microbiana, antibióticos, bacteria.

Abstract:

Introduction: Numerous methods have been developed to detect the resistance of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) to antimicrobials. The agar dilution method is used as a reference recommended by *The Clinical Laboratory Standards Institute*. There are also various techniques that arise as an alternative analysis, including the E-test and disk diffusion. **Methodology:** through a systematic review of the literature describe the reproducibility of the evidence and its proper use. Conclusions: establish whether the tests used for this purpose meet the necessary conditions to select it as a routine test capable of generating reliable results that help direct the appropriate treatment based on susceptibility and not empirically.

Key words: *Helicobacter pylori*, drug resistance microbial, anti-bacterial agents, bacteria

1 Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira. Semillero Microorganismos de importancia en salud humana y animal "OBVIO MICROBIO"

2 Profesora investigadora. Programa de Microbiología. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Seccional Pereira. Líder Semillero "OBVIO MICROBIO"

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral, patógeno humano y un microaerófilo fastidioso (1-2). Es un patógeno humano común que ha existido en el estómago desde hace aproximadamente 60.000 años (3). Sin embargo, no fue de importancia hasta que fue cultivado por Marshall y Warren (2-3). El descubrimiento de *H. pylori* en 1982 fue el punto de partida de una revolución sobre los conceptos y el tratamiento de las enfermedades gastroduodenales (4) Pero solo hasta el 2005 recibieron su reconocimiento, en la historia de los premios Nobel, esta es solo la tercera vez que se reconoce el descubrimiento de una bacteria (5).

Es una de las causas más comunes de infecciones bacterianas crónicas en todo el mundo (6). La infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población adulta en todo el mundo, hoy, 30-80% de la población mundial está infectada con este organismo pero la prevalencia de la infección por *H. pylori* varía ampliamente según el área geográfica, la edad, la raza, el nivel socioeconómico y los factores bacterianos específicos de la cepa (3, 7-8). Los principales modos de transmisión se consideran fecal-oral y oral-oral, pero algunas pruebas indirectas informan la transmisión a través del agua potable y otras fuentes ambientales (9-10). En Colombia se ha descrito su ocurrencia en material de biopsias gástricas y se han llevado a cabo estudios seroepidemiológicos. Las zonas montañosas de Colombia como Pasto y Medellín, ofrecen altas tasas de prevalencia con 93% y 67,1% respectivamente, en comparación con las tasas medias de las zonas planas como San Gil y algunos municipios del Meta con 48% y 61,2% respectivamente (11). Sin embargo en Colombia no se han hecho estudios de prevalencia

general sobre *H. pylori*, razón por la cual no se tienen datos altamente precisos.

En la mayoría de los individuos, la infección por *H. pylori* puede continuar durante toda la vida como una condición asintomática (12). Por lo general, la prevalencia de *H. pylori* aumenta con la edad en la mayoría de los países y con un nivel socioeconómico más bajo, sin embargo, se ha observado un descenso en la prevalencia de la infección por *H. pylori* en las últimas décadas en el análisis de tendencias temporales de varias poblaciones grandes (13-14). En ciertos contextos, la infección generalmente tiene lugar en la infancia y suele durar toda la vida (15).

H. pylori se define como un carcinógeno de Clase I por la Organización Mundial de la Salud y fue la primera especie bacteriana comprobada que causa cáncer por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (8, 10, 16). Desafortunadamente, su persistencia en el estómago causa inflamación gástrica crónica y daño tisular, lo que lleva a alteraciones que pueden evolucionar a enfermedades gástricas graves, asociada con úlcera péptica y linfoma gástrico (17). Aunque la mayoría de los pacientes infectados no desarrollarán ninguna complicación clínicamente significativa, la infección por *H. pylori* confiere un 1% - 10% de riesgo de desarrollar úlceras gástricas o duodenales, un 0.1% - 3% de riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico y <0.01% de desarrollo de linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (18-21). Además, la erradicación de *H. pylori* puede disminuir rápidamente la inflamación activa en la mucosa gástrica, prevenir la progresión hacia lesiones precancerosas y la atrofia gástrica reversa antes del desarrollo de metaplasia intestinal (15, 22). Por lo tanto, la erradicación parece ofrecer el enfoque más directo para reducir las enormes consecuencias

humanas y económicas de la infección por *H. pylori* (23).

Además de los trastornos gastrointestinales, *H. pylori* también desempeña un papel en las enfermedades extradigestivas, incluidas la anemia ferropénica inexplicable, la púrpura trombocitopénica idiopática crónica, el retraso del crecimiento y la deficiencia de vitamina B12 (24-25). Un diagnóstico primario confiable y control del éxito del tratamiento de la infección por *H. pylori* es crucial para pacientes con un amplio espectro de afecciones relacionadas (26-27). El diagnóstico preciso de la infección por *H. pylori* implica el conocimiento, esfuerzo e investigación combinados de laboratorios, gastroenterólogos y patólogos (26). Si *H. pylori* aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades, el costo de la morbilidad asociada a este microorganismo podría ser mucho mayor (14).

El tratamiento de las infecciones producidas por *H. pylori* puede realizarse con la combinación de diferentes antibióticos, entre ellos claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y metronidazol y un inhibidor de la bomba de protones que disminuye la secreción clorhídrica del estómago. Las monoterapias no han demostrado utilidad clínica y se recomienda el empleo de terapias dobles, triples o incluso cuádruples (27).

Los medicamentos que generan más resistencia antimicrobiana son los nitroimidazoles (metronidazol y tinidazol), presentando una tasa de resistencia aproximada del 35% en los países industrializados (13). En países como Colombia, donde el uso indiscriminado de antibióticos es muy frecuente, la tasa de resistencia es mucho mayor, razón por la cual algunos grupos no utilizan este medicamento en la terapia de erradicación contra *H. pylori* (28).

Por lo anteriormente descrito uno de los

factores implicados en el fallo terapéutico es la resistencia a los antimicrobianos utilizados, por lo que es de vital importancia determinar la sensibilidad antimicrobiana mediante pruebas basadas en cultivo como difusión en disco, microdilución en caldo, E-test y dilución en agar. Este último establecido como método de referencia por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) y actualmente *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (29, 20). El método epsilómetro o E-test es altamente concordante con el método de referencia y su uso está recomendado por la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) (30).

Las ventajas de la prueba dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el desarrollo satisfactorio de la mayoría de los microorganismos de difícil crecimiento (20). Sin embargo, entre sus desventajas están la compleja metodología requerida para su desarrollo y el alto costo por prueba. Generalmente no se realiza en laboratorios clínicos de rutina pero es ideal para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que analizan un gran número de cepas (26). En contraste, el E-test, descrito recientemente, es el método de elección para uso en laboratorios de rutina e investigación y se basa en la combinación de las pruebas de difusión en disco y dilución en agar entregando una sofisticada pero fácil y reproducible metodología (31).

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo pretende, mediante una revisión sistemática de la literatura acerca del tema de la reproducibilidad de las pruebas y su adecuada utilización, ya que es de gran importancia al momento de realizar diagnósticos certeros sobre la sensibilidad o resistencia de un microorganismo hacia los antimicrobianos (32), por tanto es necesario establecer si las pruebas utilizadas para

tal fin reúnen las condiciones necesarias para seleccionarla como prueba de rutina capaz de generar resultados confiables que ayuden a direccionar el tratamiento adecuado basado en la susceptibilidad y no en lo que se recomienda comúnmente.

Metodología:

Se realizó revisión sistemática de literatura que recopila y sintetiza los resultados de múltiples investigaciones con el objetivo de realizar una evaluación crítica que permite resumir y abordar lo más relevante del tema.

Se dispuso una amplia búsqueda de material virtual tanto en libros como en las bases de datos que ofrecen los paquetes de la Universidad Libre seccional Pereira. Para la bibliografía en español se empleó *dialnetplus*, *google académico* y *scielo*; para los textos en inglés *pro-quest*, *Pub-Med*, *scopus*, *google academic* y *scien- cedirect*. Se usaron como palabras clave: *Helicobacter pylori*, farmacorresistencia microbiana, antibióticos y bacteria (*Helicobacter pylori*, *drug resistance microbial*, *anti-bacterial agents*, bacteria; en inglés), en compañía de operadores booleanos (AND – OR) y de otras palabras que fueron de ayuda, las cuales fueron: Pruebas de susceptibilidad, correlación, E-test, dilución en agar y difusión en discos.

De la búsqueda preliminar se obtuvieron 67 artículos en español y 238 en inglés; de los cuales solo se escogieron aquellos que cumplieran el requisito de ser publicados en los últimos 5 años. También se descartaron títulos que tuvieran un enfoque diferente al descriptivo sin discriminar si estos eran científicos o de revisión. Y por último se eliminaron todos aquellos artículos de revisión. Finalmente se concluye con 6 artículos en español y 55 en inglés que, previo a su sutil lectura, se decidió solo emplear 51 respectivamente. Estos

artículos fueron la base de la construcción de este texto y se encuentran referencias al final del mismo.

Resultados Y Discusión:

El tratamiento de la infección por *H. pylori* es difícil, y de los ensayos clínicos iniciales parece que la actividad *in vitro* no siempre se correlaciona con el éxito *in vitro* y que la recaída ocurre frecuentemente después de la eliminación aparentemente exitosa del organismo con diversos agentes antimicrobianos (20). Los tratamientos de erradicación se han desarrollado durante los últimos 20 años, este consiste generalmente en varias combinaciones de medicamentos. Actualmente hay al menos ocho medicamentos antimicrobianos disponibles para tratar la infección con *H. pylori*: amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol, levofloxacina, tinidazol, furazolidona y rifabutina (33). Más comúnmente, un supresor de ácido (generalmente un inhibidor de la bomba de protones) o un antagonista del receptor de histamina (receptor H2) se prescribe en combinación con dos de los antibióticos, generalmente amoxicilina, metronidazol o claritromicina durante 7-14 días. La combinación de dos antibióticos puede aumentar el éxito de la terapia de erradicación y disminuir la posibilidad de resistencia secundaria a los antibióticos (33-36). La triple terapia empírica estándar ahora solo se recomienda en regiones donde se sabe que la resistencia a la claritromicina es menor del 15% -20% y en pacientes sin antecedentes de exposición previa a macrólidos. Si bien no se ha desarrollado un nuevo tratamiento como alternativa a la terapia triple estándar, estudios recientes han descrito las ventajas de utilizar diferentes combinaciones de antibióticos conocidos o la duración prolongada del tratamiento (25, 37).

El éxito de estos tratamientos ahora se ve comprometido por el aumento en la resis-

tencia a los antimicrobianos que representa el principal factor clave para el fracaso del tratamiento pero se debe incluir también el compromiso de los pacientes por el mismo, los antecedentes genéticos individuales, cargas bacterianas gástricas masivas, bacterias internalizantes, alta acidez gástrica, polimorfismos génicos (IL-1B y CYP2C19), lavado y dilución de antimicrobianos, formación de biopelículas (19, 38). Se estima que en un 20% de los pacientes con *H. pylori* positivos, las terapias empíricas de primera línea fracasan por lo tanto, los médicos deben prescribir terapias de segunda línea para erradicar *H. pylori* (39). Varios factores impulsan el desarrollo de resistencia antimicrobiana con el número de fracasos anteriores del tratamiento, siendo este el más importante. Recientemente se ha demostrado que después de una sola terapia sin éxito, la resistencia a la claritromicina aumentó al 60%; otros intentos de tratamiento en vano dieron como resultado una resistencia tan alta como 80% lo cual disminuye considerablemente las tasas de curación (31). Dado que la resistencia a los antibióticos es el principal determinante del fracaso del tratamiento, existe una necesidad continua de definir las tasas de resistencia localmente y controlar estos patrones cambiantes de susceptibilidad para guiar la terapia óptima (40).

La proporción de pacientes en quienes la infección se erradica después del tratamiento oscila entre 60% y 95% (21). En todo el mundo, la resistencia a los antimicrobianos de *H. pylori* es alta, y parece estar aumentando para al menos tres de estos ocho agentes, claritromicina 0% a 45%, metronidazol 10% a 90% y levofloxacina 6% a 21% (41-43). En paralelo, la resistencia doble a claritromicina y metronidazol se disparó al 65% y la resistencia triple a claritromicina, metronidazol y quinolonas aumentó a 15% (44). Comprensiblemente,

las cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina, la amoxicilina, el metronidazol y la levofloxacina se han vuelto cada vez más prevalentes en todo el mundo (27, 31). La resistencia a la tetraciclina y la ciprofloxacina ha sido reportada por varios estudios, pero todavía parece poco común (32).

La resistencia a los antibióticos en *H. pylori* es la causa principal del fracaso de la erradicación. La resistencia creciente a menudo es paralela a los patrones de consumo de antibióticos, y puede variar dentro de los grupos de pacientes según la región geográfica, la edad y el sexo del paciente, el tipo de enfermedad, el lugar de nacimiento y la presencia de otras infecciones (32). Para superar el problema de la resistencia a los antimicrobianos y aumentar las tasas de curación de los tratamientos iniciales, se están desarrollando nuevas combinaciones de fármacos a partir de las fórmulas existentes (12, 27). El aumento de la resistencia ha complicado aún más la búsqueda de un régimen de tratamiento óptimo y también ha enfocado una nueva atención hacia métodos confiables para determinar la susceptibilidad *in vitro* de esta especie bacteriana (23).

Los estudios de vigilancia continua que controlan el estado actual de la resistencia a los antimicrobianos son indispensables para establecer directrices actualizadas sobre los tratamientos de erradicación de primera línea (45). Al igual que otras bacterias, la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos que da como resultado una falla en el tratamiento de primera línea varía entre 40% y 70%. Por lo tanto, es importante controlar las tasas de resistencia en diferentes países y poblaciones (21). El tratamiento de las infecciones causadas por *H. pylori* requiere que se preste especial atención a los métodos confiables para determinar la susceptibilidad *in vitro*

de este microorganismo, adquiriendo así una mayor importancia la aplicación de estas pruebas (3). Todo con el propósito de mejorar la eficacia de los regímenes de tratamiento y para garantizar el manejo adecuado de la infección a pesar de que las directrices internacionales recomiendan el cultivo más las pruebas de susceptibilidad a antibióticos para guiar el tratamiento de tercera línea después del fracaso de dos esquemas previos. No se considera este enfoque como obligatorio antes del tratamiento de primera y segunda línea (21,40).

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se divide en métodos invasivos y no invasivos. Las pruebas diagnósticas invasivas incluyen imagen endoscópica, histología, prueba rápida de ureasa, cultivo y métodos moleculares. Las pruebas diagnósticas no invasivas están basados en la detección de un antígeno o anticuerpo en heces o sangre muestras o en la prueba de aliento con urea (34, 46). Se debe destacar que en la lectura de la bibliografía no existen recomendaciones sobre si se deben tomar una o más biopsias gástricas para evaluar la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, pero debido a la distribución desigual de la bacteria en la mucosa gástrica, las biopsias de varios sitios del estómago podrían aumentar el rendimiento diagnóstico para la detección de *H. pylori* y es probable que el éxito de las terapias de erradicación (27, 39). A pesar de la disponibilidad actual de estos métodos diagnósticos, cada método tiene sus propias ventajas, desventajas y limitaciones. La elección de uno u otro método podría depender de la disponibilidad y accesibilidad de las pruebas de diagnóstico, el nivel de los laboratorios, la relación de probabilidad de las pruebas positivas y negativas y las condiciones clínicas de los pacientes (32, 47).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Cultivar *H. pylori* es difícil, lento y costoso, y es un medio poco práctico para establecer el diagnóstico de infección (17). Pero a pesar de esto es el paso principal para poder aplicar todas las pruebas de susceptibilidad correspondientes. Los componentes de los medios incluyen una base de agar, suplementos de crecimiento y suplementos selectivos (38). Cuando faltan nutrientes, *H. pylori* pierde su forma de espiral y se transforma en forma cocoide progresivamente. La mayoría de la gente cree que estas formas son tanto no cultivables como inviables. Sin embargo, otros afirman que algunos de ellos pueden ser viables pero no cultivables y constituyen una forma resistente de la bacteria (38). El cultivo permite probar la sensibilidad a los antibióticos de *H. pylori* para elegir los agentes apropiados para la erradicación. Además, el aislamiento de bacterias nos ha permitido tener una mejor comprensión de los patógenos y la interacción del huésped y el desarrollo de vacunas (38, 47). En general, el cultivo tiene casi el 100% de especificidad, pero la sensibilidad del cultivo muestra una variación significativa, entre 85% -95% (19). Los métodos basados en el cultivo, que incluyen la prueba E-test, la dilución en agar, la microdilución en caldo y los métodos de difusión en disco, generalmente se realizan para la prueba de susceptibilidad a antibióticos de *H. pylori*. Estos son aplicables para todos los agentes antimicrobianos, que se prueban a través de diluciones en serie de varias concentraciones (15).

Los métodos fenotípicos habituales de las pruebas de susceptibilidad pueden aplicarse a *H. pylori*, pero dado que la resistencia se debe esencialmente a mutaciones puntuales, también se utilizan métodos genotípicos, especialmente para la claritromicina (38). Entre los métodos fenotípicos que son los que permiten estas

pruebas se encuentran:

Método de dilución de agar

El método de dilución en agar, generalmente considerado el método de referencia para comparar otras técnicas (38). El "Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio" (CLSI) ha aprobado solo el método de dilución de agar, pero requiere mucho tiempo, trabajo intensivo y útil para probar simultáneamente una gran cantidad de cepas. No es adaptable a un pequeño número de cepas, por lo que no es práctico realizarlo rutinariamente. Se han informado también dos métodos alternativos el método de difusión del disco y la prueba del Epsilómetro (E-test) (14).

Prueba de difusión de disco.

El método de difusión en disco es el más simple, económico para las pruebas de susceptibilidad de rutina y adaptable a la práctica clínica. Sin embargo, generalmente no se recomienda para bacterias de crecimiento lento (14, 38). El método de difusión del disco consiste en colocar un disco recubierto de antibiótico directamente en la placa de agar inoculada con *H. pylori* y determinar la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Este método rentable es ampliamente utilizado para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para una variedad de microorganismos, pero los criterios de difusión del disco para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *H. pylori* no han sido hasta la fecha definidos (27). Incluyendo que es inapropiado para microorganismos como *H. pylori*, que requieren una atmósfera microaerófila, un tiempo de incubación prolongado y numerosos aditivos en el medio de crecimiento (35).

E-test.

La prueba del épsilómetro es un nuevo método de prueba de susceptibilidad in vitro diseñado para la determinación cuantitativa de la susceptibilidad a los agentes

antimicrobianos. La prueba de E-test es una tira de plástico que contiene gradientes crecientes de concentración antimicrobiana, continuos y exponenciales en un lado y una escala de CIM gradual graduada que cubre 15 diluciones dobles en el sitio opuesto (24, 41, 48). En la mayoría de los casos, los resultados se interpretaron fácilmente para la mayoría de los fármacos, ya que las elipses de inhibición generalmente estaban claramente demarcadas y el punto de intersección del borde de la zona con la tira también estaba bien delineado (24). El método E-test tiene la ventaja de ser un método cuantitativo con una expresión directa de CIM, su estable de liberación de antibióticos y una tolerancia a la incubación prolongada y además, está adaptado a bacterias de crecimiento lento como *H. pylori*. Se ha encontrado una buena correlación entre este método y el método de dilución en agar, con la excepción del metronidazol (47, 49).

A través de la bibliografía hemos encontrado diversos ejemplos del uso y comparación de las diferentes pruebas de susceptibilidad para determinar así la correlación existente entre los resultados de las mismas. Glupczynsky et al. (1991) demostró la correlación entre los resultados de las pruebas por dilución en agar y los métodos de E-test en general, el 86% de los resultados estuvieron dentro de la dilución de 1 log₂ y el 99,5% en los pasos de dilución de 2 log₂. No se encontraron errores mayores o mayores entre el E-test y las CIM de dilución en agar. Sin embargo, demostró que para el metronidazol, algunas cepas produjeron crecimiento de numerosas colonias pequeñas dentro de la zona de elipse de inhibición. Estas colonias generalmente se identificaron claramente y se interpretaron como aislados resistentes. Lograron también la identificación de algunas cepas que produjeron zonas de inhibición elíptica difusa mal definidas, especialmente con tetraciclina.

Piccolomini et al. (1997) en su estudio evaluaron la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante el uso de la metodología de la prueba E-test comparándola con la dilución en agar y la microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad cuantitativa de *H. pylori* a 20 agentes antimicrobianos. La máxima CIM se observó para metronidazol 32 mg/ml por los tres métodos. La prueba E-test arrojó un mayor número de resultados que indicaron resistencia que los métodos de referencia cuando se probó el metronidazol. En general, el 91,3% de las CIM determinadas por la prueba E-test se encontraban dentro de la dilución 1 log₂ y el 98,8% estaban dentro de las diluciones 2 log₂. La prueba E-test tuvo un acuerdo superior al 80% con la referencia métodos a excepción de las pruebas con tetraciclina (70.8%) por la microdilución en caldo.

Nuevamente Glupczynsky et al. (2002) realizó un estudio multicéntrico en donde evaluó la fiabilidad de la prueba E-test en comparación con el método de dilución en agar de referencia. En general, la variabilidad inter e intralaboratorio de los resultados de la dilución en agar resultó baja para claritromicina y amoxicilina (es decir, respectivamente, menos de 2 y 3 variaciones de log₂ en los resultados de CIM obtenidos para todos los aislamientos de *H. pylori* por los cuatro centros participantes) independientemente de la asociación de parámetros. Por el contrario, la variabilidad de los resultados de la CIM para el metronidazol fue mucho mayor. Para este antimicrobiano solo se encontró una concordancia moderada entre los resultados de la prueba E-test y los de la dilución en agar, con solo 57.5% y 77.5% de todos los valores CIM que muestran concordancia dentro de 1 log₂ y dentro de 2 log₂ diluciones, respectivamente.

Fathi et al. (2013) evaluó la correlación entre la prueba de E-test y la difusión en

disco. En cuanto a la prueba de sensibilidad a la difusión de disco de antibióticos, la sensibilidad fue de 37.5% en tetraciclina 100.0% en claritromicina, 0% en metronidazol, 87.5% en ciprofloxacina, 12.5% en amoxicilina. Mientras que con respecto a la prueba E-test, la claritromicina fue intermedia en 50.0%, la sensibilidad en Metronidazol fue 0%, ciprofloxacina en 75%, tetraciclina en 25%. En este trabajo, la tasa de resistencia al metronidazol detectado por el E-test fue 100%, reveló una alta tasa de resistencia a la amoxicilina mediante la prueba E-test del 87.5%. También se halló una alta tasa de resistencia a la claritromicina, del 100% por el método de difusión del disco, sin embargo, solo el 50% se confirmaron resistentes a la claritromicina mediante la prueba E-test.

Ogata et al. (2014) en su estudio evaluó la confiabilidad de la prueba E-test y la difusión en disco comparando con el método de dilución en agar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*. El metronidazol mostró el nivel de resistencia más alto: 40,2%, 33,7% y 39,9% mediante el método de dilución en agar, E-test y difusión en disco, respectivamente. La claritromicina presentó una tasa de resistencia del 19.5% mediante el método de dilución en agar y mediante la prueba E-test un 20.8%. La difusión de disco mostró resistencia en 38.9%. La amoxicilina mostró 10.4% de tasa de resistencia por dilución de agar y 9% por E-test, pero presentó la mayor tasa de resistencia por difusión de disco (68.8%). Determinó que las principales diferencias fueron el precio de cada prueba y el tiempo consumido para preparar cada uno. La dilución de agar necesita una dilución secuencial de antimicrobianos y utiliza y fue la prueba más laboriosa y que requirió mucho tiempo para prepararse, sin embargo se podían evaluar 20 muestras en cada placa.

Selgrad et al. (2014) inició su estudio con la hipótesis de si la toma y el análisis de biopsias del antro y el corpus podían aumentar el rendimiento diagnóstico para optimizar la terapia guiada por la susceptibilidad a antibióticos de *H. pylori*. En el estudio se demostró que la susceptibilidad a diferentes antibióticos entre el antro y las biopsias del cuerpo es un fenómeno común y también se produce en la erradicación sin tratamiento previo en pacientes previamente tratados. De acuerdo con estudios previos se encontró una susceptibilidad antibiótica discordante comparativamente alta a claritromicina y metronidazol entre el antro y las biopsias del cuerpo.

Di Giulio et al (2016) determinó el perfil de susceptibilidad de ciertas cepas de *H. pylori* mediante el uso de E-test y la dilución en agar pero incluyendo en este estudio la toma de biopsias del antro y el fondo del estómago como en el estudio anterior. Se mostró una concordancia total de los resultados entre el E-test y la placa de agar de tres sectores. La evidencia más clara fue el mayor porcentaje de resistencia a claritromicina tanto en el antro como en el fondo, y el mayor porcentaje de cepas resistentes a metronidazol, levofloxacina, amoxicilina, ciprofloxacina en fondo gástrico con respecto al antro. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en ninguno de los casos.

A través de la literatura se lograron determinar cómo criterios interpretativos para las CIM de las pruebas: no existe un punto de corte estandarizado CIM para *H. pylori* para la prueba de dilución en agar, excepto para claritromicina (CIM ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$, e intermedios si CIM = 0.5 $\mu\text{g/ml}$). El punto de corte CIM para otros antimicrobianos se basó en la literatura (CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para amoxicilina y furazolidona, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ para tetraciclina y ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ para metronidazol). Para la difusión en disco el estándar

de metronidazol por la "CLSI": susceptible ≥ 21 mm, intermediario 16-21 mm y resistente < 16 mm. El punto de inflexión a otros antimicrobianos se basó en estudios previos con metodología similar: amoxicilina susceptible ≥ 25 mm y resistente a la amoxicilina < 25 mm, claritromicina susceptible ≥ 21 mm y claritromicina resistente < 21 mm, y furazolidona susceptible ≥ 13 mm y resistente a furazolidona < 21 mm (31, 46).

De las muchas pruebas de diagnóstico disponibles para la detección de la infección por *H. pylori*, cada una de ellas tiene ciertas ventajas y desventajas. Ya sea debido a la baja sensibilidad o especificidad, ninguno de ellos puede considerarse como el estándar de oro "Gold standart" (47). A pesar de que el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico estandarizó y aprobó el método de dilución en agar como método de referencia para la prueba de sensibilidad de *H. pylori*, este no es adecuado para las pruebas individuales de cepas únicas en la práctica diaria (16). La prueba E-test, por otra parte, se ha utilizado con frecuencia para la prueba de susceptibilidad de *H. pylori*, y los resultados se han correlacionado estrechamente con los resultados de la dilución de agar en algunos estudios pero no en otros. Los resultados variaron especialmente con respecto al metronidazol (27, 35). Estudios previos han demostrado que la tasa de resistencia al metronidazol determinada por la prueba E-test podría sobreestimarse en un 10-20% en comparación con la determinada por el método de dilución en agar (40-41).

La prueba E-test es mucho menos laboriosa y es más fácil de realizar que el método de dilución en agar, adicionalmente que ha demostrado una excelente correlación con el método de dilución en agar para la mayoría de los antibióticos Ade-

más, la prueba E-test requiere el material y los principios del ampliamente usado método de susceptibilidad a la difusión del disco (21, 33, 50). Entre los métodos de prueba de susceptibilidad fenotípica, la prueba de difusión en disco es el método más fácil y económico, pero no se recomienda para especies bacterianas que crecen lentamente. Se recomienda E-test como el mejor y más simple método para la evaluación de susceptibilidad antibiótica de rutina para *H. pylori*, a pesar de que su costo es más elevado en comparación a las otras metodologías (9, 50, 40). Sin embargo, combinaciones de más de una prueba por lo general dan el diagnóstico bastante satisfactorio (47, 49).

Cualquier terapia de una enfermedad infecciosa se basa en gran medida en los resultados de las pruebas de susceptibilidad, y los resultados de la erradicación de *H. pylori* se optimizan cuando hay disponibles resultados de susceptibilidad específicos de pacientes, regiones o poblaciones (40, 51). Teóricamente, la terapia basada en la susceptibilidad es superior a la terapia empírica si existe resistencia a los antibióticos en cualquier población (51). En la mayoría de las regiones, incluidas las regiones desarrolladas, hay pocos laboratorios que tienen la capacidad de realizar cultivos y pruebas de sensibilidad de aislados de *H. pylori*; por lo tanto, la información necesaria para seleccionar los mejores agentes para usar en base a las pruebas de sensibilidad a menudo no está disponible (41). Las pruebas de susceptibilidad en etapas más tempranas podrían ser de mayor beneficio para los pacientes afectados y pueden ayudar a los médicos a seleccionar un tratamiento de erradicación apropiado.

Conclusiones

La detección de *H. pylori* no es una tarea fácil debido a la dificultad de acceder a su

nicho ecológico y a la naturaleza frágil de la bacteria. La detección ha sido un tema de gran interés desde el descubrimiento de la bacteria en 1982, pero incluso ahora, no se puede proponer un método perfecto. Se debe establecer un régimen de tratamiento antibiótico juicioso para una mayor prevención del desarrollo de la resistencia a *H. pylori* a otros agentes antibióticos; esto podría lograrse mediante la realización de ensayos de diagnóstico adecuados antes del inicio del tratamiento. Las pruebas de susceptibilidad son rentables, previene la administración de antibióticos ineficaces y permite la adaptación de un tratamiento individual que sea exitoso para los pacientes. Es necesario analizar en el futuro si las pruebas de susceptibilidad posteriores son útiles una vez que un tratamiento guiado por resistencia ya no ha tenido éxito.

Referencias Bibliográficas:

1. Bakka A, Salih B. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic subjects in Libya. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;43(8):265-268.
2. Herbrink P., & Van Doorn L. (2014). Serological methods for diagnosis of *H. pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *European Journal of clinical microbiology and infectious disease*, 19 (3) 164-173.
3. Yamada, T. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. *The Maastricht Consensus Report*. 1997;41:8-13.
4. Piccolomini R, Bonaventura G, Cattamo G, Carbone F, Neri M. Comparative Evaluation of the E Test, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1997;35(7):1842-1846.

5. *Helicobacter pylori*: what do we still need to know? 2016. J Axon A. Clin Gastroenterol; 40:15-19.
6. Berardi R, DiPiro J, Talbert R, Yee G. Peptic Ulcer Disease. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 2nd ed. New York, USA; 2015.
7. Wang Y, Kuo F, Liu C, Wu M, Shih H, Wang S et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World Journal of Gastroenterology; 21(40):11221-11235. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i40/11221.htm>
8. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, (2017). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Masstricht V, consensus Report. Gut online.
9. Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Józwiak P, Celińska-Cedro D, Madaliński K, Dzierzanowska D. (2018). Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from children in Poland. Int J Antimicrob Agents.;18:387-390.
10. Dore M, Osato M, Realdi G, Mura I, Graham D, Sepulveda A. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999;43(1):47-54.
11. Best LM, Haldane DJ, Keelan M, Taylor DE, Thomson AB, Loo V, et al. (2013). Multilaboratory Comparison of Proficiencies in Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* and Correlation between Agar Dilution and E Test Methods. Antimicrob Agents Chemother.;47:3138-3144.
12. Osato M, Reddy R, Reddy S, Penland R, Graham D. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001;17(1):39-44.
13. Kobayashi I, Saika T, Muraoka H, Murakami K, Fujioka T. (2016). *Helicobacter pylori* isolated from patients who later failed *H. pylori* eradication triple therapy readily developed resistance to clarithromycin. Journal of medical microbiology; 55: 737-740.
14. Masaoka T, Suzuki H, Kurabayashi K, Kamiya AG, Ishii H. (2014) Second-line treatment of *Helicobacter pylori* infection after dilution agar and PCR-RFLP analysis. Aliment pharmacol ther; 20: 68-73.
15. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham DY, et al. (2017). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III, consensus Report. Gut;56:772-781.
16. Alarcón T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. (2016). Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* Strains isolated from children: Prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Journal of clinical Microbiology; 41(1): 486-488.
17. Kuipers E, Thijs JC, Festen H. (2014). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther; (suppl 2): 59-69.
18. Beltran O. (2015). Revisión sistemática de la literatura. Rev Col Gastroenterol; 20: 60-69.
19. Pina M, Occhialini A, Doermann H, Megraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin Hybridization in liquid Phase. Journal of clinical microbiology. 2018;36(11):3285-3290.
20. Piccolomini, R., Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F., & Neri, M. (1997). Comparative Evaluation of the E Test, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents. Journal Of Clinical

- Microbiology, 35(7), 1842–1846.
21. Di Giulio M, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in Central Italy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015;51(3):263-269.
 22. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Resistance Updates*. 2001;4(3):178-186.
 23. Bravo L, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García L, Bravo P et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica*. 2013;34(3):124-131.
 24. Glupczynsky Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen, L, Alarcon A, López-Brea M et al. Comparison of the E Test and Agar Dilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2002;21(1):549–552.
 25. Fathi M, EL-Folly R, Hassan R, El-Arab M. Genotypic and phenotypic patterns of antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains among Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013;14(3):235-246.
 26. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(2):280-322.
 27. Pastukh N, Peretz A, Brodsky D, Isakovich N, Azrad M, On A. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from children in Israel. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018;12(1):175-178.
 28. Vega A, Alarcón T, Domingo D, Martínez M, López-Brea M. Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults. *Revista española de quimioterapia*. 2016;16(1):53-57.
 29. Glupczynsky Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E Test for Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1991;29(9):2072-2075.
 30. Mahmoudi L, Sharifzadeh F, Mousavi S, Pourabbas B, Niknam R. Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test and Disk Diffusion for Metronidazole and Mutations in rdxA gene sequences of *Helicobacter pylori* strains. *Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2015;1(4):235-242.
 31. Ogata S, Gales A, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(4):1439-1448.
 32. Howden C, Hunt R. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998;93(12):2330-2338.
 33. López-Góngora S, Puig I, Calvet X, Villoria A, Baylina M, Muñoz N et al. Systematic review and meta-analysis: susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(9):2447-2455. DOI:10.1093/jac/dkv155 Advance.
 34. Hu Y, Zhu Y, Lu N. Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.
 35. Smith S, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World Journal of Gastroenterology [Internet]*. 2014;20(29):9912-9921. Available from: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9912>

36. Selgrad M, Tammer I, Langner C, Bornschein J, Meible J, Kandulski A et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2014;20(43):16245-16251. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i43/16245.htm>
37. Chen D, Cunningham S, Cole N, Kohner P, Mandrekar J, Patel R. Phenotypic and Molecular Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017;61(4).
38. Biggerstaff BJ. (2015). Comparing diagnostic tests: a simple graphic using like likelihood ratios. Stat Med; 19 (5): 649-663.
39. Mahmoudi, L., Sharifzadeh, F., Mousavi, S., Pourabbas B., & Niknam R. (2015). Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test and Disk Diffusion for Metronidazole and Mutations in rdxA gene sequences of *Helicobacter pylori* strains. Trends in Pharmaceutical Sciences, 1(4). 235-242.
40. Ayala G. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2014;20(6):1450-1469. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i6/1450>.
41. Lopes A, Vale F, Oleastro M. *Helicobacter pylori* infection -recent developments in diagnosis. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2014 [cited November 2018];20(28):9299-9313. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i28/9299.htm>
42. Testerman T, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2014;20(36):12781-12808. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i36/12781.htm>
43. Selgrad, M., Tammer, I., Langner, C., Bornschein, J., Meißle, J., Kandulski, A., Varbanova, M., Wex, T., Schlüter, D., & Malfertheiner, P. (2014). Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology, 20(43), 16245-16251. Disponible en: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i43/16245.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16245>
44. Wang, Y., Kuo, F., Liu, C., Wu, M., Shih, H., Wang, S., Wu, J., Kuo, C., Huang, Y., & Wu, D. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World Journal of Gastroenterology, 21(40), 11221-11235, Available from: URL:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i40/11221.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>
45. Malaty HM. (2017) Epidemiology of *Helicobacter pylori*. Best Pract Res Clin Gastroenterol;21:205-214.
46. Glocker E. The Need for Resistance Surveillance and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. Digestion. 2015;92(3):173-174.
47. McMahon B, Bruce M, Koch A, Goodman K, Tsukanov V, Mulvad G et al. The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. Epidemiology and Infection. 2015;144(02):225-233.
48. Patel S, Pratap C, Jain A, Gulati A, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?. World Journal of Gastroenterology. 2014;20 (36):12847-12859. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i36/12847.htm>.

49. Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz E. Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2017;23(16):2854-2869. Available from: <http://www.wjg-net.com/1007-9327/full/v23/i16/2854.htm>
50. Draeger S, Wüppenhorst N, Kist M, Glocker E. Outcome of second- and third-line *Helicobacter pylori* eradication therapies based on antimicrobial susceptibility testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015;70(11):3141-3145.
51. Cheng A, Sheng W, Liou J, Wang H, Wu M, Lin J et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibility and synergistic activity of antimicrobial combinations against *Helicobacter pylori* isolates in Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2015;48(1):72-79.