



Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori*
a los antimicrobianos e implicaciones en las
terapias de erradicación

Alba Alicia Trespacios Rangel
2011

Imagen de la portada tomada de:

http://2.bp.blogspot.com/_7enbddCH32E/S8k1ReV9DxI/AAAAAAAAAEg/ec5gC6_4548/s1600/helicobacter_eng20copy%5B1%5D.jpg. Tomado el 11 de junio de 2011. 3:23 p.m. Imagen con autorización para ser copiada.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación

ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL
TESIS DOCTORAL

Presentado como requisito parcial para otorgar el título de:
Doctor en Ciencias Biológicas

BOGOTÁ D.C; 2011

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946.

Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación

ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL

APROBADO



Dr. Jorge Eduardo Caminos. PhD
Director



Dr. William Otero Regino. MD.
Codirector




Dr. Mauricio Corredor. PhD
Jurado



Dr. José Antonio Costoya. MD. PhD
Jurado



Dr. Hugo Diez Ortega. PhD
Jurado



Dr. Luis Alberto Gómez. PhD
Jurado



Dr. Óscar Oliveros Garay. PhD
Jurado

Dra. Ingrid Schuler, Biol. PhD
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dr. Manuel Antonio Franco, MD, PhD
Director de Postgrado
Facultad de Ciencias

Contenido

| | | |
|--|--|-----|
| Introducción | | 1 |
| Objetivos | | 11 |
| Capítulo 1 | Marco teórico. | 15 |
| Capítulo 2 | Resistencia de <i>H. pylori</i> a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. | 48 |
| Capítulo 3 | Mutaciones en los genes 23S rRNA y <i>gyrA</i> relacionadas con resistencia de <i>H. pylori</i> a levofloxacina y claritromicina | 50 |
| Capítulo 4 | Detección de resistencia a claritromicina y levofloxacina por ASP-PCR | 89 |
| Capítulo 5 | Determinación de la eficacia de la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacina. | 137 |
| Anexo 1 | Consentimiento informado | 174 |
| Conclusiones | | 176 |
| Lista de publicaciones y presentaciones en congresos | | 179 |
| Abreviaturas | | 183 |

Introducción y planteamiento del problema

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos con el cual la humanidad, ha mantenido una estrecha relación desde hace aproximadamente 58000 años, mucho antes de que se iniciaran las migraciones humanas desde el África oriental, con las cuales este microorganismo fue diseminado hacia otras regiones del mundo (Falush et al., 2003). *H. pylori* afecta a cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (Goodwin et al., 1985). (Malaty, 2007). En países en vía de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con 20 a 50% en países desarrollados (Suerbaum & Michetti, 2002). En Colombia más del 80% de las personas mayores de 30 años están infectadas por *H. pylori* (Sierra et al., 1990) y por lo menos el 50% de los niños a la edad de 10 años (Rincón et al., 1999). Se adquiere en la infancia y si no se elimina con antimicrobianos, persiste durante la vida del individuo (Saad & Chey, 2005). En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica. Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-3% de tener cáncer gástrico (Parsonnet, 1998). Un porcentaje menor (1%) podrá presentar dispepsia y 1/100.000 linfomas MALT. Teniendo en cuenta la probabilidad de desencadenar una enfermedad clínica en por lo menos el 20% de los infectados, se considera que la infección debe ser tratada con antimicrobianos, cada vez que sea diagnosticada (Rimbara et al., 2011).

En el tratamiento de la infección tradicionalmente se han utilizado terapias empíricas con antimicrobianos, que rara vez han sido evaluados antes del

Introducción y planteamiento del problema

tratamiento mediante pruebas de susceptibilidad (Graham & Fischbach, 2010; Rimbara *et al.*, 2011). No obstante la pérdida progresiva de eficacia, a nivel mundial en la actualidad el tratamiento de primera línea para erradicar la infección es la terapia triple durante 10-14 días que consiste de un inhibidor de bomba de protones (IBP) dos veces al día, amoxicilina 1 gramo dos veces al día y claritromicina 500 mg dos veces al día o metronidazol 500 mg tres veces al día (Chey & Wong, 2007; Fock *et al.*, 2009; Malfertheiner *et al.*, 2007; Rokkas *et al.*, 2008). Las causas identificadas que explican la pérdida de la eficacia de este esquema incluyen duración del tratamiento, rápida metabolización del IBP debido a polimorfismos del sistema enzimático CYP2C19 que conlleva a deficiente inhibición de la secreción de ácido y como consecuencia de esta, disminución en la eficacia de los antibióticos, pero lo más importante es el progresivo aumento de la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos (Graham *et al.*, 2008; Graham & Fischbach, 2010; Malfertheiner *et al.*, 2007; Rimbara *et al.*, 2011). Por lo anterior, se ha recomendado que esta terapia triple no se utilice como esquema de primera línea si la resistencia a la claritromicina es mayor del 15% y en el caso de metronidazol, si es mayor del 40% (Malfertheiner *et al.*, 2007). No obstante esta recomendación general, los expertos coinciden en que lo más importante es que en cada lugar, se investiguen las terapias que sean eficaces para esas poblaciones específicas fundamentados en datos regionales de susceptibilidad a los antimicrobianos disponibles a nivel local (Rimbara *et al.* 2011, Graham 2010). Sin embargo estas importantes recomendaciones no pueden seguirse en países subdesarrollados como Colombia debido a que no se conocen de manera definitiva las prevalencias de resistencia primaria del microorganismo a los

diferentes antibióticos que empíricamente se utilizan (Otero *et al.*, 2009) y adicionalmente no se realizan pruebas para verificar la erradicación de infección luego de 4 – 6 semanas de finalizado el tratamiento como es la recomendación universalmente aceptada (Carreño *et al.*, 2009; Graham & Fischbach, 2010; Malfertheiner *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2009). Por lo anterior en nuestro país son pocos, los estudios sobre resistencia de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos. Teniendo en cuenta la importancia de esta información esta tesis como parte del estudio global sobre tratamiento de *H. pylori*, investigó la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos y encontró que la resistencia a metronidazol era del 81%, a claritromicina del 17% y a amoxicilina 3.8% (Trespalcios *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta esta alta tasa de resistencia a los principales antibióticos utilizados para erradicar *H. pylori*, planteamos la necesidad de investigar con prioridad nuevos esquemas de tratamiento para la erradicación de esta infección en Colombia. Nuestros resultados en metronidazol y claritromicina, coincidieron con los de Henao *et al.* (Henao *et al.*, 2009b) (Henao *et al.*, 2009a) y difirieron con un estudio realizado en el sur del país con respecto a claritromicina (3.8%) pero similar con respecto a metronidazol (82%) (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b). El análisis de la resistencia a claritromicina en este mismo estudio encontró un tipo de mutación relacionada con resistencia, la mutación A2143G (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b). Teniendo en cuenta la alta resistencia a claritromicina y a metronidazol a nivel mundial, hay consenso en que la terapia triple debe ser re-evaluada y el reto actual sería mantener la claritromicina en esquemas modificados o conseguir un antimicrobiano que la reemplace entre los antimicrobianos actualmente

Introducción y planteamiento del problema

disponibles. Con respecto a la primera opción, se ha desarrollado la terapia secuencial, que consiste en la administración de un IBP durante 10 días acompañado de amoxicilina 1 gramo dos veces al día en los primeros cinco días y en los últimos cinco días por claritromicina 500 mg dos veces al día mas tinidazol 500 mg dos veces al día(Graham & Fischbach, 2010; Graham & Rimbara, 2011; Otero *et al.*, 2009; Zullo *et al.*, 2007). Esta terapia desarrollada en Italia, ha sido evaluada en diversas partes del mundo y ha demostrado superioridad a la terapia triple estándar discutida (Gatta *et al.*, 2009). Otras alternativas son la terapia cuádruple y una terapia triple que reemplaza a la claritromicina por levofloxacina. La primera consiste en IBP mas subcitrato de bismuto, metronidazol y tetraciclina, la cual de manera similar ha demostrado superioridad a la terapia triple estándar (Graham *et al.*, 2008; Graham & Fischbach, 2010; Graham & Rimbara, 2011; Otero *et al.*, 2009). El segundo esquema utiliza levofloxacina 500 mg una vez o dos veces al día en reemplazo de la claritromicina y manteniendo el IBP y la amoxicilina en las mismas dosis previas (Graham & Fischbach, 2010; Malfertheiner *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2009). Esta terapia con levofloxacina ha demostrado superioridad a la terapia triple tanto en esquemas de primera línea como en terapias de rescate de segunda y tercera línea con eficacias promedios de 90%, 80% y 60-70% respectivamente(Otero *et al.*, 2009). Recientemente se comparó la triple terapia con levofloxacina versus la triple terapia estándar con claritromicina y se ratificó la superioridad de la primera (87.4% versus 80.1%) (Liou *et al.*, 2010). Otros antibióticos emergentes en estudio que han sido incorporados a la triple terapia en reemplazo de la claritromicina y el metronidazol son la rifabutina y la ofoxacina otra quinolona (Graham & Fischbach, 2010; Rimbara *et*

al., 2011). Teniendo en cuenta que en las últimas dos décadas no se han realizado estudios con la triple terapia estándar (IBP, claritromicina mas amoxicilina) para determinar la tasa de éxito en Colombia, ni se ha evaluado si la mayor eficacia atribuida a la terapia triple que utiliza levofloxacin en reemplazo de la claritromicina son ciertas, ni se ha estudiado el impacto que tiene la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos en el desempeño de las mismas, se decidió llevar a cabo este trabajo, que por medio de un ensayo clínico comparó estas dos terapias. De igual manera, en nuestro país hasta el momento no se han realizado estudios para determinar la tasa de resistencia a la levofloxacin, por lo cual haciendo parte de este estudio global de investigación sobre terapias contra *H. pylori*, se decidió llevar a cabo un estudio sobre la prevalencia de la resistencia a este antimicrobiano. Se decidió no realizar estudios sobre terapia secuencial dado que en nuestro país hay alta resistencia a claritromicina y a metronidazol, los cuales son los antibióticos utilizados en la segunda fase de esta terapia.

Los expertos consideran en la actualidad que la infección por *H. pylori*, debe ser manejada como cualquier otra enfermedad infecciosa y por lo tanto el estándar actual es que en los ensayos clínicos sobre tratamientos de erradicación de esta infección, se realicen pruebas de susceptibilidad antes de iniciar el tratamiento y de esta manera poder determinar la epidemiología local sobre resistencia antimicrobiana y además en casos de fracasos terapéuticos con los tratamientos de primera línea, se tenga la opción de instaurar un segundo esquema con base en los estudios de susceptibilidad mencionados (Graham 2008, Graham 2010, Rimbara 2010). Otra recomendación prioritaria es verificar rutinariamente la erradicación de la infección, 4 – 6 semanas luego de terminado el tratamiento, por

técnicas no invasivas como el test del aliento con urea marcada (UBT) o detección de antígenos de *H. pylori* en materia fecal, para identificar si los pacientes continúan infectados o si lograron curarse (Malfertheiner *et al.*, 2007). Estas técnicas infortunadamente tampoco se realizan de manera rutinaria en Colombia y la prueba de antígenos fecales con anticuerpos monoclonales no esta disponible en el momento. Otro aspecto de gran relevancia con respecto al tratamiento y resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos, es el desarrollo de pruebas moleculares que permitan de una manera fácil y rápida, la detección mutaciones en biopsias gástricas (Cambau *et al.*, 2009; Furuta *et al.*, 2007). Considerando la alta prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia, así como la poca investigación sobre terapias de erradicación y de resistencia del microorganismo a los diferentes antibióticos, esta tesis está específicamente enfocada a responder las siguientes preguntas relacionadas con el manejo terapéutico de *H. pylori* en Colombia:

- A. Cuál es la prevalencia de resistencia primaria de *Helicobacter pylori* a claritomicina, amoxicilina, metronidazol y levofloxacin?
- B. Cuales son los mecanismos moleculares de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos utilizados en la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacin?
- C. Cual es la eficacia de la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacin?
- D. Es posible implementar pruebas para la detección molecular de la resistencia en biopsias de pacientes infectados?

Referencias

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinos, E., Martinez, J. W. & Beltran, L. (2009a). [Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia]. *Rev Med Chil* **137**, 1309-1314.

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F. & Reinos, E. (2009b). Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4022-4024.

Cambau, E., Allerheiligen, V., Coulon, C., Corbel, C., Lascols, C., Deforges, L., Soussy, C. J., Delchier, J. C. & Megraud, F. (2009). Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **47**, 3600-3607.

Carreño, Y., Mercado, M. M., Trespalacios, A. A. & Otero, W. (2009). Comparación de la prueba de antígenos fecales (ELISA) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* **24**, 373 - 381.

Chey, W. D. & Wong, B. C. (2007). American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* **102**, 1808-1825.

Falush, D., Wirth, T., Linz, B. & other authors (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**, 1582-1585.

Fock, K. M., Katelaris, P., Sugano, K. & other authors (2009). Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1587-1600.

Furuta, T., Soya, Y., Sugimoto, M. & other authors (2007). Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *J Gastroenterol Hepatol* **22**, 1810-1815.

Gatta, L., Vakil, N., Leandro, G., Di Mario, F. & Vaira, D. (2009). Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in adults and children. *Am J Gastroenterol* **104**, 3069-3079; quiz 1080.

Goodwin, C. S., Blincow, E. D., Warren, J. R., Waters, T. E., Sanderson, C. R. & Easton, L. (1985). Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol* **38**, 1127-1131.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. *Drugs* **68**, 725-736.

Graham, D. Y. & Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* **59**, 1143-1153.

Introducción y planteamiento del problema

Graham, D. Y. & Rimbara, E. (2011). Understanding and appreciating sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol* **45**, 309-313.

Henao, S. C., Otero, W., Angel, L. A. & Martinez, J. D. (2009a). Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. *Rev Col Gastroenterol* **24**, 10 - 16.

Henao, S. C., Quiroga, A., Martinez, J. D. & Otero, W. (2009b). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* **24** 110 -114.

Liou, J. M., Lin, J. T., Chang, C. Y. & other authors (2010). Levofloxacin-based and clarithromycin-based triple therapies as first-line and second-line treatments for *Helicobacter pylori* infection: a randomised comparative trial with crossover design. *Gut* **59**, 572-578.

Malaty, H. M. (2007). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**, 205-214.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. & other authors (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781.

Otero, W., Trespacios, A. A. & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. *Rev Col Gastroenterol* **24**, 279 - 292.

Parsonnet, J. (1998). *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut* **43 Suppl 1**, S6-9.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 79-88.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 79-88.

Rincón, F., Otero, W., Gutierrez, O. & al., e. (1999). Prevalencia de la infección por *H. pylori* en niños entre 4 y 15 años de edad y su relación con sintomatología gastrointestinal (Abstract). *Rev Col Gastroenterol* **XV**, 200.

Rokkas, T., Sechopoulos, P., Robotis, I., Margantinis, G. & Pistiolas, D. (2008). Cumulative *H. pylori* Eradication Rates in Clinical Practice by Adopting First- and Second-Line Regimens Proposed by the Maastricht III Consensus and a Third-Line Empirical Regimen. *Am J Gastroenterol*.

Saad, R. & Chey, W. D. (2005). A clinician's guide to managing *Helicobacter pylori* infection. *Cleve Clin J Med* **72**, 109-110, 112-103, 117-108 passim.

Sierra, F., Gutierrez, O. & Otero, O. (1990). *Campylobacter pylori* en úlcera duodenal, gastritis crónica y dispepsia no ulcerosa. *Acta Med Colomb* **15**, 74 - 83.

Suerbaum, S. & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**, 1175-1186.

Introducción y planteamiento del problema

Trespalacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* **21**, 31 - 38.

Zullo, A., De Francesco, V., Hassan, C., Morini, S. & Vaira, D. (2007). The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis. *Gut* **56**, 1353-1357.

Objetivos

Objetivos

1. Describir la prevalencia de resistencia primaria de *H. pylori* a los antimicrobianos y su relación con los factores de virulencia.
2. Analizar las mutaciones asociadas con resistencia a claritromicina y levofloxacina en los genes 23S rRNA y *gyrA* en aislamientos de *H. pylori*.
3. Estandarizar una prueba rápida para la detección de mutaciones relacionadas con resistencia de *H. pylori* a levofloxacina y claritromicina.
4. Determinar la eficacia de la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacina en población en la Bogotá - Colombia.

De acuerdo a los objetivos propuestos, la tesis está dividida en 5 capítulos para su mejor comprensión:

Capítulo 1. Marco teórico.

En este capítulo se describen las características microbiológicas de *H. pylori*, los factores de virulencia más importantes, los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y las terapias actuales para erradicar la infección, estas últimas se amplían en el artículo de revisión:

- Otero, W., Trespalacios, A. A. & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. *Rev Col Gastroenterol* 24, 279 - 292.

Capítulo 2. Resistencia de *H. pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos.

Se presentan los resultados de investigación de la prevalencia de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos utilizados en las terapias triples de erradicación de la infección; metronidazol, amoxicilina y claritromicina. Se analiza la relación que pueden tener los factores de virulencia *cagA* y *vacA* con el fenotipo de susceptibilidad a cada antimicrobiano. Los resultados se presentan en el artículo:

- Trespacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* 21, 31 - 38.

Capítulo 3. Mutaciones en los genes 23S rRNA y *gyrA* relacionadas con resistencia de *H. pylori* a levofloxacina y claritromicina. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio de mutaciones en los genes 23S rRNA y *gyrA* relacionados con resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina. El manuscrito de resistencia de *H. pylori* a levofloxacina se encuentra escrito en inglés, ya que este manuscrito se encuentra en revisión por parte de los autores, para luego ser sometido a publicación en una revista internacional. Adicionalmente, se incluye un artículo publicado en la revista *Helicobacter* en donde se optimizó el cultivo líquido del microorganismo para obtener una mayor biomasa del microorganismo que pueda ser utilizada para realizar pruebas de susceptibilidad y extracción de DNA.

- Duque-Jamaica, R., Arevalo-Galvis, A., Poutou-Pinales, R. A. & Trespalacios, A. A. 2010. Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 15, 303-312.

Capítulo 4. Detección de resistencia a claritromicina y levofloxacin por ASP-PCR.

Describe la estandarización de dos pruebas de ASP-PCR para la detección de mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina y levofloxacin en biopsias gástricas. Los resultados se presentan en dos manuscritos en inglés. Uno de ellos fue sometido y aprobado para publicación y el otro es un manuscrito que actualmente se encuentra en revisión por los autores. Los manuscritos que contiene este capítulo son:

- Detection of clarithromycin and levofloxacin resistant *Helicobacter pylori* in gastric biopsies from Colombia: Improvement of allele-specific PCR assay for *gryA* mutation. *En revision por los autores.*
- Detection of clarithromycin resistance in *H. pylori* following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days. LI, Yuan; Rimbara, Emiko; Thirumurthi, Selvi; Trespalacios, Alba; Reddy, Rita; Attumi, Taraq; Sabounchi, Saman; Graham, David Y. Aceptado para publicación en el Journal of Digestive Diseases.

Capítulo 5. Determinación de la eficacia de la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacin.

Objetivos

En este capítulo se presentan los resultados de la eficacia de la terapia triple clásica y la terapia triple con levofloxacin en población de la ciudad de Bogotá – Colombia. Se presentan tres revisiones sistemáticas de la literatura que se condujeron para aclarar problemas que actualmente se enfrentan en Colombia con respecto a la selección de la mejor prueba para determinar de la susceptibilidad de la bacteria a los antimicrobianos y a la selección de la mejor prueba para verificar la erradicación de la infección. Estas revisiones sistemáticas de la literatura, sirvieron de guía para seleccionar la prueba para evaluar el desenlace del ensayo clínico y para seleccionar la metodología para evaluar la susceptibilidad de los aislamientos a los antimicrobianos. Los artículos que se incluyen en este capítulo son:

- Avila, J. M., Rey, M., Mercado, M. M., Villamizar, O. R., Otero, W. & Trespalacios, A. A. (2009). Comparación de las pruebas de dilución en agar y PCR para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Revisión Sistemática de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* 24, 116 - 127.
- Carreño, Y., Mercado, M. M., Trespalacios, A. A. & Otero, W. (2009). Comparación de la prueba de antígenos fecales (ELISA) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* 24, 373 - 381.
- Rey, M., Avila J.M., Trespalacios, A.A., Villamizar, O.R., Otero, W., Mercado, M.M. Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. *NOVA*. 6, 219 – 229.

Marco teórico

1.1 Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria en forma de espiral, Gram-negativa, considerada inicialmente como miembro del género *Campylobacter* (*Campylobacter pyloridis*), sin embargo, fue agrupada en un género separado (*Helicobacter*) por Goodwin en 1989 (Goodwin *et al.*, 1985; Goodwin & Armstrong, 1990). Algunas especies del género *Helicobacter* han sido encontradas viviendo en el revestimiento del tracto gastrointestinal superior, así como el hígado de los mamíferos y algunas aves. La más conocida especie de este género es *Helicobacter pylori* (Goodwin & Armstrong, 1990; Goodwin *et al.*, 1990).

La bacteria fue descrita en 1982 por los australianos Robin Warren y Barry J. Marshall, quienes fueron los primeros en llevar a cabo el cultivo in vitro del organismo (Marshall & Warren, 1984). Posteriormente, informó que la mayoría de úlceras pépticas y la gastritis eran causadas por la bacteria (Marshall *et al.*, 1985). La comunidad médica tardó en reconocer el papel de esta bacteria en las enfermedades gastroduodenales; para lograr demostrar que la bacteria era la causa de estas enfermedades, Marshall tomó una suspensión de la bacteria desarrollando gastritis aguda, luego recuperó la bacteria de su mucosa gástrica y finalmente erradicó la infección con una terapia dual de sales de bismuto y metronidazol durante catorce días, comprobando de esta manera los postulados de Koch en la infección (Marshall *et al.*, 1985; Marshall *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 1989). En reconocimiento de este importante descubrimiento, Marshall y Warren

fueron galardonados en el año 2005 con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología (Kleibeuker & Thijs, 2005; Van Der Weyden *et al.*, 2005).

1.2 Microbiología

H. pylori, pertenece al género *Helicobacter*, subdivisión *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. La familia también incluye los géneros *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. El género *Helicobacter* ha sido dividido en dos linajes, las especies gástricas y las especies enterohepáticas. Ambos grupos demuestran un alto nivel de órgano especificidad, de tal manera que las especies gástricas no pueden colonizar el intestino o el hígado, o viceversa. Las especies gástricas se han adaptado a las condiciones inhóspitas que existen en la superficie de la mucosa gástrica. Todas las especies gástricas de *Helicobacter* son ureasa positiva y móviles por la presencia de flagelos. La producción de ureasa es la responsable de la neutralización del pH ácido gástrico y los flagelos le otorgan una rápida movilidad que le permite alcanzar rápidamente un pH mas cercano a la neutralidad, estos factores son prerequisites para la colonización de la mucosa gástrica, adicionalmente estas bacterias poseen una forma en espiral que junto a la movilidad ejecutada por los flagelos le permiten penetrar la capa viscosa de moco, donde las condiciones permiten el desarrollo del microorganismo (Dunn *et al.*, 1997a; Dunn *et al.*, 1997b; Goodwin & Armstrong, 1990; Kusters *et al.*, 2006; Marshall & Warren, 1984)

H. pylori es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas gastroduodenales y adenocarcinoma gástrico (Rimbara *et al.*, 2011). Así mismo, produce linfomas MALT gástricos (Kusters *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 1990), anemia ferropénica (Malfertheiner *et al.*, 2007) y se considera relacionado por lo menos con el 50% de los casos púrpura trombocitopénica inmune (9) (Graham & Fischbach, 2010) En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica. Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-2% de tener cáncer gástrico (Parsonnet, 1998). Un porcentaje menor (1%) podrá presentar dispepsia y 1/100.000 linfoma de células T asociado a mucosa (Linfoma MALT)(Pervez *et al.*, 2011) Además de las enfermedades de ubicación gastroduodenal, *H. pylori* se ha relacionado con dos enfermedades extragástricas, con las cuales hay evidencia convincente para la asociación causal: anemia por deficiencia de hierro (ADH) y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI)(Malfertheiner & Selgrad, 2010).

1.2.1 Morfología y requerimientos de crecimiento

H. pylori es una bacteria Gram negativa, mide de 2 – 4 μm de largo y 0,5 – 1 μm de ancho. Aunque habitualmente tiene forma espiralada, la bacteria puede verse bacilar o incluso en forma de coco cuando las condiciones nutricionales son adversas o cuando es puesta en contacto con antibióticos. Estas formas suelen aparecer en cultivos viejos y pierden la capacidad de crecer en medios de cultivo, es decir representan un estado viable no cultivable de la bacteria. El

microorganismo tiene 2 – 6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de largo, que posee una forma de bulbo en el extremo. A diferencia de otros patógenos del tracto gastrointestinal, este carece de adhesinas fimbriales (Kusters *et al.*, 2006). Para el aislamiento primario de esta bacteria se deben usar medios enriquecidos ya que es un microorganismo nutricionalmente exigente, frecuentemente requiere medios suplementados con sangre o suero, estos suplementos actúan como fuentes adicionales de nutrientes y lo protegen del efecto tóxico de los ácidos grasos de cadena larga. El efecto de estos ácidos grasos también puede ser evitado por la adición de suplementos como β -ciclodextrina, IsoVitalax o por la adición de carbón activado al medio de cultivo. Los medios mas utilizados son el agar Colombia o el agar Brucella suplementados con sangre de caballo o suero fetal bovino. Para el aislamiento primario es recomendable adicionar mezclas de antibióticos como suplemento de Dent, que contiene vancomicina, trimetropin, polimixina B y anfotericina B. *H. pylori* para su desarrollo requiere una atmósfera de microaerofilia (O_2 2–8%, N 85% y CO_2 5–10%), pH neutro, una temperatura promedio de 37°C y 4 a 7 días para permitir su crecimiento. Las colonias son pequeñas con un diámetro aproximado de 1 – 2 mm, traslúcidas, cremosas y ligeramente brillantes; una vez en cultivo alcanza la fase estacionaria, rápidamente hay cambio a formas cocoides (Kusters *et al.*, 2006; Perez-Perez, 2000).

1.3 Genoma y diversidad genética

Tomb y cols, secuenciaron el genoma completo de *H. pylori* en 1997, su tamaño es de 1.7 Mb (Tomb *et al.*, 1997), lo cual indica que ésta bacteria es un organismo simple que posee un genoma de tan solo la mitad del tamaño de otras bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, esto muestra que *H. pylori* no necesita un gran número de genes porque la mucosa gástrica es un tejido constante y esto representa poca competencia por parte de otras bacterias (Marshall, 2003). Solo el 23% de los genes de *H. pylori* pertenecen exclusivamente a éste género, los restantes son encontrados en otras formas de vida, entonces se asume que solo el 23% de los genes son utilizados para sobrevivir en el estómago (Alm & Trust, 1999). Otros dos genomas de *H. pylori* han sido secuenciados la cepa J99 y la cepa ChAG HPAG1. Los tres genomas tienen un tamaño aproximado de 1,7 Mbp (1,6697,867 bp, para la cepa 26695 y 1,643,831 bp para la cepa J99) con un contenido de G+C entre el 35% y 40%. La cepa 26695 incluye 1587 genes, la cepa J99, 1491 genes y la cepa ChAG HPAG1, 1536 genes.

Sobre la base de esta diversidad, es posible tipificar el microorganismo por métodos como análisis de endonucleasas de restricción, PCR y RFLP (Alm *et al.*, 1999; Alm & Trust, 1999). Las cepas de *H. pylori* contienen dos copias de los genes 16S, 23S y 5S rRNA. Muchas cepas portan uno o más plásmidos crípticos, en los cuales nunca se ha podido demostrado que porten genes de virulencia o de resistencia a los antibióticos (Heuermann & Haas, 1995).

El 89% de los marcos de lectura abiertos (ORF) entre las cepas 26695 y J99 son comunes en ambas cepas, confirmando que *H. pylori* es una sola especie. Adicionalmente, una región que contiene el 45% de los ORF específicos de cepa, terminan en una zona de plasticidad, lo que confirma la variabilidad entre cepas. Frecuentes alteraciones de nucleótidos en la tercera posición de las tripletas de los codones y varias copias de elementos de inserción contribuyen al polimorfismo encontrado en los genomas secuenciados (Ge & Taylor, 1999).

En contraste con otros microorganismos que son altamente clonales como por ejemplo *Shigella dysenteriae* y *Mycobacterium tuberculosis*; *H. pylori* es genéticamente heterogéneo, sugiriendo una carencia de clonalidad. Se ha demostrado que todos los individuos positivos para *H. pylori* llevan una cepa distinta, aunque las diferencias entre ellas es pequeña. La heterogeneidad genética del microorganismo es posiblemente una adaptación a las condiciones gástricas de su huésped, como también a los distintos patrones de respuesta inmune mediada por el huésped frente a la infección. La heterogeneidad genética ocurre a través de varios procesos de reordenamiento del DNA y a la introducción y delección de secuencias foráneas, esta heterogeneidad se relaciona con la plasticidad del islote de patogenicidad sugiriendo que esta variabilidad tiene un papel en la patogénesis de la infección por *H. pylori* (Ando *et al.*, 2010; Chanto *et al.*, 2002; Ge & Taylor, 1999; Marais *et al.*, 1999; Occhialini *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003).

1.4 Factores de virulencia y patologías asociadas

Aunque la infección por *H. pylori* siempre resulta en gastritis crónica activa, muchos de los pacientes infectados no desarrollan ninguna otra complicación y están libres de cualquier síntoma clínico de la infección. Esto lleva a pensar que algunas cepas pueden ser más virulentas que otras. Los factores de virulencia son los encargados de los tres efectos patogénicos más importantes de *H. pylori*, inflamación gástrica, disrupción de las barreras de la mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica (Dunn *et al.*, 1997a). La entrada de *H. pylori* al organismo desencadena siempre una gastritis superficial, que se caracteriza por tener infiltraciones de células polimorfonucleares y mononucleares (Eaton *et al.*, 1997), además *H. pylori* es también capaz de causar daño e inflamación en la mucosa por el amonio producido por la ureasa y por la producción de otras enzimas capaces de lesionar las células gástricas e indirectamente por la respuesta inmune local y sistémica del hospedero (Eaton *et al.*, 1991) (Yamaoka *et al.*, 1999). Por otra parte los lipopolisacáridos (LPS) de la bacteria se encuentran implicados en la pérdida de la integridad de la mucosa por ruptura de la cubierta de mucus gástrico interfiriendo entre la mucina y el receptor en la mucosa promoviendo procesos inflamatorios; otro factor importante que contribuye a la inflamación es la proteína activadora de neutrófilos (NAP), es producida por todas las cepas de *H. pylori* y es capaz de promover la adhesión de neutrófilos y monocitos a las células (Dundon *et al.*, 2001a; Dundon *et al.*, 2001b; Dundon *et al.*, 2001c; Montemurro *et al.*, 2001). En cuanto a la alteración de la fisiología gástrica, la infección por *H. pylori* induce la expresión de un péptido que estimula la producción de ácido, “la

gastrina”, y suprime la expresión de la somatostatina, una hormona inhibitoria de ácido. Estos efectos pueden no ser causados directamente por *H. pylori* pero pueden estar relacionados con la inflamación gástrica presente (Dunn *et al.*, 1997a). La disrupción de las barreras de la mucosa gástrica hace referencia más exactamente al daño concreto que puede ejercer la bacteria sobre la mucosa gástrica, y en cuanto a esto, los más poderosos inductores de daño tisular son las toxinas producidas por la bacteria, entre ellas las toxinas CagA y VacA.

1.4.1 Toxina CagA

CagA es uno de los factores de virulencia mas ampliamente estudiados en *H. pylori*. Es codificada por el gen *cagA*, localizado en un extremo del islote de patogenicidad *cag* (PAI); este es un segmento de DNA de aproximadamente 40 pares de kilobases que fue incorporada al genoma de *H. pylori* por transferencia horizontal de un origen desconocido. Contiene 31 genes, muchos de los cuales codifican para un sistema de secreción tipo IV (T4SS), que actúa como una jeringa molecular para liberar en la célula huésped la proteína CagA, peptidoglicano y probablemente otras proteínas bacterianas en el interior de las células eucariotas (Wen & Moss, 2009). CagA es una proteína de 121 a 145 kDa inmunodominante, con actividad toxica para la célula de la mucosa gástrica. La presencia de CagA normalmente se utiliza como un marcador de la presencia de la región *cag* (PAI) en estudios epidemiológicos (Queiroz *et al.*, 2010).

Las cepas CagA positivas estimulan una mayor producción de citocinas proinflamatorias en la mucosa gástrica y en algunas poblaciones las infecciones con tales cepas se han asociado al desarrollo de enfermedad úlcero-péptica y atrofia gástrica, por ejemplo en poblaciones occidentales cepas CagA positivas están mas comúnmente asociadas con úlcera péptica, gastritis atrófica y adenocarcinoma gástrico; sin embargo, esta asociación no es observada en la mayoría de la población del este asiático, en donde todas las cepas son CagA positivas (Wen & Moss, 2009).

Para que la proteína CagA pueda ingresar en la célula epitelial de la mucosa gástrica, debe ser introducida a esta por medio del sistema de secreción tipo IV (T4SS). Los 18 genes que codifican para este sistema se encuentran ubicados en el islote de patogenicidad (*cag* PAI). El sistema es un organelo filamentoso que luego de que es ensamblado se localiza en un polo de la superficie bacteriana e interactúa específicamente con la integrina $\alpha 5\beta 1$, estableciendo un canal entre la bacteria y la célula que le permite a la primera inyectar diferentes proteínas bacterianas, entre ellas CagA (Arevalo *et al.*, 2009). La estructura del sistema de secreción tipo IV, es muy interesante, porque está perfectamente diseñado para proteger a las proteínas del pH ácido del estómago y para garantizar que la proteína sea inyectada en la célula blanco, el sistema inicia a conformarse en la membrana interna de la pared bacteriana, en donde se ancla la proteína CagE, otras proteínas de soporte y la proteína HP0523 que estabiliza la unión de estas proteínas y permite que múltiples unidades de proteína CagC empiecen a ensamblarse para dar origen al cilindro que en realidad es la jeringa

molecular del sistema de secreción tipo IV. Debido a que la proteína CagC es lábil al pH ácido del estómago, el cilindro hueco constituido por CagC es recubierto desde la membrana externa de la pared bacteriana por otra proteína denominada CagY, la cual hace del T4SS, uno de los sistemas moleculares más bellamente diseñados para el estómago de los humanos, ya que la proteína CagY confiere estabilidad al cilindro, no es alterada por el pH ácido del estómago y además no es reconocida por el sistema inmune. Al final del cilindro se ensambla la proteína CagL, que como se mencionó anteriormente es la encargada de establecer el contacto con la célula epitelial a través del reconocimiento de una integrina presente en la célula epitelial gástrica. Una vez que el contacto se establece se activa en el interior de la bacteria la entrega de la proteína efectora CagA, la cual se asocia en el protoplasma bacteriano con la proteína CagF, que actúa como chaperona y guía a CagA a través del sistema de secreción para que llegue al interior de la célula epitelial gástrica (Atherton & Blaser, 2009).

Una vez Cag A ingresa en la célula la proteína es fosforilada en uno o varios residuos de tirosina por miembros de la familia de quinasa SRC. La fosforilación del sitio con tirosina en CagA se caracteriza por la presencia de una secuencia única de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA). En las secuencias que flanquean los sitios EPIYA se han identificado cuatro diferentes segmentos, denominados A, B, C y D, cada uno de los cuales tiene un sitio EPIYA. Cepas aisladas en países occidentales (países europeos y los Estados Unidos) poseen la secuencia EPIYA-A y la secuencia EPIYA-B seguida del segmento EPIYA-C (tipo

A-B-C-CagA). La secuencia EPIYA-C tiene variación en el número de repeticiones de una a tres veces. El residuo de tirosina que forma parte del sitio EPIYA-C es el sitio en el cual hay mayor fosforilación en las cepas occidentales mientras que en los sitios de tirosina presentes en los segmentos EPIYA-A y EPIYA-B hay una fosforilación débil. La mayoría de las cepas de países como Japón, Corea, y China, también poseen los segmentos EPIYA-A y EPIYA-B pero no el segmento repetible EPIYA-C. Tienen una secuencia que contiene el sitio EPIYA diferente, denominado EPIYA-D el cuál es único para las cepas orientales. Entre las cepas occidentales el número de EPIYA se correlaciona directamente con los niveles de fosforilación de la tirosina y la unión SHP-2. Estos hallazgos sugieren que las cepas occidentales que poseen un mayor número de sitios EPIYA-C son biológicamente más activas que las que tienen un número menor de EPIYA-C. (Atherton *et al.*, 2001; Wen & Moss, 2009). CagA puede tener otros efectos más generales en la célula incluyendo la activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B también es estimulada por la presencia del propio T4SS a través del reconocimiento de pequeñas cantidades de productos bacterianos como peptidoglicanos que son reconocidas en el epitelio de la célula a través del receptor Nod1 (Atherton & Blaser, 2009; Queiroz *et al.*, 2010; Wen & Moss, 2009).

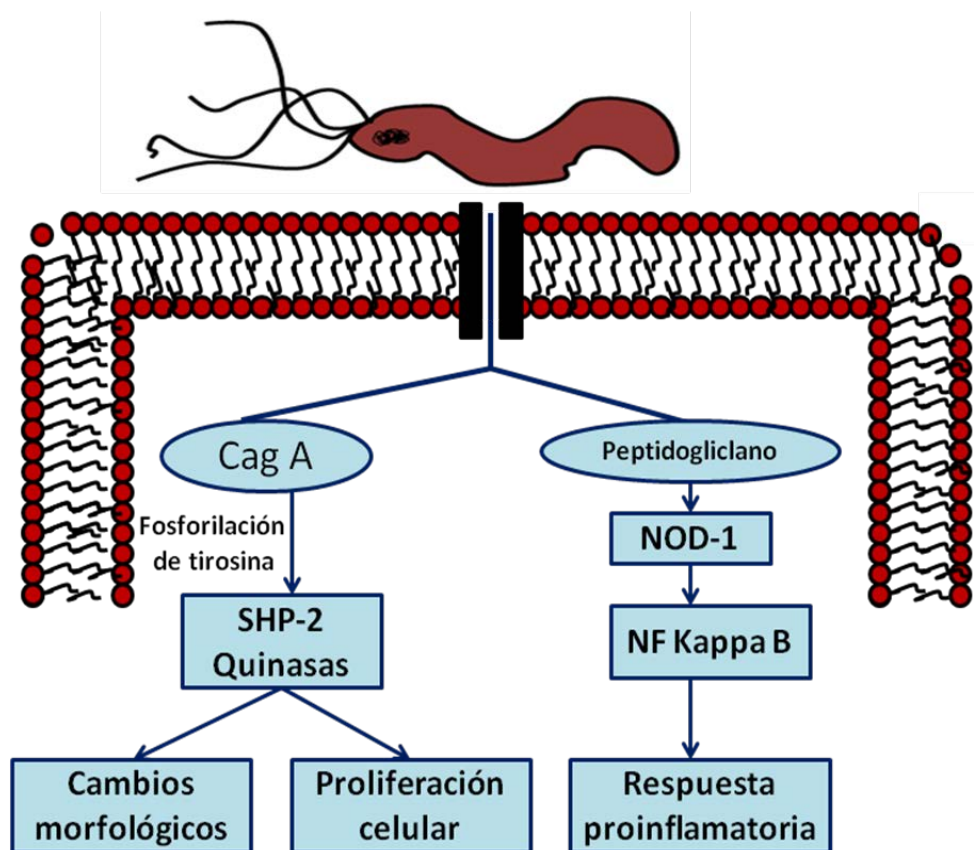


Figura 1. Efectos intracelulares de de CagA. Modificado de Gerrits. (Gerrits *et al.*, 2006)

1.4.2 Toxina VacA

Otro de los mas importantes factores de virulencia en *H. pylori* es la toxina VacA codificada por el gen *vacA*, que induce la formación de vacuolas en células epiteliales en cultivo. A diferencia de CagA, la proteína VacA está presente en todas las cepas de *H. pylori*. *vacA* codifica para una protoxina de ± 140 kDa que incluye una región amino terminal, denominada péptido señal y un domino carboxiterminal. La protoxina es hendida durante el proceso de secreción en monómeros de la toxina de un tamaño de 88 kDa, que comprende dos

subunidades, p33 y p55. La toxina madura es liberada como forma soluble al espacio extracelular, o algunas toxinas pueden ser retenidas en la superficie de la bacteria y allí agregarse en complejos oligoméricos que luego pueden insertarse en las capas bilipídicas de las células para formar canales selectivos de aniones (Wen *et al.*, 2004).

Después de entrar en contacto con la célula blanco, VacA genera una cascada de eventos que producen la formación de vacuolas en el citoplasma celular, daño de las mitocondrias e inhibición de la activación de células T. El gen *vacA* es altamente polimórfico y las principales variaciones ocurren en la región amino terminal del péptido señal maduro (s1a, s1b, s1c, s2), en la región intermedia (i) ubicada en una parte de la subunidad p33 (i1, i2) y la región media (m) ubicada en la subunidad p55, el dominio de unión a la célula (m1, m2a, m2b). La actividad de la toxina en la célula es alta en los genotipos s1/m1, baja en los genotipos s2/m2, moderada en los genotipos s1/m2 y ausente en los raros genotipos s2/m1. En este orden de ideas, los genotipos s1/m1 se encuentran más frecuentemente asociados con úlcera péptica y carcinoma gástrico. Se ha observado que existen diferencias en los niveles de expresión de la toxina en el tiempo debido a la rápida adaptación de la bacteria en el huésped, facilitando su persistencia. Esta adaptación resulta en alteración de la toxicidad y puede explicar en parte por qué en algunos casos las úlceras recrudescen y por qué en otros momentos mejoran (Aviles-Jimenez *et al.*, 2004; Falush *et al.*, 2003; Kuipers *et al.*, 2000). Adicionalmente; se ha encontrado asociación entre los genotipos s1/m1 con la región i1 y s2/m2 con i2, y la actividad tóxica de los genotipos s1/m2

depende de la región (i), será mas potente cuando porte el genotipo i1. Las cepas con genotipo i1 tienen un riesgo mayor a desarrollar cáncer gástrico y úlcera duodenal en población asiática, sin embargo esta asociación no existe en población China en donde la mayoría de los infectados tienen cepas s1i1m1 (De Gusmao *et al.*, 2000; Queiroz *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2003; Van Doorn *et al.*, 1999).

Se ha reportado que VacA produce múltiples alteraciones estructurales y funcionales en las células epiteliales. VacA interrumpe la maduración de los endosomas produciendo la formación de vacuolas, rompe las uniones intercelulares, induce daños mitocondriales, liberación de citocromo c y apoptosis de la célula epitelial. VacA tiene diversos efectos sobre el sistema inmune, por ejemplo interfiere con la fagocitosis y la presentación antigénica, decrece la activación de células T Jurkat, a través de la inhibición de la activación de NFAT, un factor requerido para la expresión de genes involucrados en la activación de estas células. VacA también inhibe la proliferación de células T a través de mecanismos independientes de la activación de NFAT o expresión de IL-2. Este efecto requiere una región N – terminal de la toxina intacta que reconoce la β 2 integrina de la célula T. Estos efectos de VacA en el sistema inmune pueden explicar como *H. pylori* evade la respuesta inmune adaptativa y le permite establecer una infección persistente. Sin embargo, como mucho de lo que se encuentra en la literatura de CagA, todos los efectos determinados in vitro deben ser cuidadosamente investigados in vivo durante la infección crónica y así

determinar si son clínicamente relevantes (Qiao *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2004; Wen & Moss, 2009).

1.5 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos es un problema en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos, incluyendo bombas de expulsión, inactivación del antibiótico por procesos de modificación enzimática, alteración y protección de los sitios blanco y adquisición de genes de resistencia de fuentes externas. En *H. pylori* los mecanismos responsables de resistencia a varios antibióticos ha sido determinado, este posee resistencia intrínseca a polimixinas, trimetropin, sulfonamidas y vancomicina, la gran mayoría de cepas son también resistentes a ácido nadilixico y compuestos antifúngicos (Alarcon *et al.*, 1999). Como pocas bacterias *H. pylori* comparte con *Mycobacterium tuberculosis*, la peculiaridad de adquirir resistencia por mutación en genes de su cromosoma, desarrollando resistencia a todos los antibióticos hasta el momento utilizados en las terapias de erradicación de la infección; la adquisición de resistencia a los antimicrobianos por medio de plásmidos no ha sido demostrada en *H. pylori*, pero es una posibilidad que existe, ya que se han encontrado plásmidos en la mitad de los aislamientos de *H. pylori*. Las mutaciones ocurren espontáneamente y luego son transmitidas verticalmente o por transformación natural. La consecuencia es un progresivo incremento en la tasa de resistencia debido a la selección por presión con el antibiótico. En muchas bacterias mecanismos como bombas de

expulsión pueden contribuir en la resistencia a los antibióticos; sin embargo, en 2000, Bina *et al.*, evaluaron la relevancia de tres sistemas de eflujo en aislamientos resistentes de *H. pylori* y concluyeron que en contraste a lo observado en la gran mayoría de bacterias Gram negativas como por ejemplo *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las bombas de expulsión no juegan un papel en la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, estos resultados fueron corroborados por DeLoney y Schiller en 2000, quienes eliminaron la posibilidad de este mecanismo en cepas resistentes a amoxicilina (Megraud & Lehours, 2007). Sin embargo, en algunos aislamientos multiresistentes en donde no se encuentran mutaciones en los genes relacionados con resistencia; se ha demostrado que las bombas de expulsión son el mecanismo responsable de esta característica (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). A continuación se describen los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a los principales antimicrobianos utilizados en los esquemas de tratamiento.

1.5.1 5- nitroimidazoles

Los 5-nitroimidazoles son prodrogas, que necesitan ser activadas dentro de la célula blanco. Los 5-nitroimidazoles tienen un muy bajo potencial de reducción y son activados por un proceso de reducción de un electrón. La reducción del grupo nitro lleva a la generación de productos reactivos, principalmente radicales libres, que dañan estructuras celulares y el ADN por la producción de mutaciones letales. Algunos de los productos de reducción son mutagénicos y su formación puede

llevar a la generación de mas radicales libres que también son dañinos. Con la reducción del medicamento, se genera un gradiente de concentración que facilita la difusión del 5-nitroimidazol en la célula. Aunque el proceso de activación del medicamento puede ser descrito de una manera simple, esta explicación implica un proceso intracelular complejo; ya que el fundamento de la toxicidad selectiva de los 5-imidazoles depende del potencial redox intracelular, el cual debe ser de aproximadamente 415 mV, el punto medio de acople del metronidazol. Los anaerobios tienen una capacidad reductora para activar estos medicamentos, mientras que las bacterias aerobias y las células de los mamíferos no lo pueden hacer. El hecho de que una bacteria microaerófila fuera susceptible a los 5-nitroimidazoles fue la primera indicación de que metabolismo de *H. pylori* es atípico. Debido a que es microaerófilo, en un principio se pensó que los mecanismos involucrados en la susceptibilidad o resistencia a los 5-nitroimidazoles involucraban procesos que generaban aniones superóxido que terminaban en muerte celular, sin embargo, varios estudios demostraron que esta hipótesis no era correcta y fue así como otros estudios demostraron que *H. pylori* posee enzimas con características diferentes a las de los microorganismos anaerobios que están implicadas en el proceso. Los avances en el entendimiento de la resistencia de *H. pylori* a los 5-nitroimidazoles vienen de los trabajos de Hoffman *et al*, quienes reportaron que mutaciones en el gen que codifica para una nitroreductasa insensible al oxígeno (*rdxA*) produce resistencia debido a una inactivación de la nitroreductasa (Hoffman *et al.*, 1996); otro estudio del mismo grupo estableció que la resistencia observada en la cepa ATCC 43504 es debida a

la inserción de una secuencia (mini-IS605) y deleciones en el gen *rdxA*, estos mismos hallazgos fueron confirmados en otros estudios (Debets-Ossenkopp *et al.*, 1999; Goodwin *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2000; Sisson *et al.*, 2000). Adicionalmente, Tankovich reportó cuatro mecanismos de inactivación de *rdxA* en aislamientos clínicos de Francia y Africa del norte: mutaciones en el marco de lectura, mutaciones sin sentido, supresión de bases y presencia de una secuencia de inserción (mini-IS605) (Tankovic *et al.*, 2000). Curiosamente con la descripción de RdxA la historia no estaba completa, ya que cepas resistentes al metronidazol sin mutaciones en *rdxA* fueron encontradas, lo que significa que existen otras enzimas involucradas, esta conclusión fue soportada por Kwon *et al.*, quien indicó que en adición a *rdxA*, mutaciones en otros genes contribuyen en la resistencia de los 5-nitroimidazoles. Sus resultados confirman el concepto de múltiples enzimas involucradas en la activación de estos medicamentos, en donde ferredoxin like protein (*fdxB*) y NAD(P)H flavin oxidoreductasa (*frxA*) contribuyen en la activación del metronidazol y que fenotipos resistentes están asociados con mutaciones en estos genes, finalmente ellos concluyen que otros sistemas pueden influir en la resistencia al metronidazol, y que por lo tanto comprender la resistencia de resistencia de *H. pylori* a metronidazol y otros 5-nitroimidazoles requiere mas estudios (Aldana *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2000a; Kwon *et al.*, 2000b; Kwon *et al.*, 2001), recientemente se ha encontrado que la bomba de expulsión TolC juega un papel en la resistencia a este grupo de medicamentos (Mehrabadi *et al.*; Tsugawa *et al.*, 2011; van Amsterdam *et al.*, 2005).

Las tasas de resistencia han venido incrementándose mundialmente, con variaciones entre áreas geográficas, oscilando entre 10 – 40 % en países desarrollados y 30 – 90 % en países en vía de desarrollo, en especial cifras elevadas se han detectado en países africanos, de América del sur y Asia, probablemente debido a su frecuente uso como antiparasitario. Las tasas de resistencia tienden a ser más altas en mujeres, probablemente por su utilización previa en infecciones ginecológicas (De Francesco *et al.*, 2010; Megraud, 1997; Megraud *et al.*, 1997; Monteiro & Megraud, 1998). En Colombia un estudio realizado en 1997 encontró una prevalencia de resistencia primaria de 84% (Gutiérrez & Otero, 1998) y un estudio reciente realizado por Henao en 2009 reporta una prevalencia de 72% en la ciudad de Bogotá (Henao *et al.*, 2009a) y dos estudios realizados por Alvarez *et al.*; encuentran 88% y 82% de resistencia en las ciudades de Manizales, Armenia y Pereira (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b). En general lo que se ha observado en Colombia son altas prevalencias de resistencia a metronidazol, influenciado quizás por su utilización en el manejo de infecciones parasitarias e infecciones vaginales.

1.5.2 Claritromicina

La resistencia a claritromicina, el macrólido mas utilizado en el tratamiento de *H. pylori* ocurre por mutaciones en el sitio de unión del antibiótico; el dominio V de la peptidil transferasa en la molécula 23S rRNA, ubicado entre la subunidad ribosomal 50S y 70S. La unión del antibiótico en el dominio V, en cepas susceptibles, interfiere con la elongación de proteínas, bloqueando efectivamente

la síntesis de proteínas, el mecanismo de resistencia fue demostrado por primera vez por Versalovic, de laboratorios Abbott y un grupo en Holanda en 1996, ellos demostraron que mutaciones puntuales (adenina→guanina) en las posiciones 2142 (A2142G) y 2143 (A2143G) (Versalovic *et al.*, 1996; Versalovic *et al.*, 1997). Estas mutaciones están asociadas con pérdida de unión de la claritromicina a los ribosomas. Otra mutación descrita, pero que se presenta con menor frecuencia es la transversión A2142C, que confiere también resistencia a los macrólidos. In vitro se ha podido obtener por mutagénesis dirigida mutaciones; A2143C, A2142T, A2143T; sin embargo estas mutantes son inestables y tienen una reducida tasa de crecimiento, debido a que inducen cambios en la conformación del ribosoma que impactan en la estabilidad del mismo y muchas de ellas terminan siendo letales para la bacteria, no es muy claro porque la mutación A2142C que aparentemente tiene este mismo tipo de mutación que no sería viable para la bacteria se encuentra de vez en cuando. El impacto de las mutaciones específicas y su relación con la concentración mínima inhibitoria (CMI) ha sido analizada encontrándose que la mutación A2142G tiene un mayor efecto en CMI que la A2143G, aunque esta regla no se cumple siempre (Xia *et al.*, 1996). Otras mutaciones relacionadas con resistencia se ubican en las posiciones A2144T, T2717C y C2694A (Rimbara *et al.*, 2011). La mutación C2694A, ha sido descrita en aislamientos con baja resistencia (CIM 1µg/ml), algunos autores han relacionado la mutación T2182C con resistencia a claritromicina pero los experimentos de transformación natural han fallado en generar resistencia, en

cambio C2694A fue consistente en producir bajos niveles de resistencia en experimentos de transformación natural (Rimbara *et al.*, 2008a) .

H. pylori contiene dos genes de 23S rRNA, en la mayoría de las cepas resistentes ambos genes están mutados; heterocigotos no son frecuentes aunque también se han descrito varios casos, con un gen mutado y otro silvestre o cada gen con una mutación diferente que es mucho menos frecuente (Megraud, 2007). La frecuencia de resistencia a los macrólidos varía de un país a otro y está relacionada con su uso previamente en infecciones respiratorias, por ese motivo la resistencia a claritromicina tiende a ser alta especialmente en niños. La prevalencia promedio de resistencia en Europa es 11,1%, con diferencias entre países, siendo alta en España (49,2%), y baja en Suecia (1,5%) y Holanda (0,8%); en Asia la prevalencia promedio alcanza el 18,9%, siendo la prevalencia muy alta en Japón (40,7%) y baja en Malasia (2,1%); en América el valor promedio de prevalencia es 29,3%, con prevalencias altas en países suramericanos y una prevalencia menor en Norteamérica (De Francesco *et al.*, 2010). En Colombia dos estudios realizados por Alvarez *et al.*, en 2009, reportan una resistencia a claritromicina de 2,2% y 3,8% en la región del viejo Caldas (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b), otro estudio en población de Bogotá, publicado por Henao *et al.*, en 2009 encontró una prevalencia de 15%, reflejando diferencias entre poblaciones del país (Henao *et al.*, 2009b).

1.5.3 Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico bactericida del grupo de las penicilinas, se une a las proteínas de unión a penicilina en la pared (PBPs) e interfiere con la síntesis de la pared bacteriana, que produce lisis de la bacteria que se encuentra en replicación. La amoxicilina es liberada en el jugo gástrico y por ello es frecuentemente utilizada en la terapia anti *H. pylori*. La resistencia a amoxicilina es relativamente baja, pero cuando la resistencia aparece ocurre por alteraciones estructurales en las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Las PBPs son enzimas que están involucradas en la síntesis y mantenimiento de la capa de peptidoglicano de la pared bacteriana. En *H. pylori* hay nueve PBPs, tres tienen alto peso molecular y seis bajo peso molecular. Tres han sido asociadas con resistencia a amoxicilina. La causa más común obedece a varias mutaciones puntuales en el gen *pbp1A*, *pbp2* y *pbp3* que involucra varias sustituciones de aminoácidos que modifican el sitio de unión de la amoxicilina impidiendo que esta pueda unirse a la pared celular, las sustituciones más frecuentes se observan en las posiciones 320Ala→Val, 366Phe→Leu, 369Ala→Thr, 374Leu→Val, 414Ser→Arg, 423Leu→Phe, 562Asn→Tyr, 593Thr→Ala/Gly (Rimbara *et al.*, 2007; Rimbara *et al.*, 2008b). Las mutaciones descritas en este gen se localizan fundamentalmente en el motivo II, cuya secuencia aminoacídica es serina-lisina-asparagina (SKN402-404) y en el motivo III, compuesto por los residuos lisina-treonina-glicina (KTG555-557) o en regiones adyacentes (región C-terminal de la proteína). Esto provoca cambios conformacionales en las PBPs que disminuyen la

afinidad de unión a la amoxicilina y por tanto podrían dar lugar a fenotipos resistentes. Kwon *et al*, demostraron que la alta resistencia a los β -lactámicos asociada con multiresistencia adquirida en aislamientos clínicos de *H. pylori* es mediado por estrategias combinadas que incluyen alteraciones en PBP1A y disminución de la permeabilidad de membrana (Kwon *et al.*, 2003).

La prevalencia de resistencia para amoxicilina es relativamente baja a nivel mundial, con variaciones entre áreas geográficas, Europa (1,1%), en Asia varía desde Japón (0%), Corea (8,8%) y estudios en Taiwan en diferentes regiones muestras prevalencias muy distintas una con (0,9%) y otra de (36,1%), dos estudios realizados en Colombia por Alvarez *et al*, en 2009, tienen diferentes resultados uno en donde no evidenciaron resistencia a amoxicilina en población de Manizales, Pereira y Armenia y otro en donde la resistencia fue de 1,9%, en pacientes de la misma región, de todas maneras la tasa de resistencia es baja (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b).

1.5.4 Fluoroquinolonas

Las fluorquinolonas (ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina y levofloxacina) son antibióticos bactericidas que inhiben la enzima ADN girasa. La ADN girasa es un tetrámero constituido por dos subunidades A y B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La principal actividad de esta enzima es catalizar el superenrollamiento negativo del DNA. La resistencia de *H. pylori* es causada por mutaciones puntuales en el región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR), localizada dentro de los aminoácidos 67 y 106 en el gen *gyrA* en las

tripleas, 87, 88, 91 y 97. Estas mutaciones previenen la unión de la fluoroquinolona a la girasa permitiendo la síntesis de ADN y la supervivencia de la bacteria. Las mutaciones mas frecuentes relacionadas con resistencia son aquellas que provocan sustituciones de aspartato por glicina (D91G) y asparagina por lisina (N87K)(Nishizawa *et al.*, 2007) (Rimbara *et al.*, 2011).

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* ha venido incrementándose en los últimos años rápidamente. La prevalencia de resistencia a levofloxacina en Europa es de 24,1%, mucho más alta que en Asia en donde la prevalencia de la resistencia es de 11,6%, en Japón la prevalencia alcanza el 14% y en Taiwan el 11,9%, Hong Kong a diferencia de muchos países asiáticos tiene una baja prevalencia de resistencia a levofloxacina, tan solo 2,6%. El aumento de la resistencia a levofloxacina, disminuye la eficacia de las terapias de erradicación que incluyen esta fluoroquinolona. El aumento de la resistencia a este antibiótico se ha relacionado con su uso en el manejo de otras infecciones como las urinarias (De Francesco *et al.*, 2010). En Colombia no se ha realizado hasta el momento ningún estudio para conocer la prevalencia de resistencia de *H. pylori* a la levofloxacina, esta misma situación se presenta en los demás países latinoamericanos en donde hasta el momento nadie ha abordado este tema.

1.6 Esquemas de tratamiento

Existen varias estrategias terapéuticas para erradicar la infección por *H. pylori*, todas ellas utilizan dos antibióticos mas un inhibidor de la bomba de protones (IBP).

Sin embargo después de más de dos décadas de iniciado el trabajo en la búsqueda de terapias exitosas para erradicar la infección, aún no se cuenta con una terapia eficaz. A continuación se mencionan las diferentes terapias actualmente existentes para la erradicación de la infección y al finalizar la bibliografía de este capítulo se encuentra un artículo de actualización: *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. Otero, W; Trespalacios, A.A; Otero, E. Rev Col Gastroenterol. 24 (3), 2009. 279 – 292, en donde se exponen todos los esquemas de tratamiento y se analizan las diferentes razones que hacen complicado el tratamiento de esta infección.

Opciones terapéuticas para erradicar *H. pylori*

1. *Terapia triple clásica: 7 a 10 días*

Subsalicilato de bismuto, tetraciclina 500 mg (3v/día), metronidazol 500 mg (3v/día)

2. *Terapia triple estándar: 7 a 10 días*

IBP dos veces al día, amoxicilina 1g (2v/día), claritromicina 500 mg (2v/día) o metronidazol 500 mg (3v/día)

Eficacia actual (en donde se le ha estudiado): 57 a 73% (7 días), 67 a 79% (10 días)

Inconvenientes: no utilizarla en áreas con resistencia a claritromicina >20% y/o metronidazol >40%

3. *Terapia cuádruple: 7-10 días*

IBP dos veces al día + terapia triple clásica

Eficacia: 7-10 días: 74%

Inconvenientes: múltiples tabletas, menor adherencia

4. *Terapia cuádruple en una sola cápsula: 10 días*

Una cápsula con Bismuto biscalcitrateo+metronidazol+tetraciclina mas IBP dos veces al día.

Eficacia: USA 87% Europa 93%

Inconvenientes: no está comercializada

5. *Terapia Secuencial: 10 días.*

IBP dos veces al día 10 días

Amoxicilina 1g (2v/día) primeros cinco días

Claritromicina 500 mg (2v/día) + tinidazol 500 mg (2V/día): últimos cinco días

Eficacia: 80-93%

Inconvenientes: resistencia dual (claritromicina/metronidazol)

6. *Terapias concomitantes (terapias cuádruples sin bismuto): 7 a 14 días*

IBP (2v/día), amoxicilina 1g (2v/día), claritromicina 500 mg (2v/día) y tinidazol 500 mg (2v/día) o metronidazol 500 mg (2v/día)

Eficacia: 91.7%

7. *Triples terapias con levofloxacin: 7 a 10 días.*

- IBP (2v/día), amoxicilina 1g (2v/día), levofloxacin 500 mg (1 a 2v/día) o 250 mg (2v/día)

Eficacia:

Primera línea 84 a 96%, promedio 90%

Segunda línea: 60% a 94%, promedio 80%

Tercera línea: 60% a 70%

8. *Alérgicos a penicilina*

Levofloxacin 500 mg dos veces al día 7 días

Claritromicina 500 mg dos veces al día 7 días

IBP dos veces al día 7 días

Eficacia: 87%

Claritromicina 500 mg dos veces al día

Metronidazol 500mg tres veces al día

IBP dos veces al día

Inconvenientes: Falla cuando existen altas resistencias a claritromicina y metronidazol

1.7 Referencias

- Alarcon, T., Domingo, D. & Lopez-Brea, M. (1999).** Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* **12**, 19-26.
- Aldana, L. P., Kato, M., Kondo, T., Nakagawa, S., Zheng, R., Sugiyama, T., Asaka, M. & Kwon, D. H. (2005).** In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in *rdxA* and *frxA* genes from *Helicobacter pylori* isolates. *J Infect Chemother* **11**, 59-63.
- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T. & other authors (1999).** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.
- Alm, R. A. & Trust, T. J. (1999).** Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med* **77**, 834-846.
- Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinoso, E., Martinez, J. W. & Beltran, L. (2009a).** [Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia]. *Rev Med Chil* **137**, 1309-1314.
- Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F. & Reinoso, E. (2009b).** Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4022-4024.
- Ando, T., Ishiguro, K., Watanabe, O. & other authors (2010).** Restriction-modification systems may be associated with *Helicobacter pylori* virulence. *J Gastroenterol Hepatol* **25 Suppl 1**, S95-98.
- Arevalo, A., Trespalacios, A. A. & Otero, W. (2009).** Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori* *Rev Col Gastroenterol* **24**, 388-395.
- Atherton, J. C., Cover, T. L., Papini, E. & Telford, J. L. (2001).** Vacuolating Cytotoxin.
- Atherton, J. C. & Blaser, M. J. (2009).** Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* **119**, 2475-2487.
- Aviles-Jimenez, F., Letley, D. P., Gonzalez-Valencia, G., Salama, N., Torres, J. & Atherton, J. C. (2004).** Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* **186**, 5182-5185.
- Chanto, G., Occhialini, A., Gras, N., Alm, R. A., Megraud, F. & Marais, A. (2002).** Identification of strain-specific genes located outside the plasticity zone in nine clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **148**, 3671-3680.
- De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E. & Zullo, A. (2010).** Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* **19**, 409-414.

De Gusmao, V. R., Nogueira Mendes, E., De Magalhaes Queiroz, D. M., Aguiar Rocha, G., Camargos Rocha, A. M., Ramadan Ashour, A. A. & Teles Carvalho, A. S. (2000). vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol* **38**, 2853-2857.

Debets-Ossenkopp, Y. J., Pot, R. G., van Westerloo, D. J., Goodwin, A., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Berg, D. E., Hoffman, P. S. & Kusters, J. G. (1999). Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (rdxA) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2657-2662.

Dundon, W., Nishioka, H., Montecucco, C., Montemurro, P., Rappuoli, R. & Del Giudice, G. (2001a). Problems assaying neutrophil activators. *Trends Microbiol* **9**, 314-315.

Dundon, W. G., de Bernard, M. & Montecucco, C. (2001b). Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* **290**, 647-658.

Dundon, W. G., Polenghi, A., Del Giudice, G., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (2001c). Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 143-149.

Dunn, B. E., Cohen, H. & Blaser, M. J. (1997a). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* **10**, 720-741.

Dunn, B. E., Vakil, N. B., Schneider, B. G., Miller, M. M., Zitzer, J. B., Peutz, T. & Phadnis, S. H. (1997b). Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infect Immun* **65**, 1181-1188.

Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R. & Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**, 2470-2475.

Eaton, K. A., Cover, T. L., Tummuru, M. K., Blaser, M. J. & Krakowka, S. (1997). Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **65**, 3462-3464.

Falush, D., Wirth, T., Linz, B. & other authors (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**, 1582-1585.

Ge, Z. & Taylor, D. E. (1999). Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol* **53**, 353-387.

Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J. & Kusters, J. G. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* **6**, 699-709.

Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen van Zanten, S. J., Berg, D. E. & Hoffman, P. S. (1998). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* **28**, 383-393.

Goodwin, C. S., McCulloch, R. K., Armstrong, J. A. & Wee, S. H. (1985). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* **19**, 257-267.

Goodwin, C. S. & Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**, 1-13.

Goodwin, C. S., Gordon, A. & Burke, V. (1990). *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) and duodenal ulcer. *Med J Aust* **153**, 66-67.

Graham, D. Y. & Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* **59**, 1143-1153.

Gutiérrez, O. & Otero, W. (1998). Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroenterol* **12** 31 - 35.

Henao, S. C., Otero, W., Angel, L. A. & Martinez, J. D. (2009a). Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. *Rev Col Gastroenterol* **24**, 10 - 16.

Henao, S. C., Quiroga, A., Martinez, J. D. & Otero, W. (2009b). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* **24** 110 -114.

Heuermann, D. & Haas, R. (1995). Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* **165**, 17-24.

Hoffman, P. S., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K. & Veldhuyzen van Zanten, S. J. (1996). Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J Bacteriol* **178**, 4822-4829.

Jeong, J. Y., Mukhopadhyay, A. K., Dailidienė, D. & other authors (2000). Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**, 5082-5090.

Kleibeuker, J. H. & Thijs, J. C. (2005). [The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005 for the discovery of the stomach bacterium *Helicobacter pylori*]. *Ned Tijdschr Geneeskde* **149**, 2955-2957.

Kuipers, E. J., Israel, D. A., Kusters, J. G. & other authors (2000). Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* **181**, 273-282.

Kusters, J. G., van Vliet, A. H. & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**, 449-490.

Kwon, D. H., El-Zaatari, F. A., Kato, M., Osato, M. S., Reddy, R., Yamaoka, Y. & Graham, D. Y. (2000a). Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferredoxin-like protein (*FdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2133-2142.

Kwon, D. H., Pena, J. A., Osato, M. S., Fox, J. G., Graham, D. Y. & Versalovic, J. (2000b). Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother* **46**, 793-796.

Kwon, D. H., Hulten, K., Kato, M., Kim, J. J., Lee, M., El-Zaatari, F. A., Osato, M. S. & Graham, D. Y. (2001). DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 pairs of metronidazole-sensitive and -resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2609-2615.

Kwon, D. H., Dore, M. P., Kim, J. J., Kato, M., Lee, M., Wu, J. Y. & Graham, D. Y. (2003). High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2169-2178.

Liu, Z. Q., Zheng, P. Y. & Yang, P. C. (2008). Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol* **14**, 5217-5222.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. & other authors (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781.

Malfertheiner, P. & Selgrad, M. (2010). *Helicobacter pylori* infection and current clinical areas of contention. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 618-623.

Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L. & Megraud, F. (1999). Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 642-674.

Marshall, B. (2003). *Helicobacter pylori*: past, present and future. *Keio J Med* **52**, 80-85.

Marshall, B. J. & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315.

Marshall, B. J., McGeachie, D. B., Rogers, P. A. & Glancy, R. J. (1985). Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* **142**, 439-444.

Marshall, B. J., Goodwin, C. S., Warren, J. R., Murray, R., Blincow, E. D., Blackburn, S. J., Phillips, M., Waters, T. E. & Sanderson, C. R. (1988). Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* **2**, 1437-1442.

Marshall, B. J., Warren, J. R. & Goodwin, C. S. (1989). Duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* **1**, 836-837.

Megraud, F. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* **11 Suppl 1**, 43-53.

Megraud, F., Occhialini, A. & Doermann, H. P. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to macrolides and nitroimidazole compounds. The current situation. *J Physiol Pharmacol* **48 Suppl 4**, 25-38.

Megraud, F. (2007). *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **56**, 1502.

Megraud, F. & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **20**, 280-322.

Mehrabadi, J. F., Sirous, M., Daryani, N. E., Eshraghi, S., Akbari, B. & Shirazi, M. H. (2007). Assessing the role of the RND efflux pump in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* by RT-PCR assay. *J Infect Dev Ctries* **5**, 88-93.

Monteiro, L. & Megraud, F. (1998). Microbiological aspects of antibiotic resistant *Helicobacter pylori* strains. *Ital J Gastroenterol Hepatol* **30 Suppl 3**, S329-333.

Montemurro, P., Barbuti, G., Dundon, W. G. & other authors (2001). *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis* **183**, 1055-1062.

Nishizawa, T., Suzuki, H., Umezawa, A., Muraoka, H., Iwasaki, E., Masaoka, T., Kobayashi, I. & Hibi, T. (2007). Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* **45**, 303-305.

Occhialini, A., Marais, A., Alm, R., Garcia, F., Sierra, R. & Megraud, F. (2000). Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun* **68**, 6240-6249.

Parsonnet, J. (1998). *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut* **43 Suppl 1**, S6-9.

Perez-Perez, G. I. (2000). Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am* **29**, 879-884.

Pervez, S., Ali, N., Aaqil, H., Mumtaz, K., Siddiq Ullah, S. & Akhtar, N. (2011). Gastric MALT lymphoma: a rarity. *J Coll Physicians Surg Pak* **21**, 171-172.

Qiao, W., Hu, J. L., Xiao, B., Wu, K. C., Peng, D. R., Atherton, J. C. & Xue, H. (2003). *cagA* and *vacA* genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* **9**, 1762-1766.

Queiroz, D. M., Cunha, R. P., Saraiva, I. E. & Rocha, A. M. (2010). Helicobacter pylori virulence factors as tools to study human migrations. *Toxicon* **56**, 1193-1197.

Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2007). Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in Helicobacter pylori. *Microbiol Immunol* **51**, 939-944.

Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2008a). Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3465-3466.

Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2008b). Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in Helicobacter pylori. *J Antimicrob Chemother* **61**, 995-998.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for Helicobacter pylori infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 79-88.

Santos, A., Queiroz, D. M., Menard, A., Marais, A., Rocha, G. A., Oliveira, C. A., Nogueira, A. M., Uzeda, M. & Megraud, F. (2003). New pathogenicity marker found in the plasticity region of the Helicobacter pylori genome. *J Clin Microbiol* **41**, 1651-1655.

Sierra, F., Gutierrez, O. & Otero, O. (1990). Campylobacter pylori en úlcera duodenal, gastritis crónica y dispepsia no ulcerosa. *Acta Med Colomb* **15**, 74 - 83.

Sisson, G., Jeong, J. Y., Goodwin, A., Bryden, L., Rossler, N., Lim-Morrison, S., Raudonikiene, A., Berg, D. E. & Hoffman, P. S. (2000). Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in Helicobacter pylori and in Escherichia coli containing a cloned H. pylori RdxA(+) (Nitroreductase) gene. *J Bacteriol* **182**, 5091-5096.

Tankovic, J., Lamarque, D., Delchier, J. C., Soussy, C. J., Labigne, A. & Jenks, P. J. (2000). Frequent association between alteration of the rdxA gene and metronidazole resistance in French and North African isolates of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 608-613.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* **388**, 539-547.

Tsugawa, H., Suzuki, H., Muraoka, H., Ikeda, F., Hirata, K., Matsuzaki, J., Saito, Y. & Hibi, T. (2011). Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in Helicobacter pylori. *Biochem Biophys Res Commun* **404**, 656-660.

van Amsterdam, K., Bart, A. & van der Ende, A. (2005). A Helicobacter pylori TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1477-1482.

Van Der Weyden, M. B., Armstrong, R. M. & Gregory, A. T. (2005). The 2005 Nobel Prize in physiology or medicine. *Med J Aust* **183**, 612-614.

Van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Megraud, F. & other authors (1999). Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **116**, 823-830.

Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M. V., Beyer, J., Flamm, R. K., Tanaka, S. K., Graham, D. Y. & Go, M. F. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 477-480.

Versalovic, J., Osato, M. S., Spakovsky, K. & other authors (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* **40**, 283-286.

Wen, S., Felley, C. P., Bouzourene, H., Reimers, M., Michetti, P. & Pan-Hammarstrom, Q. (2004). Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Immunol* **172**, 2595-2606.

Wen, S. & Moss, S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* **282**, 1-8.

Xia, H. X., Buckley, M., Keane, C. T. & O'Morain, C. A. (1996). Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: prevalence in untreated dyspeptic patients and stability in vitro. *J Antimicrob Chemother* **37**, 473-481.

Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. & Graham, D. Y. (1999). Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut* **45**, 804-811.

Zhang, Z., Liu, Z. Q., Zheng, P. Y., Tang, F. A. & Yang, P. C. (2010). Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* **16**, 1279-1284.

***Helicobacter pylori*: Tratamiento actual**

Un importante reto en gastroenterología

***Helicobacter pylori*: Current treatment**

An important challenge for gastroenterology

William Otero Regino, MD,¹ Alba Alicia Trespalacios, MSc,² Elder Otero.³

¹ Profesor de Medicina, Unidad de Gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia, Universidad Nacional de Colombia. Gastroenterólogo, Clínica Fundadores Clínica Carlos Lleras, Hospital San Carlos, Bogotá, Colombia.

² Profesora del Departamento de Microbiología, Coordinadora Especialización en Microbiología Médica, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

³ Gastroenterólogo Clínica Fundadores, SaludCoop, Clínica Carlos Lleras, Hospital San Carlos, Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 18-06-09

Fecha aceptado: 18-08-09

Resumen

Desde cuando se descubrió *Helicobacter pylori*, su erradicación ha constituido uno de los más importantes retos en gastroenterología. En muchas partes se desconocen las prevalencias de resistencia primaria del microorganismo a los diferentes antibióticos que empíricamente utilizan y por no realizar de rutina pruebas para verificar la erradicación, en la práctica diaria, se ignora la efectividad de los esquemas prescritos. Conocer estos dos factores, permite, no solo identificar los que aún persisten infectados, sino también elegir la próxima terapia de rescate de una manera más racional. El no disponer de la información sobre resistencia pretratamiento es un inconveniente que impide evaluar el impacto de la resistencia con el fracaso terapéutico. A nivel mundial, la triple terapia estándar ha perdido la eficacia que tenía en el pasado y la terapia secuencial no es igualmente eficaz en todos los sitios, en especial en regiones en donde existe alta resistencia a claritromicina y metronidazol. Los esquemas con levofloxacina han demostrado eficacia en triples terapias de primera línea o como terapia de rescate, pero es necesario que cada región adopte sus propios esquemas de tratamiento fundamentados en pruebas de susceptibilidad y en estudios farmacogenómicos.

Palabras clave

Helicobacter, triple terapia, levofloxacina, terapia secuencial, resistencia primaria.

Summary

Since when *Helicobacter pylori* was discovered, the eradication has been one of the most important challenges in gastroenterology. In many places, the prevalence of primary resistance of microorganism to the different antibiotics is not known, and these are used empirically. In daily practice, no routine test is used to verify the eradication, and therefore do not know the effectiveness of the schemes. Knowing these two factors is possible identify those still infected and choose the next rescue therapy in a rational form. The absence of information on pre-treatment resistance is a problem that cannot measure the impact of resistance to therapeutic failure. A global level, the standard triple therapy has lost the effectiveness that it had in the past and sequential therapy is not equally effective everywhere, especially in regions where there is high resistance to clarithromycin and metronidazole. The schemes have proved effective with levofloxacin triple therapies as first line therapy or rescue, but it is necessary that each region takes its own schemes of treatment based on susceptibility tests and pharmacogenomic studies.

Key words

Helicobacter, triple therapy, levofloxacin, sequential therapy, primary resistance.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos de la humanidad, con la cual ha mantenido una estrecha relación desde hace aproximadamente 58.000 años, mucho antes de que se iniciaran las migraciones humanas

desde el África oriental, con las cuales, este microorganismo fue diseminado hacia otras regiones del mundo (1, 2). A pesar de esta convivencia desde la prehistoria, *H. pylori* solo fue reconocido como patógeno hace un poco más de 25

años (3) originando un nuevo capítulo en la medicina. Es posible que la breve historia de *H. pylori* como un patógeno reconocido (apenas 25 años), no haya sido suficiente para entender las complejas interacciones que ha mantenido con el hombre desde su origen y esto ayude a explicar las tremendas dificultades que hay todavía para su manejo, si se le compara con otros agentes infecciosos como *Treponema pallidum*, *Pseudomonas spp*, etc.

H. pylori afecta a cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (4). En países en vía de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con 20 a 50% en países desarrollados (5). Se adquiere en la infancia y si no se elimina con antimicrobianos, persiste durante la vida del individuo (6-8). En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica (9). Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-2% de tener cáncer gástrico (8, 9). Un porcentaje menor (1%) podrá presentar dispepsia y 1/100.000 linfomas MALT (9). Cuando se excluyen los AINES, *H. pylori* es responsable de la mayoría de las úlceras pépticas. Dos entidades extraintestinales, se consideran en la actualidad claramente relacionadas con la infección, anemia ferropénica (10) y púrpura trombocitopénica inmune (11). Las indicaciones actuales para su erradicación, basadas en el consenso de Maastricht III (12), se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Indicaciones de tratamiento de *Helicobacter pylori*.

| |
|---|
| Úlcera gástrica |
| Úlcera duodenal |
| Linfoma MALT gástrico |
| Gastritis atrófica |
| Después de resección cáncer gástrico |
| Familiares de 1er grado de pacientes con cáncer gástrico |
| Dispepsia funcional |
| Dispepsia no investigada |
| Anemia ferropénica inexplicada |
| Púrpura trombocitopénica idiopática |
| Antes de comenzar AINES o aspirina |
| Antes de iniciar tratamiento crónico con IBP (enfermedad por RGE) |
| Deseo del paciente (después de discutir riesgos y beneficios) |

Desde cuando fue descubierto *H. pylori*, su erradicación ha constituido uno de los más importantes retos en gastroenterología. Diversas circunstancias hacen particularmente difícil eliminar esta infección con antimicrobianos, siendo algunas de ellas inherentes a *H. pylori* y otras a las infecciones bacterianas en general; además, los antibióticos comúnmente utilizados no fueron diseñados para que

específicamente alcanzaran altas concentraciones en el estómago, sino para tratar las infecciones en forma global.

De particular importancia es el hecho de que *H. pylori* se protege del ácido al estar inmerso en la capa de moco, la cual actúa como una barrera que dificulta la exposición de la bacteria a los antibióticos (13), además, cuando estos llegan al estómago, se desplazan hacia el intestino, conforme aquel se desocupa de manera permanente, perdiéndose el efecto tóxico de los mismos determinando que su acción sea fundamentalmente sistémica (14), y varios de los antibióticos utilizados disminuyen su actividad por el ácido del estómago (15). La eficacia de otros antibióticos como las sales de bismuto, la tetraciclina y el metronidazol no es influida por el ácido (16), explicando el valor de la triple terapia clásica (TTC) que incluye estos medicamentos (ver más adelante). La claritromicina es particularmente sensible al ácido, el cual favorece su degradación, con una vida media de una hora a un pH de 2 (17). Otros dos factores importantes son el efecto del inóculo y el efecto del biofilm (18, 19). El primero hace referencia a que *H. pylori*, de manera similar a otras bacterias, en poblaciones en donde existen altas concentraciones del microorganismo, hay individuos dentro de la población, que no se replican (durmientes) y, por lo tanto, pueden sobrevivir durante la antibioticoterapia sin que necesariamente sean resistentes al antibiótico (19). El biofilm es una población de microorganismos, que crecen unidos entre sí, adheridos a superficies o interfaces y envueltos por una matriz de exopolisacáridos que los protege de la acción de los antibióticos (19). Recientemente, se demostró que *H. pylori* puede formar biofilm in vivo, el cual puede ser un importante mecanismo de persistencia de la infección y protección contra los antimicrobianos (19).

H. pylori no se replica a pH menor de 6, por lo cual en este microambiente grandes poblaciones del mismo, se mantienen sin replicación y como mencionamos, al aumentar el pH, se recupera la proliferación bacteriana y con ella el efecto de los antibióticos (20).

Las estrategias terapéuticas para vencer esta infección han sido básicamente dos. La primera es utilizar dos antibióticos con ranitidina bismuto citrato para generar una forma más soluble del bismuto, favoreciendo la liberación de este y con ello su contacto y acción sobre el microorganismo (13, 20). La otra es utilizar un inhibidor de la secreción de ácido con dos antibióticos como amoxicilina con claritromicina o metronidazol, que aunque experimentalmente no se ha comprobado su sinergismo (20), teóricamente hay importantes argumentos que lo favorecerían al elevar el pH gástrico, produciendo fundamentalmente los siguientes efectos:

1. Disminución de la producción de HCl, que disminuye el volumen de líquido intragástrico, aumentando la

concentración de los antibióticos tanto en el lumen gástrico como en el moco (21).

2. Aumento del pH, que disminuye la concentración mínima inhibitoria (CMI) de claritromicina y de amoxicilina, mejorando la estabilidad de estas moléculas, que es afectada por el pH ácido (21, 22).
3. Actividad más eficiente del sistema inmunológico del individuo al aumentar el pH (20).
4. Inhibición de CYP3A4 por efecto del omeprazol y alteración del metabolismo de otros sustratos para este sistema enzimático como la claritromicina, aumentando el área bajo de la curva de este (AUC) en 15%, tanto en plasma como en el jugo gástrico y a la inversa, la claritromicina hace que se eleve el AUC de omeprazol y esomeprazol en 95% y dos veces respectivamente (23).
5. Modificación del pH que induce cambios importantes en la biología de *H. pylori*. Su sobrevivencia se mantiene en pH entre 4,0 y 8,0, su síntesis proteica a pH entre 6,0 y 8,0 y no se multiplica en pH entre 4,0 y 6,0, y de esta manera, no sería susceptible a antibióticos como claritromicina o amoxicilina, que para ejercer su efecto, necesitan que la bacteria se replique (20).

Al elevar el pH con inhibidores de bomba de protones (IBP), la población de *H. pylori* que hasta entonces no se replicaba, comenzará a hacerlo, permitiendo que se produzcan los efectos bactericidas (amoxicilina) o bacteriostáticos (claritromicina) y si el pH continúa elevándose hasta llegar a la neutralidad, el mismo IBP eliminará a muchos de estos microorganismos ya que estos medicamentos inhiben el sistema enzimático de ureasa, por ello, las pruebas de ureasa rápida pueden dar resultados falsamente negativos en presencia de IBP (12, 20). El concepto de mayor eficacia al aumentar el pH fue ratificado recientemente, al demostrarse que la eficacia de la triple terapia fue superior cuando el pH promedio del estómago era de 6,4, en contraste con los pacientes en quienes el pH fue 5,2 (24). Así mismo, en un metanálisis, se encontró que altas dosis de omeprazol (40 mg dos veces al día), son más eficaces para curar la infección por *H. pylori*, que la dosis estándar del mismo, cuando se dan terapias triples durante siete días (25). Además, se ha encontrado que los metabolizadores rápidos de IBPs, en quienes se produce menor inhibición de la secreción de ácido (26), la triple terapia estándar es menos eficaz (27) y al contrario, en los metabolizadores lentos de IBPs, como en ciertas poblaciones de Asia, se continúan observando altas tasas de erradicación, mayores al 90%, tanto con la triple terapia estándar como con la terapia dual (IBP y amoxicilina a altas dosis (28), esta última ya en desuso por su baja eficacia. Investigadores japoneses consideran que, en ese país, la tasa de erradicación de *H. pylori* con triple

terapia estándar (IBP, amoxicilina y claritromicina), a dosis usuales, depende tanto de la susceptibilidad bacteriana a claritromicina como del polimorfismo del CYP2C19 del paciente (29). La mayoría de los IBPs son metabolizados en el hígado por el citocromo P450, por el sistema enzimático CYP2C19 (30), aunque el rabeprazol no involucra este sistema enzimático (31). Los IBPs que son metabolizados en el CYP219 son afectados por el polimorfismo de este sistema enzimático, del cual se han encontrado 19 alelos, pero la mayoría de individuos pueden ser clasificados en uno de tres tipos: metabolizadores lentos (o pobres), intermedios y rápidos, aunque recientemente fueron descritos metabolizadores ultrarrápidos (32-34). Los metabolizadores rápidos son homocigotos para el alelo dominante, los metabolizadores lentos o pobres, son homocigotos para el alelo recesivo y los metabolizadores extensos o intermedios son heterocigotos expresando un alelo dominante y otro recesivo (32-34). Hay diferencias interétnicas en las frecuencias de los metabolizadores lentos o pobres: 2,5 a 3,5% en caucásicos, 2% en afro-americanos, 13-20% en chinos y 18-22% en japoneses (32). Los metabolizadores lentos tienen más alta biodisponibilidad y por ende mayor efecto de los IBPs y más altas tasas de erradicación que los metabolizadores rápidos, los cuales pueden necesitar más altas dosis de IBPs y de antibióticos (33). En un estudio en pacientes sin infección por *H. pylori*, que eran CYP2C19 homo o heterocigotos rápidos, rabeprazol 10 mg, lansoprazol 30 mg y omeprazol 20 mg, se demostró más rápido y mayor aumento del pH intragástrico con rabeprazol (34). En un reciente estudio, se encontró que personalizando la dosis de lansoprazol según el polimorfismo del CYP2C19 y evitando la claritromicina si *H. pylori* es resistente a la misma (identificando mutaciones puntuales en el gen RNAr 23S), que la tasa de erradicación con la terapia triple fue de 96% versus 70% cuando se utilizaron dosis usuales de lansoprazol. El análisis farmacogenómico mencionado fue costo-eficaz (29). Estas diferencias genotípicas del CYP2C19 influyen en la magnitud y en la duración de la inhibición de la secreción de ácido por los IBPs, como sucede en poblaciones asiáticas donde la población de metabolizadores lentos es frecuente, en contraste con la baja prevalencia del mismo en occidente (16). El conocimiento sobre la mayor eficacia de esta última terapia, al producirse una profunda supresión de ácido, justifica, según algunos autores, considerar nuevos estudios con esta terapia ya abandonada, utilizando dosis más altas y frecuentes de IBP y amoxicilina (IBP cuatro veces al día y amoxicilina 500 mg cada seis horas, durante dos semanas) (16), para probar la hipótesis de que a estas dosis, los pacientes con el polimorfismo CYP2C19 de metabolizadores rápidos de IBP, serían similares a los que tienen el polimorfismo de metabolizadores lentos. La resistencia a amoxicilina es muy rara (13, 16, 35)

pero se ha informado que fumar disminuye la eficacia de los esquemas que la contienen (36). Se desconoce la causa de este desenlace, pero podría estar relacionado con la mayor producción de HCl inducida por el cigarrillo (16).

El metronidazol no requiere la replicación celular para eliminar el microorganismo, ingresa a la célula por difusión, es reducido y el compuesto resultante lesiona macromoléculas y degrada el DNA de la bacteria (35).

Desde el comienzo de las investigaciones de las terapias de erradicación de *H. pylori*, el enfoque antimicrobiano difiere del clásicamente utilizado para otras infecciones bacterianas. Para la mayoría de estas, el tratamiento se basa en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, con el objetivo de que el tratamiento sea exitoso en todos o casi todos los casos (16) y los médicos están atentos a los patrones de resistencia de los microorganismos más frecuentes de su comunidad (12, 16) y con base en estos, se plantean los tratamientos iniciales, los cuales se ajustarán posteriormente de acuerdo a los resultados de los cultivos y según los patrones de resistencia que van surgiendo, se decide muy rápidamente modificar los esquemas terapéuticos con el fin de mantener una alta tasa de éxito con los mismos. Esto contrasta con lo que sucede con *H. pylori* ya que los gastroenterólogos, generalmente desconocen las prevalencias de resistencia primaria del microorganismo a los diferentes antibióticos que empíricamente utilizan, pero aún así, esperan obtener altas tasas de curación y adicionalmente rara vez verifican la erradicación en los pacientes tratados, “asumiendo” la curación en todos. Cuando se decide darle tratamiento a un paciente infectado, lo ideal sería verificar la erradicación del mismo cuatro a seis semanas después de terminar el tratamiento, utilizando pruebas no invasivas como test respiratorio de urea o antígenos fecales, cuando no esté indicado volver a hacer endoscopia (9, 12). La comprobación de la curación es fundamental, para poder identificar los pacientes que continúan infectados y darles un adecuado tratamiento.

A los inconvenientes mencionados sobre el manejo de esta infección, se añade el hecho de que, en la mayoría de los estudios clínicos, rara vez, se estudia la susceptibilidad antimicrobiana pretratamiento, la cual permitiría una adecuada evaluación de la eficacia del mismo y adicionalmente planear el próximo tratamiento para aquellos pacientes en quienes fracasa el esquema terapéutico utilizado (37) y de esta manera poder hacer las recomendaciones para el tratamiento de la infección en el paciente individual.

Para erradicar *H. pylori*, el esquema terapéutico debería basarse en los resultados de ensayos clínicos que incluyan pruebas de susceptibilidad, utilizando biopsias de la mucosa gástrica del paciente y si no es posible, teniendo en cuenta las tasas de éxito de las diferentes terapias estudiadas localmente o la experiencia verificada del médico tratante.

No disponer de la información sobre resistencia pretratamiento es un inconveniente que impide evaluar el impacto de la resistencia, sobre la eficacia del esquema utilizado en el ensayo clínico y así mismo sobre la aparición de resistencia secundaria para poder explicar los fracasos del tratamiento (37). Cuando no se cuenta con estos datos, la estrategia para buscar las terapias adecuadas de erradicación de *H. pylori*, se ha basado en iniciar tratamientos empíricamente en busca del acierto o el fracaso y, algunos expertos recomiendan inicialmente “ensayar” terapias potenciales en estudios piloto con un pequeño número de pacientes y si se identifica un éxito razonable, entonces se prosigue a realizar un ensayo clínico, con mayor número de pacientes (38). Un concepto fundamental al enfrentar *H. pylori* es considerar que es una infección y, como tal, entenderla como curable (37). En este contexto, el mínimo éxito esperado debe ser del 95% para que sea considerado excelente, como recientemente fue expuesto por expertos, al sugerir una calificación de los tratamientos con base en la tasa de curación de la infección por intención de tratar que va desde grado A con tasa mayor del 95%, grado B (90 a 94%), grado C (85 a 89%), grado D (81-84%) hasta grado F o inaceptable, con tasa de curación menor del 80% (39). Expertos consideran que para lograr este umbral mínimo de éxito, se requieren ensayos clínicos, con suficiente número de pacientes, utilizando dos métodos diferentes (37). El primero es demostrar equivalencia con el tratamiento estándar utilizando la diferencia de la tasa de erradicación con el límite inferior del intervalo de confianza del 95% (δ) el cual debe ser menor del 10% para que se considere equivalente y, el segundo método es que el límite inferior del intervalo de confianza del 95% sea superior a 80% para considerar que la nueva terapia es eficaz. Para suponer que una terapia es eficaz, con una estimación puntual de 90%, se necesitan por lo menos 80 pacientes para determinar si el límite inferior del intervalo de confianza del 95% es superior a 80% (37).

El primer esquema de erradicación, que demostró de manera confiable una tasa de curación mayor al 90% fue la triple terapia “clásica” (TTC) compuesta por sales de bismuto, metronidazol y tetraciclina sin inhibidor de la secreción de ácido, administrada durante 14 días (40). Sin embargo, su eficacia era menor en áreas con alta resistencia al metronidazol.

En 1997 se llevó a cabo el primer consenso de Maastricht (41) y la recomendación del mismo fue que las terapias de erradicación de *H. pylori* debían tener una tasa de éxito mayores al 80% y el tratamiento de elección fue la triple terapia que hemos venido utilizando desde entonces: un inhibidor de la bomba de protones, y dos de tres antibióticos: Metronidazol (o tinidazol) o claritromicina y amoxicilina. Esta triple terapia estándar (TTE) fue descrita por primera vez por Barzola y col de Italia (42). Posterior a

Maastricht I, diversas asociaciones científicas y expertos de todo el mundo siguieron considerándola la piedra angular del tratamiento para esta infección (43-46). En los últimos diez años, esta recomendación no ha cambiado y fue ratificada por el tercer consenso de Maastricht (12), como también recientemente por el Colegio Americano de Gastroenterología (47). Sin embargo, en el Consenso de Maastricht III, se reconoció que la resistencia a la claritromicina y al metronidazol era un problema cada vez más frecuente en diversos países pero que en otros se mantenía en niveles que no influían en el éxito terapéutico y por ello se consideró que no debería ser abandonada (12). Las tasas de éxito iniciales de esta triple terapia (superiores al 90%) han venido disminuyendo de manera notoria y progresiva en diversas partes del mundo, llegando a valores actuales entre 57 a 73% en terapias de siete días y de 67 a 79% con terapias de 10 días (48). Esta notable declinación de su eficacia, no se ha encontrado solamente en los estudios americanos, sino también en muchos otros países, por ejemplo, en Italia se encontró recientemente que su éxito fue de 77% en esquemas de 10 días (49), siendo estadísticamente similar al 81,7% para las de diez días y al de 80% para siete días, encontrados en otro estudio (50). No obstante la pérdida de eficacia de esta triple terapia, los médicos de cuidado primario y gastroenterólogos de varias partes del mundo, frecuentemente la formulan (51, 52). La causa de esta caída en la eficacia, se atribuye al aumento de la resistencia a la claritromicina y al metronidazol (12).

En Colombia, de manera consistente, se han documentado altas tasas de resistencia, para metronidazol (53-55) y recientemente para claritromicina con una tasa por encima del 20% (55). Hace más de una década, utilizando E-test, la resistencia a metronidazol fue superior a 80% y recientemente superior a 70% en dos estudios que igualmente utilizaron E-test. Aunque esta prueba sobrestima la resistencia al metronidazol (54), el análisis de la probable magnitud de la sobreestimación, indica que aún así, sigue estando por encima del 40% (54), que es el límite máximo recomendado por Maastricht III para utilizar el metronidazol (12). El límite máximo para utilizar claritromicina es del 15-20% (12). Adicionalmente a la resistencia primaria a claritromicina, esta se aumenta dramáticamente, cuando la TTE fracasa (resistencia secundaria) (56, 57), por lo cual en el tratamiento de rescate, no debe incluirse claritromicina si esta fue utilizada en el tratamiento inicial (12, 58). Ante el creciente aumento de la resistencia a claritromicina y el fracaso de la TTE, han aparecido otras terapias alternativas de segunda elección o terapias de rescate, como son las terapias cuádruples que consisten en adicionar un IBP a la terapia clásica de bismuto, tetraciclina y metronidazol, durante 7 a 14 días (12, 13, 16), cuyo éxito varía entre 57 a 91%, con promedio de 77% (59). Cuando la resistencia a clari-

tromicina es menor de 15%, la eficacia de la terapia cuádruple durante siete días es similar a la TTE de siete días, con tasas de erradicación de 82% y 78% respectivamente (60). Como terapia de rescate, después de un primer tratamiento fallido, la eficacia es similar si se administra durante 7, 10 ó 14 días, y sus valores son 74%, 72% y 81% respectivamente (59). Los inconvenientes de esta terapia cuádruple son el gran número de tabletas al día, que afecta su adherencia y la no disponibilidad del bismuto en todas partes. Por lo que se ha desarrollado una nueva forma de la terapia cuádruple que consiste en incluir en una misma cápsula biscalitrato de bismuto, metronidazol y tetraciclina, la cual se toma tres veces al día, acompañada de un IBP dos veces al día (61). En USA su eficacia es de 87,7% (61) y en Europa de 93% (62).

En Colombia, teniendo en cuenta la alta tasa de resistencia a metronidazol, se ha ensayado una terapia cuádruple con furazolidona, durante diez días, OTAF 10 (omeprazol, tetraciclina, amoxicilina y furazolidona), lográndose una tasa de erradicación del 80% (63). A pesar de las frecuentes recomendaciones de incluir la furazolidona en terapias de erradicación cuando otras terapias han fracasado, teniendo en cuenta mínima resistencia y eficacia de los esquemas que la incluyen (12, 13, 16, 64, 65) y los múltiples trabajos realizados en diversas partes del mundo (66-77), recientemente se ha enfatizado sobre la seria toxicidad de este medicamento, que incluye su capacidad para causar tumores en animales inferiores al producir genotoxicidad (78-80); consideramos que no debería utilizarse hasta aclarar si los humanos podrían tener riesgos similares. No obstante, se siguen haciendo trabajos con este medicamento. En el último trabajo revisado (77), la tasa de efectos adversos se produjo en 85% de los pacientes y la tasa de éxito fue del 100% cuando los pacientes habían tenido un tratamiento previo fallido con un esquema que no tuviera furazolidona, versus 75% si habían fallado a un esquema previo que tuviera este antimicrobiano.

Por los inconvenientes actualmente existentes con la TTE, la comunidad gastroenterológica mundial, tiene el reto de erradicar *H. pylori* utilizando esquemas que sean bien tolerados, económicos y altamente eficaces cuando exista resistencia a metronidazol y claritromicina. Filosóficamente, lograr una terapia con estas características sería como el "Santo Grial" de las terapias contra *H. pylori* (37). Ante esta realidad, autores italianos desarrollaron la terapia secuencial, la cual fue superior a la TTE, con una eficacia de 89% versus 77% cuando se hizo el análisis por intención de tratar (81). Metanálisis recientes han concluido igualmente que esta terapia tuvo una eficacia cruda de 93,4% versus 76,9% con la triple terapia (82). Esta terapia secuencial consiste en la administración de un inhibidor de bomba de protones durante diez días, acompañado durante los primeros cinco

días de amoxicilina 1 gramo dos veces al día y desde el día 6 al día 10, este antibiótico es reemplazado por la combinación de claritromicina 500 mg dos veces al día más tinidazol 500 mg dos veces al día (81). Una desventaja de este esquema es que incluye amoxicilina y por lo tanto no se podría administrar en casos de alergia a la penicilina. Así mismo, cuando hay importante resistencia tanto a claritromicina como a metronidazol los expertos recomiendan no utilizarla (16, 81-83). En una de las investigaciones pioneras de esta terapia, *H. pylori* no se erradicó en ninguno de los cuatro pacientes cuando este era resistente a ambos antibióticos (81), aunque por el pequeño número de pacientes con esta situación se necesitarían estudios adicionales. En casos de resistencia solamente a claritromicina, esta terapia erradicó la infección en el 90%, en contraste con 28,6% de los que reciben la triple terapia estándar (81). Se desconoce el mecanismo por el cual se mantiene el éxito de la misma, pero se considera que la utilización secuencial de los antibióticos, iniciando con amoxicilina, produciría inicialmente disminución de la carga bacteriana y en segundo lugar, debilitamiento de la pared bacteriana de *H. pylori*, produciendo un desequilibrio osmótico que afecta a la bacteria, especialmente en fase de crecimiento impidiendo de esta manera el desarrollo de las bombas de expulsión de antibióticos que sería un importante mecanismo de resistencia a la claritromicina ya que el microorganismo evitaría la unión de este antibiótico a sus ribosomas (81, 84). Recientemente, se ratificó que esta “bomba de expulsión” de antibióticos es una estructura constitutiva que participa de manera importante en la resistencia de la claritromicina (85), además de las mutaciones puntuales que ocurren en el gen RNAr 23S en donde los cambios más frecuentes relacionados con resistencia son la sustitución de la adenina por una citosina o guanina en las posiciones 2142 (A2142C, A2142G) o por una guanina en la posición 2143 (A2143G) (35). De esta manera, la lesión en la pared bacteriana, causada por la amoxicilina, evitaría que la bacteria expulsara la claritromicina cuando llega en la segunda fase del tratamiento y por lo tanto ejercerá su efecto en el ribosoma bacteriano.

La principal experiencia con esta terapia secuencial proviene de Italia, aunque recientemente, Sánchez Delgado y col de España (86), encontraron que el éxito de esta terapia en su población fue de 84% por intención de tratar y 90% por protocolo. En Corea la terapia secuencial fue eficaz en 80,8% (87). Estos resultados con la terapia secuencial por fuera de Italia, así como su pobre eficacia en casos de resistencia dual, implican que sería necesario que en cada país se estudie su desempeño, antes de utilizarla empíricamente.

La terapia concomitante es otra terapia “cuádruple de rescate” que contiene tres antibióticos sin bismuto, con duración de tres a seis días, la cual fue introducida antes que la terapia secuencial (16, 88-91).

Las combinaciones de antibióticos utilizadas en estas terapias son variables e incluyen: amoxicilina, claritromicina y metronidazol o tinidazol y amoxicilina, metronidazol y roxitromicina.

En un reciente metanálisis, se demostró que la terapia concomitante fue más eficaz por intención de tratar, que la TTE 90% (IC 95% 86,8-93,6%) versus 79% (IC 95% 67,8-87,1%) (83) y en Taiwán, en un reciente estudio, aleatorizado, se comparó la terapia secuencial de diez días con una terapia concomitante de siete días y se encontró una tasa de erradicación similar: 89% vs. 87% por intención de tratar y 93% vs. 91% por protocolo (92). Con base en los resultados de los dos estudios, los autores del metanálisis (83) consideran que por su eficacia, corto periodo de duración y menos complejidad que la secuencial, la terapia concomitante sería una alternativa, aunque consideramos que se necesitan más estudios y posiblemente ampliar su duración en busca de una eficacia mayor del 95%, como es el objetivo en el tratamiento de las infecciones bacterianas en general. Al igual que la terapia secuencial, esta terapia puede tener pobre rendimiento en casos de resistencia simultánea a metronidazol y a claritromicina.

Con una adecuada adherencia al esquema prescrito, la resistencia de *H. pylori* pretratamiento es el factor más importante del fracaso terapéutico (93).

Otro antibiótico que ha emergido en reemplazo de la claritromicina, es la levofloxacina, en triple terapia, asociada a amoxicilina en las dosis usuales y un IBP dos veces al día (12). Levofloxacina es una quinolona, isómero de ofloxacina con un amplio espectro de actividad contra algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas (94,95). Su actividad antibacteriana se basa en la inhibición de la topoisomerasa II (96, 97). Administrada oralmente es rápida y casi completamente absorbida con biodisponibilidad de 100%, tiene vida media de 9 a 16 horas, con excreción predominantemente renal, con pocos efectos colaterales (98, 99). Los esquemas con este antibiótico han demostrado eficacia superior al 85% en esquema de primera línea de siete a diez días (98) e incluso con tratamientos de cuatro días con tasas de erradicación superiores al 90% (99). Los esquemas de triple terapia con este antibiótico, se han utilizado tanto en terapias de primera línea (100-102), como de segunda línea (103-106) y de tercera línea (107, 108).

En terapias de primera línea, la eficacia informada ha sido en promedio de 90% variando desde de 84% (100), 87% (101) a 96 % (102); combinada con claritromicina tiene eficacia similar cuando la resistencia a esta última no es alta (101, 102).

En terapias de rescate de segunda línea, la tasa de éxito varía desde 75% (104) a 77 % (105) cuando *H. pylori* es susceptible y de 33% cuando es resistente (104). En uno de

los estudios que la utilizó como terapia de segunda línea, el éxito fue de 67% en esquema de siete días y de 87,5% en el de diez días ($p=0,004$) (106).

La dosis de 500 mg una vez al día ha demostrado que tiene eficacia similar a la dosis de 500 mg dos veces al día en terapia de segunda línea después de fracaso de la triple terapia estándar con claritromicina (103). En este trabajo, las tasas de erradicación por intención de tratar con ambas dosis fueron 79,6% y 80% respectivamente. En terapias de rescate de tercera línea, la tasa de erradicación varía de 60% (97) a 70% (108).

Los pacientes alérgicos a la penicilina son un grupo de difícil manejo, con opciones terapéuticas muy reducidas, dada la importancia de la amoxicilina como antibiótico clave en la erradicación de *H. pylori*. Para estos pacientes, consideramos que una buena opción sería una terapia triple durante siete a diez días, cambiando amoxicilina por levofloxacina (500 mg una o dos veces al día) más claritromicina 500 mg dos veces al día más el IBP, cuya eficacia es del 87%, en población general (98). Otra posibilidad sería una triple terapia que incluya claritromicina, metronidazol e IBP (109). Aunque una limitación de esta última recomendación es la resistencia a claritromicina y metronidazol. En los sitios en donde esté disponible el bismuto, otra alternativa puede ser la terapia cuádruple con este medicamento (IBP, sal de bismuto, metronidazol y tetraciclina) (109).

No obstante la eficacia demostrada con este antibiótico, el aumento en su utilización para otras infecciones, la prevalencia de la resistencia es importante en algunos países: 15% en Japón (110), 8,8% en Alaska (111) y 17% en Francia (112). Al igual que con claritromicina, después de falla con el tratamiento, también se han observado altas tasas de resistencia con las quinolonas (113).

Con respecto al momento en el cual es necesario realizar cultivos y pruebas de susceptibilidad que guíen los futuros tratamientos hay controversia. La pregunta sería ¿cultivar o no cultivar? (114).

A diferencia de la dispepsia funcional, hay situaciones en las que la erradicación de *H. pylori* definitivamente es necesaria como linfomas MALT, úlceras pépticas, antecedentes de cáncer gástrico previo (gastrectomía parcial o resección endoscópica de cánceres tempranos) (93). En estos escenarios, se debería recurrir a las diferentes terapias de rescate de manera progresiva hasta lograr la erradicación. En el Consenso de Maastricht III (12), se consideró que después del segundo tratamiento empírico, el próximo debería basarse en los resultados del cultivo y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (12). Algunos autores han comparado la estrategia de un esquema de segunda línea, basado en el cultivo versus tratamiento empírico y ha encontrado que, en el primer caso, la tasa de erradicación fue del 86% versus 63% cuando no se tuvo en cuenta el

cultivo (115). Resultados similares han sido encontrados en otras investigaciones, con tasas de éxito finales de 95% (116). Sin embargo, varios autores han prescrito de manera empírica tres o cuatro tratamientos de rescate consecutivos, logrando una eficacia final acumulativa después de las mismas en prácticamente todos los pacientes (98-99%) (117, 118). En un estudio prospectivo de un único centro, en el cual se incluyeron 500 pacientes, se demostró que utilizando cuatro esquemas sucesivos de terapia empírica, la infección fue curada en el 99,5% de los pacientes con lo cual la importancia del cultivo hubiera sido marginal como consideran los autores (119).

Si se realizan cultivos y pruebas de susceptibilidad después del segundo tratamiento empírico fallido y el tercer tratamiento se basa en los resultados de susceptibilidad, se obtiene éxito en el 99% (120). Recientemente en Grecia (108), siguiendo parte de las recomendaciones de Maastricht III y teniendo en cuenta la resistencia a claritromicina inferior al 20%, se realizó un estudio iniciando triple terapia estándar durante diez días (OAC), seguida empíricamente por terapia cuádruple de rescate durante diez días (cuádruple con bismuto) y por no tener la disponibilidad del cultivo, se apartaron de esta recomendación, y la tercera terapia (segunda de rescate), se hizo empíricamente con una triple terapia, durante diez días, cambiando la claritromicina por levofloxacina (500 mg dos veces), obteniéndose una tasa de erradicación de 70% y acumulativa final de 90% de los 540 pacientes por intención de tratar y por protocolo del 98% (108). Este estudio demuestra que, sin necesidad de cultivo, la tasa de erradicación final fue excelente, desafiando las recomendaciones de Maastricht III (12). Sin embargo, sería necesario realizar un estudio, en el cual siguiendo las recomendaciones de ese consenso, se comparara el tercer esquema con base en pruebas de susceptibilidad versus la manera empírica.

Otro aspecto considerado sobre las pruebas de susceptibilidad es si estas deberían realizarse antes del primer tratamiento y al respecto la evidencia es contradictoria. En un estudio con más de 240 pacientes, se comparó la eficacia del tratamiento utilizando o no pruebas de susceptibilidad y se concluyó que no hubo diferencias significativas (121). Sin embargo, en otros dos estudios, se encontró lo contrario (122, 123), demostrando que las pruebas de susceptibilidad pretratamiento fueron útiles para elegir el mejor tratamiento.

Aunque varios expertos consideran que la utilidad del cultivo puede ser mínima o marginal (98, 108), otros lo consideran costo-eficaz (122, 124). Con base en las publicaciones discutidas previamente, consideramos que las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tienen algunas limitaciones, como son el costo, no ampliamente disponibles en todos los hospitales e incluso países, tasas de éxito

variables para recuperar *H. pylori* de las muestras gástricas y necesidad de endoscopia para tomar las muestras del estómago. Además la resistencia in vitro al metronidazol, no predice que así ocurrirá in vivo (125). Sin embargo, es necesario que en cada región se conozcan las características de resistencia para poder elegir el tratamiento empírico inicial; se necesitan más estudios comparativos aleatorizados y doble ciego que comparen la utilidad del cultivo en los diferentes escenarios de controversia para definir el lugar de esta herramienta clásicamente útil en las demás enfermedades infecciosas bacterianas. Consideramos que se necesita seguir investigando y mejorando los métodos de cultivo y recuperación de *H. pylori*, ya que siendo una enfermedad tan prevalente, con serias consecuencias, es necesario disponer del arsenal diagnóstico y terapéutico necesario para enfrentarla de manera similar a otras enfermedades infecciosas y no continuar investigando tratamientos con el método ensayo-error.

Otros antibióticos que se han utilizado en terapias de rescate son rifabutina (93, 126) y furazolidona como ya se mencionó. Con respecto a la rifabutina hay argumentos claros en contra de su utilización en terapias de erradicación de *H. pylori*. Los esquemas que la incluyen dan eficacia inferior a la lograda con levofloxacina 85% vs. 45% (126); puede producir mielotoxicidad irreversible, es costosa y en la actualidad se considera la piedra angular del tratamiento para *Mycobacterium tuberculosis*, especialmente en pacientes VIH positivos y su amplio uso puede generar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes (127, 128). Las diferentes opciones terapéuticas y sus componentes, se muestran en la tabla 2.

Los numerosos trabajos de investigación sobre tratamiento para *H. pylori* reflejan la seria dificultad que tienen los gastroenterólogos para su erradicación. Los tratamientos que inicialmente fueron eficaces progresivamente van perdiendo su tasa de éxito conforme el microorganismo desarrolla resistencia a los antimicrobianos, hasta el punto de que se han informado casos de *H. pylori* incurable o no erradicable después de más de cuatro tratamientos fallidos (129).

Un interesante enfoque para mejorar la eficacia de los antibióticos en la infección por *H. pylori* es la utilización de sistemas gastro-retentivos utilizando nanopartículas en sistemas mucoadhesivos, con el fin de evitar que los antibióticos se desplacen rápidamente del estómago y puedan ejercer un mayor efecto tópico (130). Utilizando partículas entre 550 y 900 nm el porcentaje de atrapamiento dentro del estómago con amoxicilina, claritromicina y omeprazol fueron 60 a 90% (130). La propuesta de este sistema de liberación es una esperanza para optimizar el tratamiento de *H. pylori*.

Tabla 2. Opciones terapéuticas para erradicar *H. pylori*.

| |
|--|
| Terapia triple clásica: 7 a 10 días |
| Subsalicilato de bismuto, tetraciclina 500 mg (3v/día), metronidazol 500 mg (3v/día) |
| Terapia triple estándar: 7 a 10 días |
| IBP dos veces al día, amoxicilina 1g (2v/día), claritromicina 500 mg (2v/día) o metronidazol 500 mg (3v/día) |
| Eficacia actual (en donde se le ha estudiado): 57 a 73% (7 días), 67 a 79% (10 días) |
| Inconvenientes: no utilizarla en áreas con resistencia a claritromicina >20% y/o metronidazol >40% |
| Terapia cuádruple: 7-10 días |
| IBP dos veces al día + terapia triple clásica |
| Eficacia: 7-10 días: 74% |
| Inconvenientes: múltiples tabletas, menor adherencia |
| Terapia cuádruple en una sola cápsula: 10 días |
| Una cápsula con bismuto biscalitrato+metronidazol+tetraciclina más IBP dos veces al día |
| Eficacia: USA 87% Europa 93% |
| Inconvenientes: no está comercializada |
| Terapia secuencial: 10 días. |
| IBP dos veces al día 10 días |
| Amoxicilina 1g (2v/día) primeros cinco días |
| Claritromicina 500 mg (2v/día) + tinidazol 500 mg (2v/día): últimos cinco días |
| Eficacia: 80-93% |
| Inconvenientes: resistencia dual (claritromicina/metronidazol) |
| Terapias concomitantes (terapias cuádruples sin bismuto): 7 a 14 días |
| IBP (2v/día), amoxicilina 1g (2v/día), claritromicina 500 mg (2v/día) y tinidazol 500 mg (2v/día) o metronidazol 500 mg (2v/día) |
| Eficacia: 91,7% |
| Triplas terapias con levofloxacina: 7 a 10 días |
| IBP (2v/día), amoxicilina 1g (2v/día), levofloxacina 500 mg (1 a 2v/día) o 250 mg (2v/día) |
| Eficacia: |
| Primera línea 84 a 96%, promedio 90% |
| Segunda línea: 60% a 94%, promedio 80% |
| Tercera línea: 60% a 70% |
| Alérgicos a penicilina |
| Levofloxacina 500 mg dos veces al día 7 días |
| Claritromicina 500 mg dos veces al día 7 días |
| IBP dos veces al día 7 días |
| Eficacia: 87% |
| Claritromicina 500 mg dos veces al día |
| Metronidazol 500 mg tres veces al día |
| IBP dos veces al día |
| Inconvenientes: alta resistencias a claritromicina y metronidazol. |

CONCLUSIONES

1. La infección por *H. pylori* debe tratarse como cualquier otra enfermedad infecciosa, siendo necesario tener en cuenta la identificación de resistencia/susceptibilidad en cada región. Consideramos necesario verificar la erradicación en todos pacientes tratados 4-6 semanas después de terminar el tratamiento y más aún en los pacientes con las patologías orgánicas definidas (diferentes a dispepsia funcional).
2. Las opciones empíricas de tratamiento de *H. pylori* incluyen terapias triples como la estándar, triples con levofloxacina, terapias secuenciales, terapias concomitantes y terapias cuádruples. En diferentes situaciones el orden de utilización depende de las experiencias locales, pero todas pueden ser incluso de primera línea excepto las cuádruples que hasta el momento se siguen considerando de rescate.
3. Las tasas de erradicación de los esquemas actualmente utilizados de manera empírica para erradicar *H. pylori* son inferiores al 90%.
4. La triple terapia estándar (IBP + amoxicilina + claritromicina/metronidazol) ha perdido notablemente la eficacia en la mayoría de los países en donde se le ha investigado recientemente. Sigue siendo útil en poblaciones con bajas tasas de resistencia a la claritromicina/metronidazol y polimorfismos del CYP2C19 de metabolizadores lentos como el Japón por ejemplo. Esto implica que para declarar no eficaz esta terapia debe demostrarse en cada país.
5. La terapia secuencial de mayor difusión en el momento (IBP diez días, amoxicilina 5 días y claritromicina + tinidazol cinco días), no tiene alta eficacia en todos los sitios y no sería una buena elección en donde exista alta resistencia a la claritromicina y al metronidazol.
6. La terapia dual con altas dosis de amoxicilina y de IBP está resurgiendo como una terapia con tasas de erradicación aceptables en países como Japón, que tienen el polimorfismo de metabolizadores lentos en el CYP2C19.
7. Los ensayos clínicos siempre deberían incluir la determinación de resistencia antibiótica de *H. pylori* pretratamiento con el fin de poder determinar la utilidad de los antibióticos prescritos en futuros tratamientos.
8. En general, de acuerdo a las actuales recomendaciones de Maastricht III, la estrategia de erradicación empírica debería contemplar terapias de primera y segunda línea y si hay fracaso, la próxima terapia debería basarse en los resultados del cultivo; sin embargo, esta recomendación recientemente fue desafiada, logrando adecuadas tasas de erradicación, con una tercera terapia triple con levofloxacina, sin necesidad de utilizar el cultivo para

guiar esta última. Para Colombia no tenemos una estrategia terapéutica definitiva, basada en estudios locales, aunque se esperan los resultados de ensayos clínicos (Otero, Trespalacios). Nuestro enfoque terapéutico consiste en iniciar terapia triple estándar, verificar la erradicación con antígenos fecales, si hay fracaso terapéutico dar empíricamente triple terapia con levofloxacina, verificar la erradicación y si no funciona, terapia cuádruple concomitante o hacer cultivos, si están disponibles, específicamente si se tienen los recursos económicos para el mismo.

9. Los esquemas que tienen levofloxacina han demostrado eficacia bien sea como terapia inicial (primera línea) o como terapia de rescate en 2da, 3a y 4a línea. Sería una opción para los alérgicos a la penicilina.
10. Es necesario que en cada región, se adopten terapias secuenciales locales escogiendo sus componentes, con base en el conocimiento de las pruebas de susceptibilidad y farmacocinética de los antimicrobianos.

Contribución específica de los autores

Garantizador del artículo: William Otero, MD, quien tuvo la idea original, diseñó la organización del mismo y revisó críticamente la literatura. Trespalacios AA, MSc, y Otero E, MD, revisaron y complementaron el manuscrito. Todos los autores aprobaron el contenido del documento final.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Agradecimientos

Al doctor Héctor Sandoval y a la doctora Catalina Torres por la lectura crítica del manuscrito y por las sugerencias sobre el mismo.

REFERENCIAS

1. Fallush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003; 299: 1582-5.
2. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu HA, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915-18.
3. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-5.
4. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 205-14.

5. Suebaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002; 347: 1175-86.
6. Report of the Digestive Health Initiative International Update. Conference on *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1997; 113 (Suppl): S4-S8.
7. Saad R, Chey W. A clinician's guide to managing *Helicobacter pylori* infection. Clev Clin J Med 2005; 72: 109-124.
8. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. Gut 1998; 43: S6-S9.
9. Otero W, Gómez M, Trespalacios AA. *Helicobacter pylori*: después de todo. Temas escogidos de gastroenterología. Asociación Colombiana de Gastroenterología 2007: 43-56.
10. Muhsen K, Cohen D. *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and metatanalysis. Helicobacter 2008; 13: 323-40.
11. Stasi R, Satparwari A, Segal JB, Osborn J, Evangelista ML, Cooper N, et al. Effects of eradication *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. Blood 2009; 113: 1231-40.
12. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht III consensus report. Gut 2007; 56: 772-81.
13. Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2007; 133: 985-1001.
14. Ishack RAH, Awad GAS, Mortada ND, Nour SAK. Preparation in vitro and in vivo evaluation of stomach specific metronidazole loaded alginate beads as local anti *Helicobacter pylori* therapy. J Control release 2007; 119: 207-14.
15. Graham DY, More MP. Variability in the outcome of treatment of *Helicobacter pylori* infection: a critical analysis. En: Hunt RH, Tytgat GNJ (edit) *Helicobacter pylori*: basic mechanisms to clinical cure Dordrecht Kluwer Academic Publisher 1994. p. 426-40.
16. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2008; 5: 321-31.
17. Erah P, Goddard A, Barrett D, Shaw PN, Spiller RC. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. J Antimicrobial Chemother 1997; 39: 5-12.
18. Lewis K. Persisted cells, dormancy and infectious disease. Nature Rev. Microbiol 2007; 5: 48-56.
19. Coticchia JM, Sugawa C, Tran VR, Gurrola J, Wowalski E, Carron MA. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer. J Gastrointest Surg 2006; 10: 883-889.
20. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. The life and death of *Helicobacter pylori*. Gut 1998; 43: S56-S60.
21. Midolo PD, Turnidge JD, Lambert JR. Bactericidal activity and synergy studies of proton pump inhibitors and antibiotics against *Helicobacter pylori* in vitro. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 331-7.
22. Goddard AF, Jessa MJ, Barrett DA, Shaw PN, Idstrom JP, Cederberg C, et al. Effect of omeprazole on the distribution of metronidazole, amoxicillin and clarithromycin in lumen gastric juice. Gastroenterology 1996; 111: 358-67.
23. Treiber G, Malfertheiner P, Klotz U. Treatment and dosing of *Helicobacter pylori* infection: when pharmacology meets clinic. Expert Opin 2007; 8: 329-50.
24. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Chise K, Masafumi N, Mutsuhiro I, et al. Evidence that the degree and duration of acid suppression are related to *Helicobacter pylori* eradication by triple therapy. Helicobacter 2007; 12: 317-23.
25. Villoria A, García P, Clavet X, Gisbert JP, Vergara EM. Meta-analysis: high-dose proton pump inhibitors vs. Standard dose in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther 2008; 28: 868-77.
26. Horai Y, Kimura M, Furuie H, Matzuguma K, Irie S, Koga Y, et al. Pharmacodynamic effects and kinetic disposition of rabeprazole in relation to CYP2C19 genotypes. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 793-803.
27. Padol S, Yuan Y, Thabane M, Padol IT, Hunt RH. The effect of CYP2C19 polymorphisms on *H. pylori* eradication rate in dual and triple first-line PPI therapies: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2006; 101: 1467-75.
28. Shirai N, Sugimoto M, Kodaira C, Nishino M, Ikuma M, Kajimura M, et al. Dual therapy with high doses of rabeprazole and amoxicillin versus triple therapy with rabeprazole, amoxicillin, and metronidazole as a rescue regimen for *Helicobacter pylori* infection after standard triple therapy. Eur J Clin Pharmacol 2007; 63: 743-9.
29. Furuta T, Shirai N, Kodaira M, Sugimoto M, Nogaki A, Kutiyama S, et al. Pharmacogenomics-based tailored versus standard therapeutics regimen for eradication of *H. pylori*. Clin Pharmacol Ther 2007; 81: 521-8.
30. Oasim A, O'Morain O, O'Connor HJ. *Helicobacter pylori* eradication: role of individual therapy constituents and therapy. Fun Clin Pharmacol 2008; 43-52.
31. Ishizaki T, Horai Y. Review article: cytochrome P450 and the metabolism of proton pump inhibitors-emphasis on rabeprazole. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13(Suppl 3): 27-36.
32. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Kodaira C, Nishino M, Yamade M, et al. Treatment strategy to eradicate *Helicobacter pylori*: impact of pharmacogenomics-based acid inhibition regimen and alternative antibiotics. Expert Opin Pharmacother 2007; 8: 2701-17.
33. Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. Int J Clin Pharmacol 2006; 44: 297-302.
34. Saitoh T, Fukusshima Y, Otsuka H, et al. Effects of rabeprazole, lansoprazole, and omeprazole on intragastric pH in CYP2C19 extensive metabolizers. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 1811-7.
35. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 280-322.
36. Suzuki T, Matsuo K, Sawaki A, Kawai K, Hirose K, Hito H, et al. Influence of smoking and CYP2C19 genotypes on

- H. pylori* eradication success. *Epidemiol Infect* 2007; 135: 171-6.
37. Hopkins RJ. In search of the Holy Grail of *Helicobacter* remedies. *Helicobacter* 2001; 6:81-3.
 38. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved. Sequential therapy and beyond. *Drugs* 2008; 68: 725-36.
 39. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* 2007; 4: 257-8.
 40. George LL. Cure of duodenal ulcer after eradication of *Helicobacter pylori*. *Med J Aust* 1990; 153: 145-9.
 41. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter pylori* Study Group. *Gut* 1997; 41: 8-13.
 42. Bazzoli F, Zagari RM, Fossi S, Pozzato P, Roda A, Roda E. Short term low-dose triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 773-77.
 43. Howden CW, Hunt RH. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori*. Ad Hoc Committee on practice parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2330-8.
 44. Lam SK, Talley NJ. Report of the 1997 Asia Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1-12.
 45. Bytzer P, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2005; 10(Suppl 1):40-46.
 46. Wolle K, Malfertheiner P. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 315-24.
 47. Chey WD, Wong BCY. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-25.
 48. Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
 49. Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, et al. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-63.
 50. Zagari RM, Bianchi-Porro G, Fiocca R, Gasbarrini G, Roda E, Bazzoli F. Comparison of 1 and 2 weeks of omeprazole, amoxicillin and clarithromycin treatment for *Helicobacter pylori* eradication: The HYPER study. *Gut* 2007; 56: 475-9.
 51. Sharma VK, Howden CW. A national survey of primary care physician's perceptions and practice related to *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 326-31.
 52. Shirin H, Birkenfeld S, Shevah O, Levine A, Epstein J, Boaz M, et al. Application of Maastricht 2-2000 guidelines for the management of *Helicobacter pylori* among specialists and primary care physicians in Israel: are we missing the malignant potential of *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 322-5.
 53. Gutiérrez O, Otero W. Resistencia de *Helicobacter pylori* al Metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroenterol* 1998; 12: 31-5.
 54. Henao S, Otero W, Ángel LA, Martínez J. Resistencia Primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá Colombia *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24: 10-5.
 55. Trespalacios AA, Díaz G, Mercado M, Muñoz A, Navarro J. *Helicobacter* 2007; 12: 452 Abstract No.: P130.
 56. Adamek RJ, Suerbaum S, Pfaffenbach B, Opferkuch W. Primary and acquired *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole, and amoxicillin-influence on treatment outcome. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 386-9.
 57. Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Sato R, Kodama M, Nasu M. Drug combinations with amoxicillin reduces selection of clarithromycin resistance during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 67-70.
 58. Gisbert JP, Pajares JM. Review article: *Helicobacter pylori* "rescue" regimen when proton pump inhibitor-based triple therapy fails. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1047-57.
 59. Gisbert JP. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5385-5402.
 60. Katelaris PH, Forbes GM, Talley NJ, Crotty B. A randomized comparison of quadruple and triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication. The QUADRATE study. *Gastroenterology* 2002; 123: 1763-9.
 61. Laine L, Hunt R, El-Zimaity H, B. Nguyen, Osato M, Spenard J. Bismuth-based quadruple therapy using a single capsule of bismuth biscalcitrato, metronidazole and tetracycline given with omeprazole versus omeprazole, amoxicillin and clarithromycin for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients: a prospective, randomized, multicenter, North American Trial. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 562-7.
 62. O'Morain C, Borody T, Farley A, de Boer WA, Dallaire C, Schuman R, et al. Efficacy and safety of single triple capsules of bismuth biscalcitrato, metronidazole, and tetracycline, given with omeprazole. For the eradication of *Helicobacter pylori*: an international multicenter study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 415-20.
 63. Gutiérrez O, Otero W, Cardona H, Quintero F. Terapia cuádruple con furazolidona como tratamiento de rescate para la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev. Col Gastroenterol* 2003; 18: 222-8.
 64. Daghighzadeh, H, Hasan M, Karimi S, Raisi M. One-week versus two-week furazolidone-based quadruple therapy as the first-line treatment for *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1399-1403.
 65. Zaterka S, Eisig JN. Quadruple therapy with furazolidone for retreatment in patients with peptic ulcer disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6224-6227.
 66. Akheri H, Merat S, Hosseini V, Malekzadeh R. Low-dose furazolidone in triple and quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:89-93.

67. Isakov V, Domareva I, Koudryavtseva L, Maev I, Ganskaya Z. Furazolidone-based triple 'rescue therapy' vs. quadruple 'rescue therapy' for the eradication of *Helicobacter pylori* resistant to metronidazole. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 1277-82.
68. Sotoudehmanesh R, Malekzadeh R, Vahedi H, Dariani NE, Asgari AA, Massarrat S. Second-line *Helicobacter pylori* eradication with a furazolidone-based regimen in patients who have failed a metronidazole-based regimen. *Digestion* 2001; 64: 222-5.
69. Treiber G, Ammon S, Malferttheiner P, Klotz U. Impact of furazolidone-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* after previous treatment failures. *Helicobacter* 2002; 7: 225-31.
70. Lu H, Zhang DZ, Hu PJ, Li ZS, Lu XH, Fang XC, et al. One-week regimens containing ranitidine bismuth citrate, furazolidone and either amoxicillin or tetracycline effectively eradicates *Helicobacter pylori*: a multicentre, randomized, double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1975-9.
71. Liu WZ, Xiao SD, Hu PJ, Lu H, Cui Y, Tytgat GN. A new quadruple therapy for *Helicobacter pylori* using tripotassium dicitrato bismuthate, furazolidone, josamycin and famotidine. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1519-22.
72. Wong WM, Wong BC, Lu H, Gu Q, Yin Y, Wang WH, et al. One-week omeprazole, furazolidone and amoxicillin rescue therapy after failure of *Helicobacter pylori* eradication with standard triple therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 793-8.
73. Malekzadeh R, Ansari R, Vahedi H, Shiyavoshi F, Alizadeh BZ, Eshraghian MR, et al. Furazolidone versus metronidazole in quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 299-303.
74. Graham DY, Osato MS, Hoffman J, Opekun AR, Anderson SY, El Zimaity HM. Furazolidone combination therapies for *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 211-15.
75. Segura AM, Gutiérrez O, Otero W, Ángel A, Genta RM, Graham DY. Furazolidone, amoxicillin, bismuth triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 529-32.
76. Dani R, Queiroz DM, Díaz MG, Franco JM, Magalhaes LC, Méndez GS, et al. Omeprazole, clarithromycin and furazolidone for the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1647-52.
77. Eisig JN, Silva FM, Navarro Rodríguez T, Malferttheiner P, Filho MJP, Saterka S. Efficacy of a 7-day course of furazolidone, levofloxacin, and lansoprazole after failed *Helicobacter pylori* eradication. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 38-43.
78. Tatsuta M, Lash H, Baba M, Taniguchi H. Attenuating effect of the monoamine oxidase inhibitor furazolidone on the anticarcinogenic effect of cysteamine on gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Int J Cancer* 1991; 48: 605-608.
79. Ahmed HH, El-Aziem SH, Abdel-Wahhab MA. Potential role of cysteine and methionine in the protection against hormonal imbalance and mutagenicity induced by furazolidone in female rats. *Toxicology* 2008; 243: 31-42.
80. De Francesco V, Lerardi E, Hassan C, Zullo A. Furazolidone Therapy for *Helicobacter pylori*: Is effective and safe? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1915-16.
81. Vaira D, Zulo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, et al. Sequential therapy versus standard triple drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-63.
82. Jaffri N, Hornung CA, Howden CW. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann Intern Med* 2008; 148: 1-9.
83. Essa AS, Kramer JR, Graham DY, Treiber G. Meta-analysis: four drug, three-antibiotic, non bismuth containing "concomitant therapy" versus triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2009; 14: 109-18.
84. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Troiani I, Bertini O, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med* 2006; 144: 94-100.
85. Nakagawa I, Matsuzaki J, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Nakagawa I, et al. Efflux pumps contribute to clarithromycin resistance in *H. pylori*. *AGA 2009; Gastroenterology Suppl 1: Abstract M1051*.
86. Sánchez-Delgado J, Calvet X, Bujanda L, Gisbert J, Titó L, Castro M, Ten Day sequential treatment for *Helicobacter pylori* eradication in clinical practice. *Am J gastroenterol* 2008; 103: 1-4.
87. Park S, Chun HJ, Kim ES, Patk SC, Jung ES, Lee SD, et al. The 19-day sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Korea: Less effective than expected. *AGA 2009, Gastroenterologia Suppl 1: Abstract M1053*.
88. Nagahara A, Miwa H, Ogawa K, Yamada T, Kurosawa A, Ohkura R, et al. Addition of metronidazole to rabeprazole-amoxicillin-clarithromycin regimen for *Helicobacter pylori* infection provides an excellent cure rate with five day therapy. *Helicobacter* 2000; 5: 88-93.
89. Neville PM, Everett S, Langworthy H, Tompkins D, Mapstone NP, Axon ATR, et al. The optimal antibiotic combination in a 6-day *Helicobacter* eradication regimen. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 497-501.
90. Okada M, Nishimura H, Kawashima M, Okabe N, Maeda K, Deo M, et al. A new quadruple therapy for *Helicobacter pylori*: influence of resistant strains on treatment outcome. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 769-74.
91. Treiber G, Ammon S, Schneider E, Klotz U. Amoxicillin, metronidazole, omeprazole clarithromycin: a new, short quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 1998; 3: 54-68.
92. Wu DC, Hsu PI, Wu JY, Opekun AR, Graham DY. Randomized controlled comparison of sequential and quadruple (concomitant) therapies for *H. pylori* infection. *Gastroenterology* 2008; 134: A24.

93. Moayyedi P, Soo, Deeks J, Delaney B, Harris A, Innes M, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD002096.
94. Schito AM, Schito GC. Levofloxacin, a broad spectrum anti infective: from *Streptococcus pneumoniae* to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemoter* 2004;16 (Suppl 2): 3-7.
95. Candelli M, Nista EC, Carloni E, Pignataro G, Zocco MA, Cazzato A, et al. Treatment of *H. pylori* infection: a review. *Curr Med Chem* 2005; 12: 375-84.
96. Just PM. Overview of the fluoroquinolone antibiotics. *Pharmacotherapy* 1993; 13:4S-17S.
97. Croom KF, Goa KL. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. *Drugs* 2003; 63: 2769-802.
98. Nista EC, Candelli M, Zocco MA, Cremonini F, Ojetti V, Finizio R, et al. Levofloxacin-Based Triple Therapy in First-Line Treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1985-90.
99. Giannini EG, Bilarde C, Dulbecco P, Mamone M, Santi ML, Testa R, et al. Can *Helicobacter pylori* eradication regimens be shortened in clinical practice? An open-label, randomized, pilot study of 4 and 7-day triple therapy with rabeprazole, high dose levofloxacin and tinidazole. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 515-520.
100. Gisbert JP, Fernández M, Molina J, Pérez A, Prieto B, Matos JM, et al. First line triple therapy with levofloxacin for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimen Pharmacol Ther* 2007; 26: 495-500.
101. Nista EC, Candelli M, Zocco MA, Cremonini F, Ojetti M, Finizio R, et al. Levofloxacin-based triple therapy in first line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1985-90.
102. Schrauwen RWM, Jannssen MJR, de Boer WA. Seven-day PPI triple therapy with levofloxacin is very effective for *Helicobacter pylori* infection. *J Med* 2009; 67: 96-101.
103. Cheng HC, Chang WL, Chen WY, Yang HB, WU JJ, Sheu BS. Levofloxacin-containing triple therapy to eradicate the persistent *H. pylori* after a failed conventional triple therapy. *Helicobacter* 2007; 12: 359-63.
104. Perna F, Zullo A, Ricci C, Hassan C, Morini S, Vaira D. Levofloxacin -based triple therapy for *Helicobacter pylori* re-treatment: role of bacterial resistance. *Dig Liv Dis* 2007; 39: 1001-5ç.
105. Gisbert JP, Bermejo F, Castro M, Aisa A, Fernández M, Tomas A, et al. Second Line therapy with levofloxacin after *H.pylori* treatment failure: a Spanish multicenter study of 300 patients. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 71-6.
106. Di Caro S, Franceschi F, Mariani A, Thompson F, Raimondo D, Masci E, Testoni A, et al. Second line levofloxacin based triple schemes for *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Liv Dis* 2009; 41: 480-85.
107. Gisbert JP, Castro M, Bermejo F, Pérez A, Ducons J, Fernández M, Bory F, et al. Third line rescue therapy with levofloxacin after two *H. pylori* treatment failures. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 243-7.
108. Rokkas T, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G, Pistiolas D. Cumulative *H. pylori* eradication rates in clinical practice by adopting first and second line regimens proposed by the Maastricht III consensus and a third line empirical regimen. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 21-5.
109. Kwok A, Lam P, Katelaris P, Leong RWL. *Helicobacter pylori* eradication therapy: indications, efficacy and safety. *Expert Opin Drug Saf* 2008; 7: 271-81.
110. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, et al. Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* 2006; 11: 243-9.
111. Carothers JJ, Bruce MG, Hennessy TW, Bensler M, Morris JM, Reasonover AL, et al. The relationship between previous fluoroquinolone use and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis* 2007; 44:e5-8.
112. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, et al Update on fluoroquinolones resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-96.
113. Nishizawa T, Suzuki H, Kurabayashi K, Masaoka T, Muraoka H, Mori M, et al. Gatifloxacin resistance and mutations in *gyrA* after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication in Japan. *Antimicrob Agents Chemoter* 2006; 50: 1538-40.
114. Zullo A, Hassan C, Lorenzetti R, Wins S, Morini S. A clinical practice viewpoint: to culture or not to culture *Helicobacter pylori*? *Dig Liver Dis* 2003; 35: 357-61.
115. Yahav J, Samra Z, Niv Y, Evans CT, Passaro DJ, Dinari G, Shmuly H. Susceptibility-guided vs. empiric retreatment of *Helicobacter pylori* infection after treatment failure. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2316-2.
116. Lamouliatte H, Megraud F, Delchier JC, Bretagne JF, Courillon A, DE Korwin JD, et al. Second line treatment for failure to eradicate *Helicobacter pylori*: a randomized trial comparing four treatment strategies. *Alimen Pharmacol Ther* 2003; 18: 791-7.
117. Gisbert JP, Gisbert JL, Marcos S, Pajares JM. Empirical *Helicobacter pylori* "rescue" therapy after failure of two eradication treatments. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 7-12.
118. Treiber G, Ammon S, Malferttheiner P, Klotz U. Impact of furzolidone-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* after previous treatment failures. *Helicobacter* 2002; 7: 225-31.
119. Gisbert JP, Gisbert JL, Marcos S, Jimenez-Alonso I, Moreno-Otero R, Pajares JM. Empirical rescue therapy after *Helicobacter pylori* treatment failure: a 10 year single-centre study of 500 patients. *Alimen Pharmacol Ther* 2008; 27: 346-54.
120. Vicente R, Sicilia B, Gallego S, Revillo MJ, Ducons J, Gomollón F. *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer after two treatment failures: a prospective culture guided study. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25: 438-42.

121. Neri M, Milano A, Laterza F, Di Bonaventura G, Piccolomini R, Caldarella MP, et al. Role of antibiotic sensitivity testing before first-line *Helicobacter pylori* eradication treatments. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 821-7.
122. Romano M, Mamo R, Cuomo A, DE Simone T, Mucherino C, Iovene MR, et al. Pretreatment antimicrobial susceptibility testing is cost saving in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 273-8.
123. Toracchio S, Cellini L, Di Campli E, Cappello G, Malatesta MG, Ferri A, et al. Role of antimicrobial susceptibility testing on efficacy of triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1639-43.
124. Breuer T, Graham DY. Costs of diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection: when does choosing the treatment regimen based on susceptibility testing become cost effective? *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 725-9.
125. Fischbach IA, Van Zanten SV, Dickason J. Meta-analysis: The efficacy adverse events and the adherence related to first-line anti *Helicobacter pylori* quadruple therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1071-82.
126. Gisbert JP, Gisbert JL, Marcos S, Moreno-Otero R, Pajares JM. Third line rescue therapy with levofloxacin is more effective than rifabutin rescue regimen after two *Helicobacter pylori* treatment failures. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1469-74.
127. Luccio F, Laterza L, Zagari RM, Cennamo V, Grilli D, Bazzoli F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2008; 337: 746-50.
128. Fuccio L, Zagari RM, Bazzoli F. What is the best salvage for patients with *Helicobacter pylori* infection? *Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 608-9.
129. Dore MP, Marras J, Maragkoudakis E, Nieddu S, Manca A, Graham DY. Salvage therapy after two or none prior *Helicobacter pylori* treatment failures: the super salvage regimen. *Helicobacter* 2003; 8: 307-9.
130. Ramteke S, Ganesh N, Bhattacharya S, Hain NK. Amoxicillin, clarithromycin, and omeprazole based targeted nanoparticles for the treatment of *H. pylori*. *J Drugs Targ* 2009; 17: 225-34.

Prevalencia de la resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos

Introducción

Para comprender la problemática que gira alrededor de la falla terapéutica de la terapia triple estándar (Inhibidor de la bomba de protones + amoxicilina + claritromicina o metronidazol) en la infección causada por *H. pylori*, es necesario conocer el estado actual de arte. Para ello es fundamental conocer la prevalencia de resistencia primaria de la bacteria a los antimicrobianos utilizados en estas terapias. En Colombia el antimicrobiano más estudiado ha sido metronidazol, seguido por claritromicina, solo un estudio ha sido realizado para investigar la resistencia de la bacteria a amoxicilina, y este fue realizado al sur del país, por lo tanto no existe información de la resistencia a este antibiótico en Bogotá. Por estas razones este capítulo presentará un artículo que muestra los resultados de la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos utilizados en la terapia triple estándar por primera vez en la ciudad de Bogotá. Adicionalmente se presenta el análisis de la relación que puede existir entre el genotipo de virulencia con el perfil de susceptibilidad a cada uno de los antibióticos estudiados.

De este estudio se puede concluir que hay una prevalencia elevada de resistencia a los tres principales antibióticos utilizados en las terapias de erradicación que se utilizan en nuestro medio y que por lo tanto otras alternativas de terapia deben ser investigadas para el tratamiento de la infección.

Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos

Helicobacter pylori resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients

Alba Alicia Trespacios, MSc, Cand PhD,¹ William Otero Regino, MD,² Marcela Mercado Reyes, Bact MSc.³

¹ Profesora Asociada departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Coordinadora Especialización en Microbiología Médica Pontificia Universidad, Bogotá, Colombia.

² Profesor Asociado de Medicina, Coordinador Unidad de Gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo, Clínica Fundadores, Bogotá, Colombia.

³ Profesora Asistente Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 01-12-09
Fecha aceptado: 02-02-10

Resumen

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un patógeno universal, que infecta a más de la mitad de la población mundial. En las últimas dos décadas, el tratamiento recomendado para su erradicación, como esquema de primera línea, es la triple terapia estándar, constituida por un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol. En los últimos años la eficacia de esta terapia ha declinado, debido especialmente a la resistencia de la bacteria a metronidazol y a claritromicina.

Objetivos: En este estudio, se evaluó la prevalencia de resistencia primaria de cepas colombianas de *H. pylori* a metronidazol, claritromicina, amoxicilina. Además, se analizaron los genotipos de *vacA* y *cagA* de las cepas aisladas y la correlación entre los marcadores de virulencia y la resistencia a claritromicina, amoxicilina y metronidazol. **Métodos:** La resistencia a metronidazol, amoxicilina y claritromicina fue determinada por el método de E-test. Se extrajo el ADN genómico y variantes alélicas de *vacA* y *cagA* fueron identificadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados:** La resistencia a metronidazol fue de 81,01% (IC 95% 70,3%-88,6%), a amoxicilina de 3,8% (IC 95% 0-8,6%) y a claritromicina de 17,72% (IC 95% 10,37-28,29). No se encontró asociación significativa entre el genotipo de patogenicidad y la resistencia o susceptibilidad a los antimicrobianos cuando los valores de CIM de cada antibiótico se compararon con los diferentes genotipos *cagA* y *vacA*. **Conclusión:** Encontramos una alta tasa de resistencia a los tres principales antibióticos utilizados en la mayoría de los esquemas exitosos de erradicación de la infección, lo cual implica la necesidad de investigar, con prioridad, nuevos esquemas de tratamiento para la erradicación de la infección en Colombia.

Palabras clave

Helicobacter pylori, genotipos, claritromicina, amoxicilina, metronidazol.

Summary

Helicobacter pylori (*H. pylori*), is a universal pathogen that infects more than half the world population. In the last two decades, the recommended treatment for its eradication, as first-line scheme is the standard triple therapy, consisting of an inhibitor of the proton pump, clarithromycin and amoxicillin or metronidazole. In recent years the effectiveness of this therapy has declined, especially due to the resistance of bacteria to metronidazole and clarithromycin.

Objectives: In this study, we evaluated the prevalence of primary resistance of Colombian *H. pylori* isolates to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin. In addition, the *vacA* and *cagA* genotypes of strains isolated were determined and associated to correlate the virulence markers and antibiotic resistance. **Methods:** Minimum inhibitory concentration (MIC) for metronidazole, clarithromycin and amoxicillin were determined by E-test method. Genomic DNA was extracted, and allelic variants of *vacA* and *cagA* were identified by the polymerase chain reaction (PCR). **Results:** Resistance to metronidazole was 81.01% (IC95% 70.3%-88.6%), to amoxicillin 3.8% (IC 95% 0-8.6%), and to clarithromycin 17.72% (IC95% 10.37-28.29). No significant correlation between pathogenicity and resistance or susceptibility was detected when MIC values for each antibiotic were compared with different *vacA* and *cagA* genotypes. **Conclusion:** We find a high rate of resistance to three principal antibiotics used in the majority of the successful schemes of eradication of the infection, which implies the need to investigate with priority new schemes of treatment for the eradication of the infection in Colombia.

Key words

Helicobacter pylori, genotypes, clarithromycin, amoxicillin, metronidazole.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un patógeno universal, que infecta a más de la mitad de la población mundial (1, 2) y es el principal agente etiológico de gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma MALT gástrico y adenocarcinoma gástrico (1-3), aunque las consecuencias finales de la infección dependen de factores genéticos del huésped, factores mediambientales externos y la infección por genotipos más virulentos de *H. pylori* como *cagA* (+) y *vacA* s1m1 (4, 5). En las últimas dos décadas, el tratamiento recomendado para su erradicación como esquema de primera línea es la triple terapia estándar constituida por un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol (6-8). Sin embargo, la eficacia de este esquema tradicional, que inicialmente era del 90% (9-11), de manera progresiva ha disminuido en muchas partes del mundo y llega en la actualidad a cifras de 57-73% cuando la duración es de siete días, y de 67-79% cuando la duración es de diez días (10), lo que significa que la eficacia aumenta aproximadamente 6% cuando el tratamiento dura diez días en comparación con siete días, pero aun así, es menor del 80% y no alcanza resultados óptimos. La declinación en la eficacia consistentemente encontrada en la actualidad, se considera que se debe fundamentalmente al progresivo aumento de la resistencia primaria de *H. pylori* a la claritromicina y al metronidazol (8-12). Por lo anterior, es importante evaluar la prevalencia de resistencia primaria de *H. pylori* a estos tres antimicrobianos clave, que son la estructura de la terapia triple estándar ya que todavía se recomienda como la terapia de elección de primera línea (8, 9), pero con la precaución de utilizar antibióticos diferentes cuando la resistencia local a los mismos esté por encima de ciertos valores que comprometerían su eficacia como son, 15-20% para claritromicina y 40% para metronidazol (9). Uno o más de estos antibióticos también se utilizan en la mayoría de los esquemas que son exitosos en la erradicación de *H. pylori* (9, 10). Por lo tanto, es necesario determinar los niveles de resistencia a los mismos ya que con base en esa información, se podría planear la elección de los antimicrobianos en la práctica clínica (11). En nuestro medio, hace más de una década, un grupo encontró una tasa de resistencia a metronidazol del 82%, utilizando la prueba de E-test (13), la cual puede sobrestimar la tasa de resistencia de *H. pylori* si se le compara con la técnica de dilución en agar, que es considerada el estándar de oro para determinar la resistencia a metronidazol (14), y además se desconoce la prevalencia de resistencia primaria a claritromicina y a amoxicilina, así como si existe relación entre los diversos genotipos de *H. pylori* y la resistencia a los antimicrobianos, aspecto que hasta donde investigamos, no ha sido estudiado en nuestro

país. De acuerdo a lo anterior, se decidió realizar el presente trabajo, con los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia de resistencia primaria de *H. pylori* a los tres antibióticos considerados los más importantes en las terapias de erradicación: claritromicina, metronidazol y amoxicilina.
2. Establecer si el genotipo de *H. pylori* *cagA* y *vacA* positivos y los diferentes subtipos de este último, se asocian con la resistencia a los diferentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo de prevalencia analítica, realizado en la unidad de gastroenterología de la Clínica Fundadores, de Bogotá-Colombia, y el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, de Bogotá-Colombia, durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y junio de 2009. Se incluyeron prospectivamente pacientes mayores de 18 años que fueron remitidos a endoscopia digestiva alta en la Clínica Fundadores, por dispepsia o síntomas de reflujo gastroesofágico que no habían recibido tratamientos previos de erradicación de *H. pylori* como tampoco antibióticos o sales de bismuto durante el último año, o antisecretores, por lo menos un mes antes de la endoscopia realizada para ingresar al presente estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de ingresar al estudio, después de una explicación completa y detallada sobre este. Tanto el protocolo de investigación como el consentimiento informado fueron aprobados por el comité de ética e investigación de la institución en la cual se realizó el estudio.

Criterios de exclusión

Enfermedades concomitantes serias: insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), accidente cerebrovascular (ACV), diabetes descompensada, alteraciones de la coagulación, cirrosis, cirugía gástrica previa, embarazadas o que estén lactando, adicción a drogas o alcohol, o enfermedades psiquiátricas, infección por VIH, anticoagulados y los que tuvieran cáncer o recibieran quimioterapia.

A todos los pacientes, la endoscopia digestiva se les realizó por la mañana, después de un ayuno mínimo de seis horas, en decúbito lateral izquierdo, en la forma usual (15) y siguiendo las recomendaciones generales para la limpieza de los endoscopios (15). No se utilizó sedación y a todos se les aplicó lidocaína en atomizador (Roxicaina, solución tópica, Ropsohn Therapeutics) utilizando dos aplicaciones (20 mg), para anestesiar la faringe. El equipo utilizado para la EVDA fue un Olympus Exera CV 145. Durante la endoscopia digestiva alta, se tomaron seis biopsias del antro a dos

centímetros del píloro (tres de la curvatura mayor y tres de la curvatura menor) y seis biopsias del cuerpo a ocho centímetros del cardias (tres de la curvatura menor y tres de la curvatura mayor), siguiendo el protocolo de toma de biopsias recomendado por expertos (16, 17). De estos grupos de biopsias, dos del antro y dos del cuerpo fueron utilizadas para estudio de histología y determinación de *H. pylori* mediante hematoxilina y eosina (HE) y coloración de Giemsa (cuando la HE fue negativa) y dos del antro y dos del cuerpo para cultivo de *H. pylori*. Dos biopsias del antro y dos biopsias del cuerpo fueron guardadas con la intención de ser utilizadas para nuevo cultivo, en caso de que sucediera alguna dificultad con las primeras (contaminación del medio de cultivo, mala calidad de sus ingredientes en algún lote, etc.). Se tomó una biopsia adicional del antro para la prueba de ureasa rápida y más biopsias si existieran lesiones endoscópicas que lo justificaran (úlceras gástricas, masas, elevaciones, tumores, etc.). La prueba de ureasa rápida utilizada fue preparada por nosotros (“homemade”), de acuerdo a las recomendaciones para la misma (18). En un formulario específicamente diseñado, se consignaron de manera prospectiva y estandarizada las variables demográficas y las demás variables incluidas en el estudio.

Cultivo de *H. pylori* y pruebas de susceptibilidad de antibióticos in vitro

Procedimiento de transporte: Cada biopsia tomada durante la endoscopia digestiva alta se depositó en un criovial con 500 µl de caldo Brucella y estos se mantuvieron en cadena de frío hasta su procesamiento.

Procedimiento de aislamiento de *Helicobacter pylori*: En total asepsia y esterilidad, las biopsias se maceraron con un aplicador de madera estéril, previamente tratado en una solución de carbón activado al 1%, hasta obtener una solución homogénea (19). Luego se procedió a sembrar con asa curva desechable la solución anterior en el medio Wilkins Chalgren modificado para *H. pylori* suplementado con Isovitalax y antibióticos. Una vez realizada la siembra, las cajas de Petri se introdujeron en campanas de anaerobiosis y se generó una atmósfera de microaerofilia con sobres CampyPak (BBL-Beckton-Dickinson) y los cultivos se incubaron a 37 grados centígrados durante 4-15 días (19, 20).

Pruebas de identificación para *Helicobacter pylori*: Para verificar la presencia de *Helicobacter pylori* en los cultivos, se realizaron las siguientes pruebas (20): coloración de gram: bacilos gram negativos curvos pequeños; prueba de catalasa: catalasa positiva; oxidasa: oxidasa positiva; ureasa: ureasa positiva.

Después de confirmadas por pruebas bioquímicas, se procedió a la evaluación de susceptibilidad a metronidazol,

amoxicilina y claritromicina. Adicionalmente, a 60 de los 79 aislamientos se les realizó extracción del DNA y amplificación de los genes de virulencia *vacA* y *cagA* por la técnica de PCR (19).

Genotipificación del gen *cagA* por PCR (19, 21, 22)

Para la genotipificación del gen *cagA* se obtuvieron productos de amplificación del DNA por PCR en un volumen final de 25 µl, para lo cual se dispensaron: 0,1 µl de Taq polimerasa (TucanTaq-Corpogen), 2,5 µl de buffer Taq (TucanTaq-Corpogen), 1,5 µl de MgCl₂ (TucanTaq-Corpogen), 0,5 µl de dNTPs mix (Invitrogen), 1 µl de cada primer de *cagA* Forward y Reverse (IDT-Coralville-USA), 5 µl de solución de DNA a una concentración de 100 ng y se completó con agua grado molecular para completar al volumen final de 25 µl. Las secuencias de los primers de *cagA* fueron:

cagA F(+) 5'- TTGACCAACAACCACAAACCGAAG - 3'
cagA R(-) 5'- CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC - 3'

Posiciones de acuerdo al ORF *cagA* en Genbank secuencia L11714.

La amplificación de *cagA* se realizó en un termociclador (MyCycler termal cycler-BIORAD), de la siguiente manera:

1. Denaturación inicial 9 min a 94°C.
2. Cuarenta ciclos de denaturación 95°C por 30 segundos, hibridación 50°C por 45 segundos y extensión 72°C por 45 segundos.
3. Extensión final: 72°C por 5 minutos.

Después, los amplificados se corrieron en geles de agarosa al 2%, y se revelaron en solución de bromuro de etidio.

Genotipificación del gen *vacA* por PCR (19, 21, 22)

Para la genotipificación del gen *vacA* se obtuvieron productos de amplificación del DNA por PCR (19, 21) en un volumen final de 25 µl, para lo cual se dispensaron: 0,1 µl de Taq polimerasa (TucanTaq-Corpogen), 2,5 µl de buffer Taq (TucanTaq-Corpogen), 1,5 µl de MgCl₂ (TucanTaq-Corpogen), 0,5 µl de dNTPs mix (Invitrogen), 1 µl de cada primer *vacA* s1/s2, *vacA* s1a, *vacA* s1b, *vacA* m1 y *vacA* m2 (tabla 1). (F y R) (IDT-Coralville USA), 5 µl de solución de DNA a una concentración de 100 ng y se completó con agua grado molecular para completar al volumen final de 25 µl.

La amplificación de *vacA* se realizó en un termociclador (MyCycler termal cycler-BIORAD), de la siguiente manera:

1. Treinta y cinco ciclos de denaturación 94°C por 1 minuto, hibridación 52°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto.
2. Extensión final: 72°C por 5 minutos.

Los diferentes genotipos de *H. pylori* se agruparon en dos grupos, “grupo más virulento” y “grupo menos virulento” (19). El primero estaba integrado por aquellos que eran *cagA*(+) y *vacA*(+) con subtipos *s1am1+* y el segundo grupo *cagA*(-) *vacA*(+) pero con subtipos *s2m2* (+). La secuencia de los primers utilizados se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los primers utilizados.

| Región | Primer | Secuencia (5' 3') | Tamaño y localización |
|-----------------|--------|-----------------------|-----------------------|
| <i>vacA</i> m1 | VA3-F | GGTCAAATGCGGTCATGG | 290bp (2741-3030) |
| | VA3-R | CCATTGGTACCTGTAGAAAC | |
| <i>vacA</i> m2 | VA4-F | GGAGCCCCAGGAAACATTG | 352bp (976-1327) |
| | VA4-R | CATAACTAGCGCCTTGAC | |
| <i>vacA</i> s1 | VA1-F | ATGGAAATACAACAAACACAC | 259bp (797-1055) |
| | VA1-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |
| <i>vacA</i> s2 | VA1-F | ATGGAAATACAACAAACACAC | 286bp (284-569) |
| | VA1-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |
| <i>vacA</i> s1a | S1A-F | GTCAGCATCACACCGCAAC | 190bp (866-1055) |
| | VA1-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |
| <i>vacAs</i> 1b | SS3-F | AGCGCCATACCGCAAGAG | 187bp |
| | VA1-R | CTGCTTGAATGCGCCAAAC | |

bp: pares de bases.

DETERMINACIÓN LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Técnica de E-test (23-25)

A partir de cultivos de 2 a 3 días de incubación, se preparó una suspensión en caldo Brucella que se ajustó a la escala 2 de MacFarland (1 x 10⁸ UFC/ml), la suspensión se inoculó con un escobillón estéril sobre placas de agar Mueller-Hinton suplementado con 10% de suero de caballo, 2% de isovitalax. Se utilizó una caja con medio de cultivo por cada antibiótico (metronidazol, claritromicina, amoxicilina) a ensayar.

Las tiras de E-Test® (Biomériux) se colocaron sobre las placas de medio de cultivo inoculadas con la bacteria y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 48-72 horas. Los aislamientos fueron considerados resistentes si la concentración mínima inhibitoria (CMI) se encontraba en niveles iguales o superiores a 8 µg/ml para metronidazol; 0,5 µg/ml para claritromicina y 1 µg/ml para amoxicilina (23). Para controlar medios de cultivo y tiras

de E-Test, se utilizó la cepa control, *H. pylori* NCTC 11637 (24, 25).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos se elaboró una base datos en el programa EPIINFO versión 6.0. Los resultados obtenidos fueron procesados y analizados estadísticamente utilizando el programa STATA versión 6.0. Se determinó el porcentaje de resistencia a claritromicina, amoxicilina y metronidazol, así como el porcentaje de presencia del gen *cagA* y los diferentes alelos para el gen *vacA*, en los aislamientos analizados. Se buscó asociación entre la presencia de los genes de virulencia y la resistencia a los antibióticos, la cual fue evaluada mediante una prueba de ji cuadrado (X²), con un valor alfa (α) de 0,05.

RESULTADOS

Se lograron 79 aislamientos de *H. pylori* de 99 muestras enviadas de igual número de pacientes, en quienes se documentó el diagnóstico de *H. pylori* con base en el test de ureasa rápida positivo e identificación de *H. pylori* en la histología, representando una tasa de recuperación del 80%. El 67% de los pacientes en quienes se recuperó el microorganismo eran mujeres. La edad promedio de la muestra total era 54 años +/-15 años. El diagnóstico endoscópico fue esofagitis erosiva en 16 pacientes (25%), gastritis crónica corporoantral en 79 (100%), y úlcera duodenal en 4 (5%).

Las prevalencias de las resistencias, utilizando E-test, fueron las siguientes: metronidazol 81,01% (IC 95% 70,31-88,64), claritromicina 17,72% (IC 95% 10,37-28,29%), y amoxicilina 3,8% (IC 95% 0-8,6%), (tabla 2). No hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de resistencia para los tres antibióticos entre hombres y mujeres.

Tabla 2. Prevalencias de resistencias a los diferentes antibióticos.

| Claritromicina | Amoxicilina | Metronidazol |
|---------------------|---------------|--------------------|
| E-TEST | E-TEST | E-TEST |
| 14/79 | 3/79 | 64/79 |
| 17,72% | 3,8% | 81,01% |
| IC 95% 10,37-28,29% | IC 95% 0-8,6% | IC 95% 70,31-88,64 |

El 25% de los genotipos identificados fueron del grupo “más virulentos”, como se ve en la tabla 4, en la cual se muestran, además, las frecuencias relativas de los demás genotipos de *H. pylori* en los 60 pacientes examinados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas

entre el genotipo *cagA vacA s1am1* y los demás genotipos con la resistencia a los antibióticos claritromicina, amoxicilina y metronidazol: $p=0,36$, $p=0,36$ y $p=1$, respectivamente tablas 3 y 4.

DISCUSIÓN

Actualmente, para los gastroenterólogos y médicos de cuidado primario, la erradicación de *H. pylori* es un gran desafío ya que cada día está aumentando la resistencia primaria de este microorganismo a los antibióticos más frecuentemente utilizados en su tratamiento (8-12, 26, 27), la cual se debe en parte a la exposición de la población a esos antibióticos como monoterapia para diversas enfermedades infecciosas (11, 12). En el reciente tercer consenso de Maastricht (9) se recomendó continuar utilizando la triple terapia estándar durante siete días en las poblaciones con resistencia a la claritromicina menor al 15-20% y, cuando es mayor al 20%, prolongarla a 14 días o utilizar una terapia cuádruple con bismuto durante 10 a 14 días. Así mismo, recomendó utilizar el metronidazol en la triple terapia cuando la resistencia es menor del 40%. En la presente investigación se encontró que la resistencia primaria a metronidazol fue del 81,01% y a claritromicina del 17,72% las cuales están dentro de los límites sugeridos para no ser utilizado en la triple terapia como esquema de primera línea (9).

El resultado de resistencia a metronidazol encontrada por nosotros concuerda con los resultados de investigaciones de otros países en vías de desarrollo (28, 29), y con

otros trabajos de Colombia que utilizaron la misma metodología con E-test (13, 30). Gutiérrez y col (13), en 1998, encontraron resistencia a metronidazol en el 82% y, recientemente, Henao y col, 72% (30). El alto nivel de resistencia encontrado en el presente trabajo contrasta con la encontrada globalmente en países europeos que es del 33% (31), Estados Unidos 39% (32), Australia 32% y Japón 4% (33). Aunque la técnica de E-test, puede exagerar la verdadera resistencia a metronidazol, si se le compara con la técnica de dilución agar (14), la diferencia estimada entre ambos métodos se ha encontrado que puede ser del 10-20% (12), por lo cual consideramos que ante tasas tan altas de resistencia al metronidazol, el valor predictivo de los resultados del E-test finalmente dará resultados que están por encima del 40% que es el límite máximo considerado por los expertos para que se utilice este medicamento (9). La prevalencia de resistencia a metronidazol fue similar en hombres y mujeres (79,5% y 82,7% respectivamente).

La resistencia a claritromicina del 17,7% es similar al 15% publicado este año por Henao y col (34) y contrasta marcadamente con el 3,8% encontrada por otros investigadores del centro occidente de Colombia (35). Es posible que la discrepancia con los hallazgos de este último trabajo se relacione con el nivel socioeconómico de la población estudiada por ellos, la cual, como comentan los autores, probablemente tendría menos exposición a este antimicrobiano por no estar en el plan obligatorio de salud de Colombia, aunque hasta el momento, se ha considerado que la resistencia a este antimicrobiano tiene relación

Tabla 3. Proporción de resistencia a claritromicina, amoxicilina y metronidazol en genotipos de *H. pylori*.

| Genotipo | Resistencia claritromicina | | Resistencia amoxicilina | | Resistencia metronidazol | |
|--|----------------------------|--------------|-------------------------|-------------|--------------------------|---------------|
| | N | % IC95% | n | % IC95% | n | % IC95% |
| <i>cagA(+)</i> <i>vacAs1m1</i> | 5/17 | 29,4% (7-51) | 1/17 | 5,8% (0-17) | 12/17 | 70,5% (48-92) |
| <i>cagA(+)</i> <i>vacAs2m2</i> | 0/4 | - | 1/4 | 25% (0-79) | 1/4 | 25% (0-79) |
| <i>cagA(+)</i> otros subtipos de <i>vacA</i> | 2/11 | 18% (0-45) | 3/11 | 27% (0-58) | 8/11 | 72% (46-99) |
| <i>cagA(-)</i> <i>vacAs2m2</i> | 2/11 | 18% (0-45) | 1/11 | 9% (0-26) | 8/11 | 72% (46-99) |
| <i>cagA(-)</i> <i>vacAs1m1</i> | 0/5 | - | 1/5 | 20% (0-65) | 5/5 | 100% (90-100) |
| <i>cagA(-)</i> otros subtipos de <i>vacA</i> | 4/12 | 33% (2-64) | 2/12 | 16% (0-41%) | 9/12 | 75% (46-100) |

Tabla 4. Evaluación de la relación de resistencia a claritromicina, amoxicilina y metronidazol frente a diferentes genotipos de virulencia de *H. pylori*.

| | Claritromicina | Amoxicilina | Metronidazol |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>cagA(+)</i> <i>vacAs1m1</i> vs otras cepas <i>cag(+)</i> | NS ($p=0,27$) | NS ($p=0,35$) | NS ($p=0,52$) |
| <i>cagA(-)</i> <i>vacAs2m2</i> vs otras cepas <i>cag(-)</i> | NS ($p=0,64$) | NS ($p=0,52$) | NS ($p=0,54$) |
| cepas <i>cagA(+)</i> vs cepas <i>cag(-)</i> | NS ($p=0,96$) | NS ($p=0,88$) | NS ($p=0,26$) |

Se evaluó significancia estadística con alfa de 0,05.

fundamentalmente con la utilización previa de macrólidos para infecciones respiratorias (12). De igual manera, nuestros hallazgos divergen con los encontrados en el norte de Europa y Escandinavia que tienen prevalencias de 4% (12) y 1-3% (36) respectivamente y son superiores a los de Estados Unidos en donde es del 12,9% (37). La prevalencia global de resistencia en Europa a claritromicina es del 10% y en el sureste de ese continente es del 18% (12), la cual coincide con nuestros resultados.

El impacto de la resistencia a metronidazol y a claritromicina es trascendental en la infección por *H. pylori*. La resistencia a metronidazol reduce la eficacia en 50% de las terapias triples y cuádruples (27) y cuando hay resistencia a claritromicina en 37% (38) a 70% (12). En Francia, se ha encontrado que cuando la cepa es sensible a claritromicina, la tasa de erradicación es del 87,8% y desciende a 18,3% si hay resistencia al mismo (12). En las recomendaciones de Maastricht (9), cuando hay resistencia aislada a claritromicina mayor a 15% y a metronidazol menor a 40%, se continúa sugiriendo como terapia de primera línea, una triple terapia con claritromicina-metronidazol durante 14 días o una terapia cuádruple. Sin embargo, no hay recomendaciones para las áreas geográficas en que existan simultáneamente altas tasas de resistencia para ambos antibióticos como las encontradas en esta investigación, lo cual implica que en nuestro medio es urgentemente necesario investigar terapias bien toleradas que superen las resistencias a estos dos medicamentos. Una estrategia podría ser la terapia secuencial clásica de 10 días con inhibidor de bomba de protones con amoxicilina los primeros cinco días y claritromicina más tinidazol durante los últimos cinco días en reemplazo de amoxicilina, la cual no disminuye sustancialmente su eficacia cuando hay resistencia a claritromicina pero pierde toda su eficacia cuando hay resistencia dual a claritromicina y a metronidazol como fue recientemente demostrado en uno de los más importantes trabajos publicados al respecto (39). En el presente trabajo no se encontraron resistencias simultáneas en una misma cepa; sin embargo, las altas tasas de resistencia a metronidazol y a claritromicina hacen plantear la duda sobre la utilidad de esta terapia secuencial y debe ser un estímulo para investigarla de manera prioritaria en nuestro medio. Con base en nuestros resultados, otra alternativa sería utilizar triples terapias que contengan levofloxacina, las cuales han demostrado eficacia tanto en terapias de primera línea (40-42) como en terapias de rescate de segunda (43-46) y tercera línea (47).

Con respecto a la resistencia a la amoxicilina, mundialmente se han encontrado que es inferior al 2% y por lo tanto hasta el momento no se le considera un problema para la erradicación de *H. pylori* (10, 12), por lo cual, el 3.8% encontrado en este estudio, es un hallazgo sorpren-

dente, que implica una dificultad adicional para el manejo de *H. pylori* en nuestro medio. Hasta el momento, los países con las más altas tasas de resistencia a este antimicrobiano eran Kenia con 4,6% (48) y Bangladesh con 6,6% (49).

No encontramos asociación entre los genotipos de *H. pylori* y la resistencia a los tres antibióticos investigados, lo que coincide con investigaciones realizadas en otras latitudes con el mismo fin (50-53). Sin embargo, es diferente a los hallazgos de investigadores irlandeses, quienes encontraron que la tasa de resistencia a metronidazol es más alta en cepas cagA(+)*vacAs1m1* (54).

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación que encontró altas tasas de resistencia para los tres antibióticos más importantes para erradicar *H. pylori*, sería cuestionable la utilidad de la terapia triple estándar como esquema de primera línea en nuestro medio, si bien la única forma de confirmar esta presunción sería realizando un ensayo clínico. Aunque se requieren estudios adicionales, ojalá multicéntricos, para confirmar y ampliar los resultados de este estudio, consideramos que la información derivada del mismo puede ser de utilidad para los médicos involucrados en el tratamiento de *H. pylori*, para planear qué esquema antibiótico utilizar como terapia empírica. Los expertos consideran que al igual que en otras enfermedades infecciosas transmisibles para el tratamiento de *H. pylori* es fundamental disponer de la información sobre los niveles de resistencia del microorganismo a los antibióticos usualmente utilizados con el fin de elegir esquemas eficaces (10-12) y, en ese sentido, este trabajo ha develado unos datos preocupantes.

En conclusión, se ha encontrado una alta tasa de resistencia a los tres principales antibióticos utilizados en la mayoría de los esquemas exitosos de erradicación de la infección. Esta información tiene un gran impacto para nuestro país y por lo tanto implicaría que es necesario investigar de manera preferencial diferentes terapias de erradicación de *H. pylori*.

Conflicto de intereses

El presente trabajo fue financiado por Colciencias, como parte del proyecto "Erradicación de *Helicobacter pylori*: triple terapia con levofloxacina". Código 1203-408-20464.

REFERENCIAS

1. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2007; 21: 205-14.
2. Suebaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002; 347: 1175-86.
3. Current European Concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus

- Report. European *Helicobacter pylori* Study Group. Gut 1997; 41: 8-13.
4. Guillen D, McColl KEL. Gastroduodenal disease, *Helicobacter pylori*, and genetic polymorphisms. Clinical Gastroenterol Hepatol 2005; 3: 1180-86.
 5. Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of Cag A phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2004; 127: 514-23.
 6. Howden CW, Hunt RH. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori*. Ad Hoc Committee on practice parameters of the American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol 1998; 93: 2330-8.
 7. Bytzer P, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2005; 10(Suppl 1): 40-46.
 8. Chey WD, Wong BCY. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. Am J Gastroenterol 2007; 102: 1808-25.
 9. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht III consensus report. Gut 2007; 56: 772-81.
 10. Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2007; 133: 985-100.
 11. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2008; 5: 321-31.
 12. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. Gut 2004; 53: 137-84
 13. Gutiérrez O, Otero W. Resistencia de *Helicobacter pylori* al Metronidazol en Colombia. Rev Col Gastroenterol 1998; 12: 31-5.
 14. Clinical and laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing for infrequently isolated or fastidious bacteria 2006(5):M2-M7. Pen. USA.
 15. Cotton PB, Williams CB. Practical Gastrointestinal endoscopy: The fundamentals (5th edition), Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2003.
 16. El-Zimaity HM, Graham DY. Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of *Helicobacter pylori* or intestinal metaplasia: role of the Sydney system. Hum Pathol 1999; 30: 72-7.
 17. Guamer J, Herrera-Goepfert R, Mohar A, Smith C, Schofield A, Halperin D, et al. Diagnostic yield of gastric biopsy specimens when screening for preneoplastic lesions. Hum Pathol 2003; 34: 28-35.
 18. Genta RM, Graham DY. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori*. En Graham DY, Genta RM, Dixon MF. Gastritis. Lippincott Williams & Wilkins Phil 1999. p. 189-201.
 19. Quiroga AJ, Citty DM, María Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. Biomédica 2005; 25: 325-34.
 20. Ansorg R, Von Recklinghausen G, Pomarius R, Schmid EN. Evaluation of Techniques for Isolation, subcultivation, and Preservation of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1991; 29(1): 51-53.
 21. Citty DM, Huertas MG, Martínez JD, Oliveros R, Posso H, Bravo MM, et al. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia. Rev Med Chile 2002; 130: 143-51.
 22. Martínez A, González C, Kawauchi F, Montoya F. *Helicobacter pylori*: análisis de *cagA* y genotipificación de *vacA* en Chile. Detección de una cepa *s2/m1*. Rev Med Chile 2001; 129: 1147-1153.
 23. Osato MS. Antimicrobial Susceptibility Testing for *Helicobacter pylori*: Sensitivity Test Results and Their Clinical Relevance. Curr Pharm Des 2000; 6: 1545-1555.
 24. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Krocaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E Test for Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. J Clinical Microbiol 1991; 29: 2072-2075.
 25. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Graham DY. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob 2001; 17: 39-44.
 26. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistent: biology and disease. J Clin Invest 2004; 113: 321-33.
 27. Houben MHM, van de Beck D, Hensen EF, De Craen AJM, Waws EAJ, Tytgat GNJ. A systematic review of *Helicobacter* eradication therapy-the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13: 1047-55.
 28. Datta S, Chattopadhyay S, Patra R, Ramamurthy R de T, Hembram J, Chowdhury S, et al. Most *Helicobacter pylori* strains of Kolkata in India are resistant to metronidazole but susceptible to other drugs commonly used for eradication and ulcer therapy. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22: 51-7.
 29. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Pérez G, Madrazo De la Garza A, Dahesa M, González-Valencia G, et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. J Clin Microbiol 2001; 39: 2677-80.
 30. Henao SC, Otero W, Ángel LA, Martínez JD. Resistencia primaria a Metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá. Rev Col Gastroenterol 2009; 24: 10-15.
 31. Glupczynski Y, Mégraud F, López Brea M. European multicenter survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 11: 820-3.
 32. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Malaty HM, Graham DY. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. Arch Intern med 2001; 161: 1217-20.
 33. Mégraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: prevalence, mechanism, detection. What's new? Can J Gastroenterol 2003; 17(Suppl. B): 49B-52B.

34. Henao SC, Quiroga A, Martínez JD, Otero W. Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroenterol 2009; 24: 110-114.
35. Alvarez A, Moncayo JJ, Santacruz JJ, Santacoloma M, Corredor LF, Reinoso E. Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. Antimicrob Ag Chemother 2009; 53: 40222-4.
36. Vakil N. *H. pylori* treatment: new wine in old bottles? Am J Gastroenterol 2009; 104: 26-30.
37. Duck WM, Sobel J, Prukler JM, et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons. United states Emerg Infect Dis 2004; 10:1088-94.
38. Jefri NS, Hornung CA, Howden CW. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in naive patients. Ann Intern Med 2008; 148: 923-31.
39. Vaira D, Zulo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, et al. Sequential therapy versus standard triple drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication. Ann Intern Med 2007; 146: 556-63.
40. Gisbert JP, Fernández M, Molina J, Pérez A, Prieto B, Matos JM, et al. First line triple therapy with levofloxacin for *Helicobacter pylori* eradication. Alimen Pharmacol Ther 2007; 26: 495-500.
41. Nista EC, Candelli M, Zocco MA, Cremonini F, Ojetti M, Finizio R, et al. Levofloxacin-based triple therapy in first line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. Am J Gastroenterol 2006; 101: 1985-90.
42. Schrauwen RWM, Jannssen MJR, de Boer WA. Seven-day PPI triple therapy with levofloxacin is very effective for *Helicobacter pylori* infection. J Med 2009; 67: 96-101.
43. Cheng HC, Chang WL, Chen WY, Yang HB, WU JJ, Sheu BS. Levofloxacin-containing triple therapy to eradicate the persistent *H. pylori* after a failed conventional triple therapy. Helicobacter 2007; 12: 359-63.
44. Perna F, Zullo A, Ricci C, Hassan C, Morini S, Vaira D. Levofloxacin -based triple therapy for *Helicobacter pylori* re-treatment: role of bacterial resistance. Dig Liv Dis 2007; 39: 1001-5.
45. Gisbert JP, Bermejo F, Castro M, Aisa A, Fernández M, Tomas A, et al. Second Line therapy with levofloxacin after *H. pylori* treatment failure: a Spanish multicenter study of 300 patients. Am J gastroenterol 2008; 103: 71-6.
46. Di Caro S, Franceschi F, Mariani A, Thompson F, Raimondo D, Masci E, Testoni A, et al. Second line levofloxacin based triple schemes for *Helicobacter pylori* eradication. Dig Liv Dis 2009;41:480-85
47. Gisbert JP, Castro M, Bermejo F, Pérez A, Ducons J, Fernández M, Bory F, et al. Third line rescue therapy with levofloxacin after two *H. pylori* treatment failures. Am J Gastroenterol 2006; 101: 243-7.
48. Lwal-Lume L, Ogutu EO, Amayo EO, et al. Drug susceptibility pattern of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia in Kenyatta National Hospital Nairobi. East Afr Med J 2005; 82: 603-8.
49. Nahar S, Mukhopadhyay AK, Khan R, et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Bangladesh. J Clin Microbiol 2004; 42: 4856-58.
50. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvenuto YH, Vitiello L, Miranda M de C, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol 2003; 11(3): 20.
51. Debets-Ossenkopp YJ, Reyes G, Mulder J, Aan de Stegge BM, Peters JT, Savelkoul PH, Tanca J, Pena AS, Vandenbroucke-Grauls CM. Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 141-145.
52. López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a paediatric population. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 24: 183-8.
53. Zschausch HC, Han SR, Meyer HG, Maeurer MJ. No association between *Helicobacter pylori* genotypes and antibiotic resistance phenotypes within families. Helicobacter 2002; 7: 364-6.
54. Taneike I, Nami A, O'Connor A, Fitzgerald N, Purphy P, Oasim A, et al. The analysis of drug resistance and virulent-factor genotype of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between to metronidazole and cagA status? Aliment Pharmacol Ther 2009; Jul 9 (Epub ahead of print).

**Análisis de mutaciones en los genes 23S rRNA y
gyrA asociados con resistencia de *H. pylori* a
claritromicina y levofloxacin**

En este capítulo se describen las mutaciones relacionados con resistencia primaria de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina en los genes 23S rRNA y *gyrA* en aislamientos clínicos de pacientes en la ciudad de Bogotá - Colombia. Mundialmente la resistencia de este microorganismo a estos dos antibióticos ocurre por mutaciones puntuales en los genes 23S rRNA y *gyrA* respectivamente. El estudio de las mutaciones relacionadas con resistencia del microorganismo a los antibióticos mas utilizados en las terapias triples de erradicación es relevante de conocer, ya que este conocimiento se puede utilizar para el diseño de pruebas moleculares rápidas que permitan detectar la resistencia en la biopsia gástrica o en materia fecal; adicionalmente permite conocer cuales son las mutaciones más frecuentes en la población estudiada, ya que se ha demostrado que la frecuencia y las mutaciones en estos genes son diferentes entre diversas áreas geográficas. Por ello cada región debe estudiar su situación de resistencia a cada antibiótico para definir políticas locales de diagnóstico y manejo de la infección.

A continuación se presentan dos manuscritos con los resultados de las mutaciones asociadas con resistencia a claritromicina y levofloxacina.

Mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* en Bogotá – Colombia.

Alba A. Trespalacios¹, William. Otero², Jorge E. Caminos³, Marcela M. Mercado¹, Avila. J, Rosero¹. LE, Arévalo. A¹, Raul A. Poutou¹, David Y. Graham^{4,5}.

¹Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C, Colombia

²Unidad de Gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

³Unidad de Bioquímica, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

⁴Department of Medicine, Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center Houston, TX, United States

⁵Baylor College of Medicine, Houston, TX, United States

Correspondencia: Alba A. Trespalacios, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 N° 43-82. Bogotá – Colombia. Tel: 571 +3208320 ext 4155.

E-mail: alba.trespalacios@javeriana.edu.co

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*), es un bacilo microaerófilo, Gram negativo; implicado frecuentemente como el agente causal de gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales, carcinoma gástrico y linfomas tipo MALT (Graham *et al.*, 1991; Malfertheiner *et al.*, 2007; Yamaoka *et al.*, 1999). El tratamiento de estos desórdenes asociados con *H. pylori* usualmente revierte y cura completamente después del tratamiento con antibióticos (Graham *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2000; Rimbara *et al.*, 2011; Vakil & Megraud, 2007). Claritromicina es un macrólido utilizado frecuentemente en combinación con otros agentes antimicrobianos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*. Sin embargo, la resistencia de la bacteria a claritromicina es una de las mayores causas de falla en el tratamiento (Choi *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Malfertheiner *et al.*, 2007). La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a

claritromicina varía entre diferentes países, siendo muy alta en España (49,2%) y Japón (40,7%); media en la gran mayoría de países Europeos, Asiáticos y Norteamérica (10-20%) (De Francesco *et al.*, 2010). En Colombia se han reportado diferencias entre regiones, siendo baja en el viejo Caldas (Manizales, Pereira y Armenia) con variaciones entre 2,2 – 3,8% (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b), y media en Bogotá 15 - 17,7% (Heno *et al.*, 2009; Trespalacios *et al.*, 2010). Claritromicina actúa por unión a la peptidiltransferasa de la subunidad 23S rRNA e inhibe la síntesis proteica bacteriana. La resistencia resulta por cambios en la molécula de 23S RNA causada por mutaciones en el gen 23S rRNA. Transiciones de adenina a guanina en las posiciones 2142 y 2143 son las principales mutaciones observadas en este gen (Taylor *et al.*, 1997). Todas estas mutaciones confieren resistencia a los macrólidos, lo cual ha sido confirmado por estudios de mutagénesis y transformación natural (Taylor *et al.*, 1997; Versalovic *et al.*, 1997). Otras mutaciones han sido observadas en aislamientos de *H. pylori* resistentes a claritromicina, sin embargo solo A2142C, T2717C y C2694A han podido relacionarse con resistencia por medio de estudios de transformación natural (Fontana *et al.*, 2002; Rimbara *et al.*, 2008; Rimbara *et al.*, 2011). En Colombia son pocos los estudios que se han realizado sobre la prevalencia de resistencia de *H. pylori* a claritromicina y tan solo un estudio ha relacionado las mutaciones A2143G y A2142G como responsables de la resistencia (Alvarez *et al.*, 2009b).

En el presente estudio, se determinó la prevalencia de resistencia a claritromicina desde 2009 a 2011 en Bogotá, D.C – Colombia y se caracterizaron las mutaciones presentes en los aislamientos susceptibles y resistentes por secuenciación.

Materiales y Métodos

Pacientes remitidos a endoscopia digestiva alta de la Clínica Fundadores fueron incluidos prospectivamente desde enero de 2009 y abril de 2011. Los pacientes fueron parte de un estudio clínico que evaluó la eficacia de la terapia triple con levofloxacina en la erradicación de *H. pylori*. Se incluyeron prospectivamente pacientes con dispepsia funcional o úlceras pépticas con edades entre 19 y 70 años, remitidos a endoscopia digestiva alta por síntomas dispépticos, que no hubiesen recibido tratamientos previos de erradicación de *H. pylori* dentro de los tres meses anteriores, ni medicamentos antsecretorios, bismuto o antibióticos un mes antes de ingresar al estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado (Anexo 1), antes de ingresar al estudio después de una explicación completa y detallada del mismo. El protocolo y consentimiento informado, fueron aprobados por el comité de ética, de la Clínica Fundadores y la Pontificia Universidad Javeriana.

Aislamientos clínicos: Las biopsias obtenidas de cada paciente se depositaron en crioviales con 500µl de caldo Brucella® con 20% de glicerol y se mantuvieron en cadena de frío (2 a 8°C) hasta su procesamiento antes de 24 horas de recolectada. En total asepsia y esterilidad, en cabina de bioseguridad, las biopsias

fueron maceradas hasta obtener una solución homogénea con un aplicador de madera estéril, previamente tratado con 1% de carbón activado. La muestra homogénea fue vertida en su totalidad sobre la superficie de agar Wilkins Chalgren modificado para *H. pylori* y suplementado con Isovitalex y antibióticos. Una vez realizada la siembra, las cajas de petri se incubaron, en atmosfera microaerófila con 10% de CO₂, a temperatura de 37°C durante 14 días, revisando cada tres días hasta la observación de colonias.

Pruebas de identificación para *Helicobacter pylori*: Al cabo del período de incubación, se buscó el crecimiento de colonias pequeñas, uniformes, traslucidas, brillantes en gota de rocío. La confirmación de *Helicobacter pylori* se realizó con las siguientes pruebas: Coloración de Gram: Bacilos Gram negativos curvos pequeños, Prueba de catalasa: positiva, Prueba de oxidasa positiva y Prueba de ureasa positiva. Subcultivos puros de cada aislamiento de *H. pylori* se obtuvieron en agar Wilkins Chalgren sin antibiótico. En caso de obtener más de una cepa por paciente, cada aislamiento se estudió por separado. Tres copias de cada cepa se conservaron en caldo Brucella con glicerol al 10% a -70°C.

Prueba de susceptibilidad a claritromicina: Para evaluar la susceptibilidad de los aislamientos a claritromicina, se realizaron pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica dilución en agar de acuerdo a las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI *et al.*, 2010), utilizando Agar Mueller Hinton, suplementado con 5% de sangre cordero o caballo

envejecida 2 semanas. Se prepararon placas de medio de cultivo conteniendo concentraciones de antibiótico entre 0.125 a 64 µg/ml y se inocularon con 3 µl de una suspensión de *H. pylori* ajustada a la escala 2 de MacFarland. La cepa NCTC 11637 fue utilizada como control de calidad en cada montaje de la prueba de susceptibilidad. El punto de corte utilizado para determinar la resistencia a claritromicina fue $\geq 1\mu\text{g/ml}$. La CMI de cada aislamiento se interpretó como la mas baja concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento visible de *H. pylori*.

Extracción de ADN de *Helicobacter pylori*: ADN genómico de la totalidad de los aislamientos susceptibles y resistentes a claritromicina fue obtenido a partir de cepas de *H. pylori* cultivadas en medio líquido durante 12 horas (Duque-Jamaica *et al.*). Finalizado el tiempo de incubación todos los cultivos fueron centrifugados a 10.000 r.p.m. por 4 minutos, el sobrenadante descartado y el sedimento sometido a extracción de ADN utilizando DNAzol® (Invitrogen).

Determinación de mutaciones en el gen 23S rRNA: Dos pares de iniciadores fueron utilizados para amplificar dos fragmentos de la peptidiltransferasa de la subunidad 23S rRNA. Las secuencias de los iniciadores fueron basadas en la secuencia publicada del gen 23S rRNA de *H. pylori* (Número de acceso en GenBank U27270). El primer juego de iniciadores amplifica un fragmento de 425 pb en donde se ubican las mutaciones de las posiciones 2142, 2143, 2144. Los iniciadores de esta región son: K1 (5'-CCA CAG CGA TGT GGT CTC AG-3', complementaria a la posición 2191 a 2210) y K2 (5'CTC CAT AAG AGC CAA AGC CC-3' complementaria a la posición 2596 a 2615). El segundo par de

iniciadores amplifica un fragmento de 414 pb, en donde se ubican las mutaciones de las posiciones 2694 y 2717. Las secuencias de estos iniciadores son: K3 (5'-GCA CAA GCC AGC CTG ACT G-3' complementaria a la región 2786 a 2804) y K4 (5'-AGC AGT TAT CAC ATC CGT G-3' complementaria a la región 3181 a 3199) (Occhialini *et al.*, 1997).

La amplificación por PCR del ADN fue llevada a cabo utilizando PCR Master Mix – Promega (WI - USA), adicionando 5 µl de ADN genómico, 1 pmol/l de cada primer (K1 y K2) o (K3 y K4) en un volumen final de 50 µl de reacción. Las condiciones de amplificación fueron 3 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos de denaturación a 94°C, 30 segundos de hibridación a 54°C, 30 segundos de extensión a 72°C , con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación de 425 y 414 pb fueron evidenciados en geles de agarosa al 1,5% coloreados con SYBR Safe (Invitrogen – USA) durante 1 hora. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en MacroGen – Korea. Las secuencias fueron analizadas usando la herramienta BLASTN (Basic local alignment search tool) para comparar las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR de las regiones amplificadas con la secuencia reportada en el GenBank U27270). Se utilizó el sistema de Taylor *et al.*, para numerar las posiciones de los nucleótidos en las secuencias obtenidas (Taylor *et al.*, 1997).

Resultados

Se recuperaron aislamientos de *H. pylori* de 256 pacientes. La resistencia primaria a claritromicina durante el período de estudio fue 13,6% (35/256). La prevalencia de la resistencia se mantuvo estable a través de los años analizados.

Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a claritromicina: Se recuperaron 40 aislamientos resistentes en 35 pacientes y 234 cepas susceptibles de 221 pacientes. Se encontró infección mixta con un aislamiento resistente y un aislamiento susceptible en 4 pacientes. La concentración mínima inhibitoria en los aislamientos resistentes osciló entre 1 - 32 µg/ml y en los sensibles entre 0,016 – 0,5 µg/ml. El total de aislamientos obtenidos en los 256 pacientes fue de 274.

Mutaciones en 23S rRNA: Los aislamientos recuperados de la población en estudio presentaron mutaciones en el fragmento amplificado con los iniciadores K1 y K2, en las posiciones 2142 y 2143, las secuencias de los genotipos encontrados se observan en la figura 3.1 y un alineamiento con la mutación más frecuente A2143G en la figura 3.2. No se presentó ninguna mutación en las regiones amplificadas con los iniciadores K3 y K4.

42 aislamientos con mutaciones fueron recuperadas de 37 pacientes, de estos aislamientos con mutación 36 fueron resistentes a claritromicina y 6 sensibles. 234 aislamientos sin mutaciones fueron recuperados de 221 pacientes, de estos aislamientos de *H. pylori*, 228 fueron sensibles a claritromicina y 6 fueron resistentes. Las mutaciones presentes en el grupo de aislamientos resistentes

Capítulo 3

fueron A2143G y A2142G; los aislamientos con esta última mutación presentaron alta resistencia a claritromicina ($CIM \geq 16 \mu\text{g/ml}$), la CIM de las mutantes A2143G fluctuó entre 1 – 8 $\mu\text{g/ml}$. En la tabla 3.1 se observa la distribución de los aislamientos de acuerdo a la mutación y la CIM y en la figura 3.3, la distribución de los aislamientos de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el genotipo de los aislamientos.

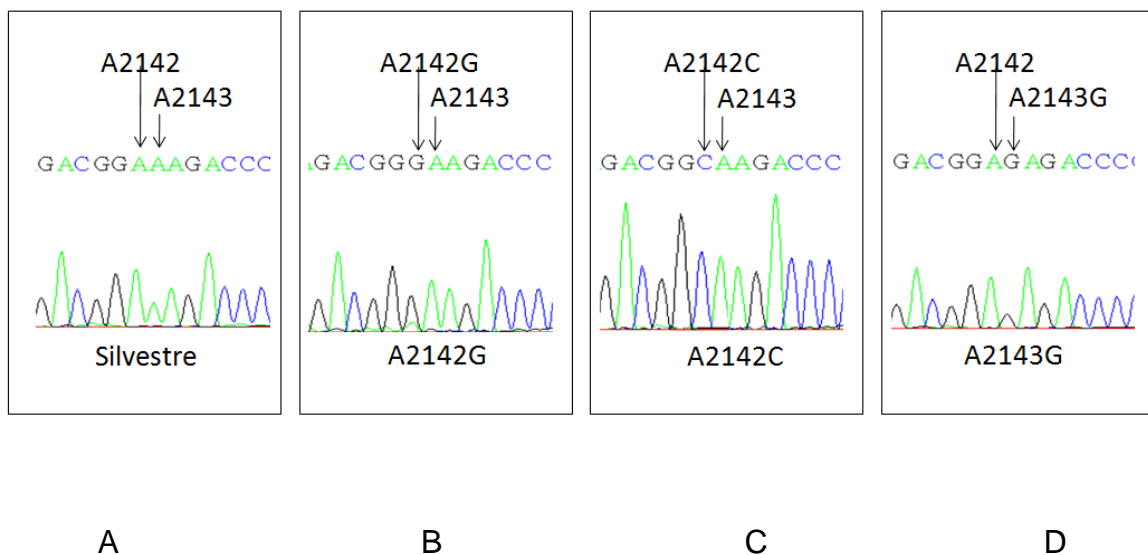


Figura 3.1. Resultados de la secuencia de los productos de PCR amplificados con los iniciadores K1 y K2. Las secuencias mutadas presentan el cambio de nucleótido en la posición 2142 o 2143. Secuencias con doble mutación no se observaron. (A) Secuencia silvestre, sin mutaciones en las posiciones 2142, 2143. (B) Secuencia con mutación A2142G. (C) Secuencia con mutación A2142C. (D) Secuencia con mutación A2143G.

| | | | |
|------------|------|--|------|
| Resistente | 21 | AAACACAGCACTTTGCCAACTCGTAAGAGGAAGTATAAGGTGTGACGCCTGCCCGGTGCT | 80 |
| HPU27270 | 2239 | AAACACAGCACTTTGCCAACTCGTAAGAGGAAGTATAAGGTGTGACGCCTGCCCGGTGCT | 2298 |
| Resistente | 81 | CGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTCGCAAGATGAAGCGTTGAATTGAAGCCCAGTAAAC | 140 |
| HPU27270 | 2299 | CGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTCGCAAGATGAAGCGTTGAATTGAAGCCCAGTAAAC | 2358 |
| Resistente | 141 | GGCGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTGCGTTAGTACCGACC | 200 |
| HPU27270 | 2359 | GGCGGCCGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTGCGTTAAATACCGACC | 2418 |
| Resistente | 201 | TGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAACCAGAGATTCAAGTAAATTGTAGT | 260 |
| HPU27270 | 2419 | TGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAACCAGAGATTCAAGTAAATTGTAGT | 2478 |
| Resistente | 261 | GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGTGGACCTTACTACA | 320 |
| HPU27270 | 2479 | GGAGGTGAAAATTCCTCCTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGTGGACCTTACTACA | 2538 |
| Resistente | 321 | ACTTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGTAAGGG | 380 |
| HPU27270 | 2539 | ACTTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGTAAGGG | 2598 |
| Resistente | 381 | CTTTGGCTCTTATGGAG | 397 |
| HPU27270 | 2599 | CTTTGGCTCTTATGGAG | 2615 |

Figura 3.2. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de le dominio V in 23S rRNA de un aislamiento de *Helicobacter pylori* mutante A2143G. La numeración de la posición de los nucleótidos sigue el sistema propuesto por Taylor *et al.* (Posición 2515–373+1= posición 2143). La secuencia HPU27270 es la secuencia publicada del gen 23S rRNA de *H. pylori*, número de acceso a GenBank U27270.

A

| CMI | GENOTIPO | | | |
|-------|----------|--------|--------|-----------|
| | A2142C | A2142G | A2143G | SILVESTRE |
| 0,016 | | | | 55 |
| 0,032 | | | | 47 |
| 0,064 | | | | 38 |
| 0,125 | | | | 40 |
| 0,25 | | | 2 | 30 |
| 0,5 | 1 | 1 | 2 | 18 |
| 1 | | | 9 | 5 |
| 2 | | | 9 | |
| 4 | | | 8 | |
| 8 | | | 8 | 1 |
| 16 | | 1 | | |
| 32 | | 1 | | |
| CMI | GENOTIPO | | | |

B

| Mutación | A2142C | A2142G | A2143G |
|------------|--------------|--------------|----------------|
| Frecuencia | (1/42) 2,38% | (3/42) 7,14% | (38/42) 90,47% |

Tabla 3.1. (A) Distribución de los aislamientos de acuerdo a la mutación y CMI. **(B)** Frecuencia de las mutaciones A2143G, A2142G y A2142C en los aislamientos con mutación

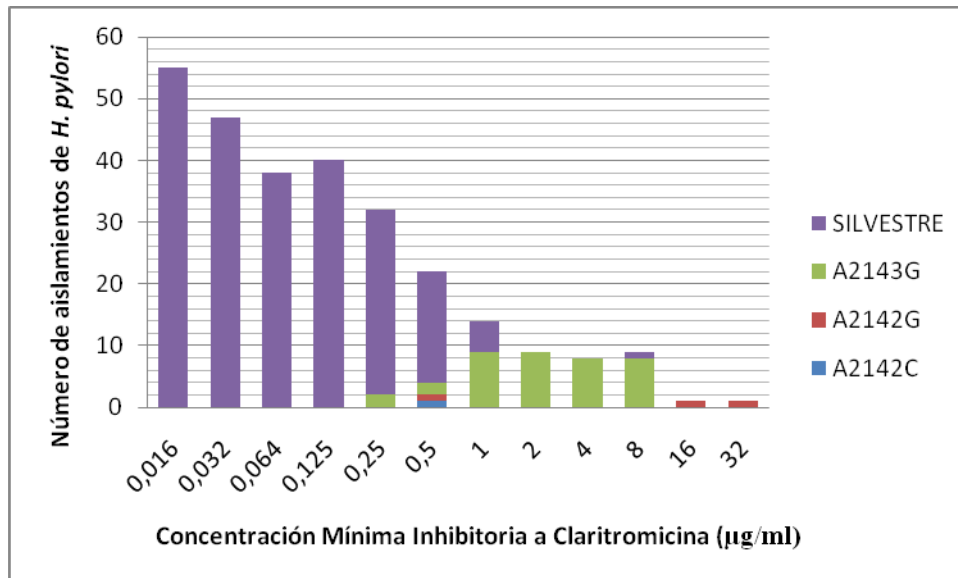


Figura 3.2. Distribución de los aislamientos de *H. pylori* de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria y el genotipo de 23S rRNA.

Discusión

La prevalencia de resistencia a claritromicina encontrada en este estudio durante tres años de seguimiento (2009, 2010 y 2011) en Bogotá - Colombia fue de 13,6%, manteniéndose estable durante todo el periodo de estudio. Este valor es menor al encontrado por nuestro grupo de investigación en pacientes estudiados entre 2008 - 2009 (17,7%) (Trespalcios *et al.*, 2010) y al reportado por Henao *et al.*, en aislamientos obtenidos durante el años 2007 (15%) (Henao *et al.*, 2009), en la ciudad de Bogotá. Las diferencias de prevalencia entre los estudios seguramente es influenciada por la técnica utilizada para determinar la susceptibilidad de los aislamientos a claritromicina. En el primer estudio realizado por nuestro grupo la susceptibilidad fue obtenida con E-test y en el estudio de Henao *et al.*, por difusión en disco. En el presente estudio la susceptibilidad se determinó por dilución en agar, considerada el estándar de oro para la determinación de susceptibilidad de *H. pylori* a los antimicrobianos, en el año 2008 nuestro grupo realizó una revisión sistemática de la literatura con el objetivo de determinar las características operativas del E-test con la prueba de referencia dilución en agar, encontrando una sensibilidad de 100% y una especificidad de 75% (Rey *et al.*, 2008), de acuerdo a estas características operativas, E-test sobrestima el valor de la resistencia porque arroja falsos positivos, esto está acorde con los resultados encontrados en este estudio en donde la prueba de referencia demuestra que la prevalencia de resistencia a claritromicina es menor a la determinada en estudios anteriores en la misma población. Sin embargo, las diferencias no son muy grandes entre estudios y nos permiten comprender que los niveles de prevalencia

de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina se encuentran por debajo del 15%, lo que significa que siguiendo las recomendaciones del Consenso de Mastrich III (Malfertheiner *et al.*, 2007), este medicamento continua siendo una alternativa de tratamiento en la población estudiada, sin embargo debido a que 13 de cada 100 pacientes son resistentes a claritromicina y la resistencia es causa de falla en la erradicación, no se aconseja su uso de manera empírica en esta población y debe ser formulado de acuerdo a los resultados de pruebas de susceptibilidad. A pesar de las diferencias en los resultados de E-test frente a la dilución en agar, esta sigue siendo una buena alternativa para la evaluación de susceptibilidad, ya que aunque sobreestima la resistencia siempre va a determinar los verdaderos resistentes y por lo tanto será una buena guía para los clínicos en el momento de definir el esquema de erradicación en un paciente. Sin embargo, para vigilar prevalencia de la resistencia en la población es mejor utilizar la dilución en agar.

Para identificar las mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina se amplificaron dos regiones del gen 23S rRNA. La mutación A2143G fue la mas frecuente en los aislamientos de *H. pylori* (90,47%), seguida de A2142G (7,14%) y A2142C (2,3%). La frecuencia de cepas de *H. pylori* con mutaciones a claritromicina varía entre áreas geográficas, en Estados Unidos el 48 – 53% portan la mutación A2142G, en Europa se ha reportado 23 – 33% para A2142G, 44 – 67% A2143G y A2142C de 2 a 10%. Estudios en Japón demuestran que mas del 90% de las mutantes tienen el genotipo A2143G, y estudio en China indican que el 100% de las mutantes son A2143G (Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002), nuestro estudio tiene un comportamiento similar al observado en Asia, con una alta

frecuencia de la mutación A2143G, estos hallazgos coinciden con los trabajos realizados al sur de Colombia, en donde la mutación A2143G fue la más frecuente entre los aislamientos con mutaciones (Alvarez *et al.*, 2009b). La caracterización de los mecanismos de resistencia en cada país puede facilitar el desarrollo de métodos rápidos de detección de la resistencia, para seleccionar el esquema de tratamiento y controlar la infección. La concentración mínima inhibitoria y la secuencia del gen 23S rRNA fueron determinadas en la totalidad de los aislamientos obtenidos de los pacientes que ingresaron al estudio. Los análisis muestran que de los 42 aislamientos con mutación el 85,71% (36/42) fueron resistentes a claritromicina (CMI $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) y 14,2% (6/42) susceptibles. De igual manera 14,2% de los aislamientos resistentes no tienen mutación. No se encontró una relación entre la concentración mínima inhibitoria y la mutación aunque 2 de los tres aislamientos con A2142G mostraron CMI superiores a $16 \mu\text{g/ml}$, pero 1/3 fue susceptible; las mutantes A2143G presentaron CMI $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ y 4 de estos aislamientos tuvieron CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, por lo tanto la presencia de mutación no necesariamente se relaciona con resistencia en todos los casos, lo que significa que la relevancia clínica de estas mutaciones debe ser estudiada y aclarada. La ausencia de mutación en algunos aislamientos resistentes implica que otros mecanismos de resistencia pueden estar implicados en la resistencia a claritromicina, como por ejemplo porinas o bombas de expulsión.

En conclusión este es el primer estudio realizado en Colombia, en donde se investiga la susceptibilidad de *H. pylori* a claritromicina utilizando el estándar de oro recomendado por la CLSI; la dilución en agar y el primer estudio que determina las mutaciones relacionadas con resistencia por secuenciación directa

de regiones del gen 23S rRNA y lo relaciona con la concentración mínima inhibitoria. El estudio muestra que el mecanismo mas frecuente relacionado con resistencia a claritromicina es la mutación A2143G en el gen 23S rRNA, pero que otros mecanismos pueden estar involucrados en el 14,2 % de los aislamientos. Se recomienda conducir mas estudios para aclarar el significado clínico que tiene cada mutación en el éxito terapéutico y continuar con la vigilancia de la resistencia de *H. pylori* a claritromicina.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por Colciencias, como parte del proyecto “Erradicación de *Helicobacter pylori*: triple terapia con levofloxacin”. Código 1203-408-20464.

Referencias

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinoso, E., Martinez, J. W. & Beltran, L. (2009a). [Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia]. *Rev Med Chil* **137**, 1309-1314.

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F. & Reinoso, E. (2009b). Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4022-4024.

CLSI, Clinical, and, Laboratory, Standards & Institute (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing:twentieth informational supplement: M100-S20. *CLSI, Wayne, PA, USA.*

Choi, I. J., Jung, H. C., Choi, K. W. & other authors (2002). Efficacy of low-dose clarithromycin triple therapy and tinidazole-containing triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* **16**, 145-151.

De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E. & Zullo, A. (2010). Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis* **19**, 409-414.

Fontana, C., Favaro, M., Minelli, S., Criscuolo, A. A., Pietroiusti, A., Galante, A. & Favalli, C. (2002). New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3765-3769.

Graham, D. Y., Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J., Jr., Klein, P. D. & Adam, E. (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. *Drugs* **68**, 725-736.

Henao, S. C., Quiroga, A., Martinez, J. D. & Otero, W. (2009). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* **24** 110 -114.

Kato, M., Yamaoka, Y., Kim, J. J. & other authors (2000). Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2214-2216.

Kim, J. J., Reddy, R., Lee, M., Kim, J. G., El-Zaatari, F. A., Osato, M. S., Graham, D. Y. & Kwon, D. H. (2001). Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* **47**, 459-461.

Capítulo 3

Kim, K. S., Kang, J. O., Eun, C. S., Han, D. S. & Choi, T. Y. (2002). Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* **17**, 599-603.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. & other authors (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781.

Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bebear, C. M., Lamouliatte, H. & Megraud, F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2724-2728.

Rey, M., Avila, J. M., Trespalacios, A. A., Villamizar, O. R., Otero, O. & Mercado, M. M. (2008). Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. *NOVA* **6**, 219 - 229.

Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2008). Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3465-3466.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 79-88.

Taylor, D. E., Ge, Z., Purych, D., Lo, T. & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2621-2628.

Trespalacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* **21**, 31 - 38.

Vakil, N. & Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **133**, 985-1001.

Versalovic, J., Osato, M. S., Spakovsky, K. & other authors (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* **40**, 283-286.

Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. & Graham, D. Y. (1999). Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut* **45**, 804-811.

Análisis de las secuencias de *gyrA* en aislamientos de *Helicobacter pylori* en Bogotá - Colombia

En Colombia no se ha estudiado la resistencia de *Helicobacter pylori* a levofloxacina; uno de los antibióticos considerados de segunda línea cuando un paciente tiene falla terapéutica al primer tratamiento de erradicación de la infección, o de primera línea cuando la resistencia a claritromicina se encuentra por encima del 15% en una población.

En el siguiente manuscrito, se describe la resistencia a levofloxacina de *H. pylori* en aislamientos obtenidos de pacientes con enfermedad gastroduodenal en la Clínica Fundadores de la ciudad de Bogotá. La región determinante de resistencia a las quinolonas en el gen *gyrA* de *H. pylori* fue amplificado por PCR y los productos secuenciados.

Objetivos: Los objetivos de este estudio fueron (i) determinar la prevalencia de la resistencia primaria de *H. pylori* a levofloxacina entre 2008 y 2011 y (ii) evaluar la diversidad de secuencias de *gyrA* en aislamientos de *H. pylori* de pacientes de Bogotá, Colombia.

Materiales y métodos: La susceptibilidad a levofloxacina fue examinada por dilución en agar en aislamientos clínicos de 256 pacientes referidos a endoscopia digestiva alta en la Clínica Fundadores, Bogotá – Colombia. Las mutaciones en la

región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR) fueron evaluadas por secuenciación directa.

Resultados: La resistencia global a levofloxacin fue (15,6%) entre 2009 y 2011. La resistencia para 2009, 2010 y 2011 fue 13,4% (15/112); 14,85% (15/101) y 23,2% (10/43) respectivamente. Las cepas resistentes mostraron mutaciones en la región QRDR en las posiciones Asn87 o Asp91. La mayoría de las sustituciones mas comunes fueron N87I, presente en el 47,16% (25/43), seguido de D91N con una frecuencia de 30,1% (15/53) y N87K, 13.2% (6/53). Diferentes patrones de aislamientos silvestres fueron observados; 2 en la posición Asn87 (AAT o AAC), otros en la tripleta Asp86 (GAC), Asp88 (GCA) y una sustitución con el aminoácido Thr87 (ACC). Finalmente otra variante silvestre tenía polimorfismo en las posiciones 87(AAC) and 88(GCA). Otros polimorfismos encontrados en aislamientos resistentes y aislamientos susceptibles fueron hallados en las posiciones His82 (CAC→CAT), Leu93 (CTA→TTA) and Ala97 (GCG→GCA).

Conclusiones: Los resultados demuestran que la prevalencia primaria de *H. pylori* ha venido incrementándose en Colombia y que esta resistencia es causada por mutaciones en la región QRDR de *gyrA*. Programas de vigilancia de la resistencia deben ser creados en Colombia.

Analysis of *gyrA* sequences and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Bogotá, Colombia

Alba A. Trespalacios¹, Emiko Rimbara^{2,3}, Marcela M. Mercado¹, William. Otero⁴, Jorge E. Caminos⁵, Jenny. Avila¹, Lilibiana E. Rosero¹, Azucena. Arévalo¹, Rita. Reddy^{2,3}, David Y. Graham^{2,3}.

¹Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C, Colombia ²Department of Medicine, Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center Houston, TX, United States

³Baylor College of Medicine, Houston, TX, United States

⁴Gastroenterology Unit Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

⁵Biochemistry Unit, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

Corresponding author. Present address: Alba A. Trespalacios, Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 N° 43-82. Bogotá – Colombia. Tel: 571 +3208320 ext 4155.

E-mail: alba.trespalacios@javeriana.edu.co

Abstract

Increasing resistance of *H. pylori* to clarithromycin and metronidazole has resulted in the substitution of fluoroquinolones such as levofloxacin in eradication therapy; however quinolone resistance of *H. pylori* is also increasing. Choice of antimicrobials should be based on knowledge of the local prevalence of resistance. The resistance of *H. pylori* strains to levofloxacin in Colombia has not yet been reported.

Objective: The aims of the present study were (i) to determine the prevalence of primary levofloxacin resistance from 2008 to 2011 and (ii) to evaluate the diversity in *gyrA* sequences of *H. pylori* isolated from patients from Bogotá, Colombia.

Methods: Levofloxacin susceptibility was assessed by agar dilution using *H. pylori* isolates from patients referred for gastroscopy in Bogotá – Colombia. The mutations in *gyrA* affecting the quinolone resistance determining region (QRDR) were evaluated by direct sequencing.

Results: Overall, the primary levofloxacin resistance was 15.6% (40/256) collected from 2009 to 2011. The resistance rate increased from 13.4% (15/112) in 2009, 14.8% (15/101) in 2010 23.2% (10/43) in 2011. A total of 349 isolates from 256 patients were recovered, the MIC distribution showed (53/349) resistant and (296/349) susceptible *H. pylori* isolates. Mutations in levofloxacin resistant strains were found in QRDR at positions 87 and 91. The most common substitution was

N87I, present on 47.2% (25/53) followed by D91N with a frequency of 30.1% (16/53) and N87K present on 13.2% (6/53).

Conclusions: The prevalence of primary resistance levofloxacin has been increasing in Colombia most likely mediated through point mutation in *gyrA*. Continuing surveillance of quinolone resistance among *H. pylori* is important. These results would be of value in the management of *H. pylori* infections.

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is an important human pathogen that causes gastroduodenal inflammation resulting in duodenal ulcer disease, gastric ulcer disease, gastric adenocarcinoma and primary B-cell gastric lymphoma (Liu *et al.*, 2005; Rimbara *et al.*, 2011). The National Institutes of Health in the United States, the Maastricht Consensus in Europe, Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection and the Canadian Consensus all recommended eradication for the treatment/or prevention of these disorders and also to reduce the occurrence of new gastric cancers especially after endoscopic resection (Bourke *et al.*, 2005; Caselli *et al.*, 2007; Chey & Wong, 2007; Fock *et al.*, 2009; Howden & Hunt, 1998; Malfertheiner *et al.*, 2007). Resistance of *Helicobacter pylori* to the standard therapeutic antimicrobials (clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and tetracycline) has been demonstrated and the success of triple therapy combination of a PPI plus clarithromycin and amoxicillin has fallen to 80% or below in most countries making it urgent to identify other treatment options (Graham *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2008; Graham & Fischbach, 2010).

Fluoroquinolones, such as levofloxacin has been evaluated as an alternative to standard antibiotics against *H. pylori*; however quinolone resistance of *H. pylori* is also increasing (Bogaerts *et al.*, 2006; De Francesco *et al.*, 2010; Miyachi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010) (reference). The most common mechanism of fluoroquinolone resistance involves mutations in the DNA gyrase gene and in the

DNA topoisomerase IV gene. These genes encode large enzymatic quaternary structures that consist of two pairs of subunits: GyrA and GyrB (DNA gyrase) and ParC and ParE (DNA topoisomerase IV). Because topoisomerase IV is absent in *Helicobacter pylori*, fluoroquinolone resistance is thought to be mainly due to mutations in the DNA gyrase gene (*gyrA* gene), which encodes the DNA gyrase subunit A (GyrA) (Cattoir *et al.*, 2007; Miyachi *et al.*, 2006). Therefore, the absence of a secondary target for fluoroquinolones indicates that a single modification in the *gyrA* gene is sufficient for producing a fluoroquinolone-resistant phenotype. The amino acid substitutions observed in clinical strains have been primarily reported at positions 87 (Asn to Lys) and 91 (Asp to Gly, Asp to Asn, or Asp to Tyr (6,19,26)(Hung *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2009).

The prevalence of levofloxacin resistance seems to be increasing worldwide with dramatic detrimental effects on the treatment success by levofloxacin-based therapy. Therefore the prescription of a levofloxacin therapy should be a result of the knowledge of the local prevalence. The resistance of *H. pylori* strains to levofloxacin in Colombia has not previously been reported. The aims of the present study were (i) to determine the prevalence rate of primary levofloxacin resistance from 2009 to 2011 and (ii) to evaluate the *gyrA* sequence diversity among *H. pylori* isolated from patients from Bogotá, Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Patients: Adult patients referred for gastroscopy at the Gastroenterology Unit of Clínica Fundadores, Bogotá, Colombia; between January 2009 and May 2011 were enrolled in the study. Written informed consent for participation was obtained

from each of the patients before entry into the study. The protocol was approved by ethical committee of Javeriana University and Clínica Fundadores, Bogotá, Colombia. Patients were excluded if they were taking PPI or H₂-receptor antagonists in the 4 weeks preceding the enrollment of this study, patients with previous anti-*H. pylori* treatment were not included. Biopsies specimens were obtained for bacterial culture, susceptibility test and DNA extraction. The status of the infection was confirmed by rapid urease test (RUT) and histopathology (Giemsa stain).

Bacterial strains, culture conditions, and determination of susceptibility to

levofloxacin: Biopsies samples were crushed in 0.5 mL of PBS and cultured in Wilkins Chalgren Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) containing 7% horse blood, vancomycin (10 mg/L) and trimethoprim (5 mg/L). The plates were incubated at 37°C under microaerophilic conditions for up to 14 days. *H. pylori* grown were confirmed by typical colony morphology, Gram stain and by positive oxidase, catalase and urease tests.

Levofloxacin MICs for the recovered *H. pylori* strains were measured for using the agar dilution method according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI)(CLSI *et al.*, 2010). The resistance breakpoint was determined as ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ (Kim *et al.*, 2005). The agar dilution method was performed by serial two fold dilution on Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson, MD) with 5% sheep blood using 1 to 3 μL of a McFarland 2.0

adjusted inoculum and incubation at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 72 h under microaerophilic conditions. For quality control, *H. pylori* NCTC 11637, was used.

DNA extraction, PCR amplification and nucleotide sequence analysis:

Genomic DNA of *H. pylori* strains was extracted using DNAzol® kit (Invitrogen - USA). The DNA of all samples was stored at -20°C until use.

To detect gene mutation of the quinolone resistance determining regions (QRDRs) of the A subunit of the DNA gyrase (*gyrA*), the degenerated oligonucleotide primers reported by Tankovic *et al*, 2003 (Tankovic *et al.*, 2003); 5'-TTT RGC TTA TTC MAT GAG CGT-3' and 5'-GCA GAC GGC TTG GTA RAA TA-3' were used. Primers were synthesized by Invitrogen – USA. The size of the amplified fragments of *gyrA* was 428 bp. The PCR was performed with PCR Master Mix - Promega (WI, USA) using 1.0 μL of template DNA, 1.0 pmol/L of each primer, in a final volume of mix reaction of 20 μL . The cycling conditions were first 3 minutes at 94°C followed of 35 cycles of 1 min denaturation at 94°C , 1 min annealing at 57°C and 1 min extension at 72°C . PCR products were analysed by 1,5% agarose gel electrophoresis, followed by SYBR Green (Invitrogen – USA) staining for 30 minutes. PCR product purification and direct sequencing was performed by Macrogen, Korea. The oligonucleotides used for *gyrA* PCR were also used for DNA sequencing. The sequences were compared with the published sequence of the *H. pylori gyrA* gene (GeneBank accession No.L29481).

RESULTS

The prevalence levofloxacin resistance

A total of 256 patients were enrolled. Primary levofloxacin resistance was 15.6% (IC95% 7 -19%) patients. The resistance rate for 2009, 2010 and 2011 was 13.4% (IC95% 7–19%); 14.85% (IC95% 7-22%) and 23.2% (IC95% 10-35%), respectively. No significant difference was found for 2009 to 2010 ($p=0.88$), and no significant difference was observed for 2010 to 2011 ($p=0.22$).

MICs and *gyrA* mutations

One or two *H. pylori* isolates were obtained from each patient; the total of isolates from 256 patients was 349; the MIC distribution showed 53 resistant and 296 susceptible *H. pylori* isolates. MICs for levofloxacin resistant strains ranged from 1 to 32 µg/mL. The MICs distributions of susceptible strains were 0.032 to 0.5 µg/mL (Figure 1). Among the patients with two isolates ($n=40$), 6 patients (15%) had a mixed infection with both susceptible and resistant isolates. No mixed infections of resistance strains with different mutations was observed.

GyrA mutations in levofloxacin resistant strains ($n=53$) were found in QRDR at Asn87 or Asp91 (Table 1). The most common mutation was N87I, present in 47.2% (25/53) of resistant strains, followed by D91N with a frequency of 30.1% (16/53) and N87K present on 13.2% (6/53). One levofloxacin resistant strain (MIC=1 µg/mL) did not have mutation in GyrA. Two susceptible strains had N87I mutations the MICs to levofloxacin were 0.5 µg/mL for both strains. Double mutation at 87 and 91 position (N87Y and D91G) was observed in one strain.

Sequence analysis of susceptible strains

Polymorphisms were observed in susceptible strains, the majority of changes were found at positions 86, 87 and 88. Four wild type variants were observed when sequence analysis was done, 2 of them had polymorphisms at triplet Asn87 (AAT or AAC), the frequency at triplet AAC was 59.1% (175/296) and 23.6% (70/296) for AAT triplet; the other wild type variant found in this study has polymorphism at triplet 86 (GAC), 87 (ACC) and 88(GCA) with amino acid substitution Asn87→Thr (N87T), the frequency was 16.8% (50/296); finally the last wild type variant had polymorphisms at 87(AAC) and 88(GCA) positions, the frequency was 0.33% (1/296) (Table 2). Others polymorphisms observed in resistance and susceptible strains were found at positions His82(CAC→CAT), Leu93(CTA→TTA) and Ala97(GCG→GCA).

DISCUSSION

In this study we investigated primary levofloxacin resistance in *H. pylori* isolates obtained during 2009 to 2010 in Bogotá, Colombia. The prevalence of primary levofloxacin resistant was 15.6%. During the observation period, increasing tendency of the resistance was observed; 13.4% (2009), 14.85% (2010) and 23.2% (2011). This is the first report on primary resistance to levofloxacin in Colombia and the results were unexpected, because the levofloxacin is not commonly used for *H. pylori* eradication treatment in Colombia; a possible explanation is the use of quinolones for the treatment of other infection diseases, such as respiratory infection and urinary tract infection.

Our results are similar to reported in other countries; a systematic review published in 2010 showed a global worldwide levofloxacin resistance of 16.2% (95% IC 14.4 – 18.0) with higher level of resistance in Europe (24.1%), and middle level of resistance in Asia(11.6%), with differences among Asia countries; Japan (14.9%), Taiwan 11.9% and Hong Kong 2.6% (De Francesco *et al.*, 2010).

QRDR mutations in levofloxacin resistant *H. pylori* isolates had been formerly reported. No correlation appeared between mutation and the level of the resistance in our strains. However, some resistant isolates with N87I and D91G mutations showed higher MICs values (32 µg/mL). These data are similar of previously reports in Asia and Europe (Miyachi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Among susceptible strains, two of them had a N87I mutation, it could be because the MICs of these strains were close to breakpoint. We decided to use 1 µg/mL for the breakpoint of levofloxacin resistance as this breakpoint is used in most studies. However, more studies are needed to correlate MIC and clinical outcome.

Overall in QRDR mutation were most often present at positions 87 and 91. N87I, N87K, N87Y, D91G, D91N and D91Y were the mutations found in this study. 52/53 (98.1%) of resistant (MIC >1 µg/mL) strains had mutations in *gyrA* showing that mutations in the *gyrA* gene is the principal mechanism of levofloxacin resistance in Colombian isolates. One of our isolates (MIC=1 µg/mL) did not have a mutation in QRDR of the *gyrA* gene, further studies are necessary to identify the resistance mechanism in this strain.

The N87I mutation was detected in 47.2% of levofloxacin-resistant strains, followed by D91N with a frequency of 30.1% and N87K present in 13.2% (6/53).

These results show a different distribution than reported in Europe, Asia or Canada (North America), in which areas major mutations were N87K and D91G (Cambau *et al.*, 2009; Miyachi *et al.*, 2006). N87I mutation came of amino acid substitution of sequence of wild type *H. pylori* J99, Thr87→Ileu, with change (C to T) at codon 87 ACC→ATC (Cattoir *et al.*, 2007).

In conclusion the results demonstrated that the prevalence of primary resistance to levofloxacin has been increasing in Colombia and the resistance is most likely mediated through point mutation in *gyrA*. The continuous surveillance of quinolone resistance among *H. pylori* is important in this country.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by COLCIENCIAS (Colombia), Grant 120340820464 and Internal Project of Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center and Baylor College of Medicine. The authors declare that they have no competing interests related with the results of the manuscript.

Dr. Graham is supported in part by the Office of Research and Development Medical Research Service Department of Veterans Affairs, Public Health Service Grant DK56338, which funds the Texas Medical Center Digestive Diseases Center, DK067366 and CA116845. The contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the VA or NIH.

Table 1. Distribution of mutation in *gyrA* gene among *H. pylori* resistant strains.

| Mutation | Pattern | GyA amino acid substitution and <i>gyrA</i> nucleotides substitution | | | | Levofloxacin MIC (µg/ml) | No. of strains | Frecuency |
|----------------------|---------|--|------------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------|-----------|
| | | 86 | 87 | 88 | 91 | | | |
| N87I | R2 | Asp (GAT) | Ile (ATC) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 4 - 8 | 2 | 47.16% |
| | R3 | Asp (GAC) | Ile (ATC) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 2 - 16 | 5 | |
| | R4 | Asp (GAC) | Ile (ATC) | Ala (GCA) | Asp (GAT) | 1 - 32 | 16 | |
| | R5 | Asp (GAC) | Ile (ATC) | Thr (ACA) | Asp (GAT) | 8 | 1 | |
| TOTAL N87I mutations | | | | | | | 25 | |
| N87K | R6 | Asp (GAT) | Lys (AAA) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 2 - 16 | 7 | 13.2% |
| N87Y | R7 | Asp (GAT) | Tyr (TAT) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 4 | 1 | 1.88% |
| N87Y D91G | R8 | Asp (GAT) | Tyr (TAT) | Ala (GCG) | Gly (GGT) | 32 | 1 | 1.88% |
| D91G | R9 | Asn (GAT) | Asn (AAT) | Ala (GCG) | Gly (GGT) | 2 - 32 | 11 | 30.18% |
| D91N | R10 | Asn (GAT) | Asn (AAC) | Ala (GCG) | Asn (AAT) | 1 | 1 | 1.88% |
| D91Y | R11 | Asn (GAT) | Asn (AAC) | Ala (GCG) | Tyr (TAT) | 2 | 1 | 1.88% |
| No mutation | R12 | Asn (GAT) | Asn (AAC) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 4 | 1 | 1.88% |

Análisis de mutaciones relacionadas con resistencia

Table 2. Distribution of wild type sequences found in *gyrA* gene among *H. pylori* susceptible strains

| Pattern | Levofloxacin MIC ($\mu\text{g/ml}$) | GyA amino acid substitution and <i>gyrA</i> nucleotides substitution | | | | No. of strains | Frecuency |
|---|---------------------------------------|--|------------------|-----------|--|----------------|-----------|
| | | 86 | 87 | 88 | 91 | | |
| WT1 | 0.125 – 0.5 | Asp (GAT) | Asn (AAC) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 175 | 59.1% |
| WT2 | 0.125 – 0.5 | Asp (GAT) | Asn (AAT) | Ala (GCG) | Asp (GAT) | 70 | 23.6% |
| WT3 | 0.031 -0.250 | Asp (GAC) | Thr (ACC) | Ala (GCA) | Asp (GAT) | 50 | 16.8% |
| WT4 | 0.125 | Asp (GAT) | Asn (AAC) | Ala (GCA) | Asp (GAT) | 1 | 0.33% |
| Other polymorphisms present in resistance and susceptible strains | | | | | 82 CAC (His) \rightarrow CAT (His) 93 CTA (Leu) \rightarrow TTA (Leu) 97 GCG (Ala) \rightarrow GCA (Ala) | | |

Figure 1. MICs distribution of isolates from 2009 to 2011 in Bogotá - Colombia

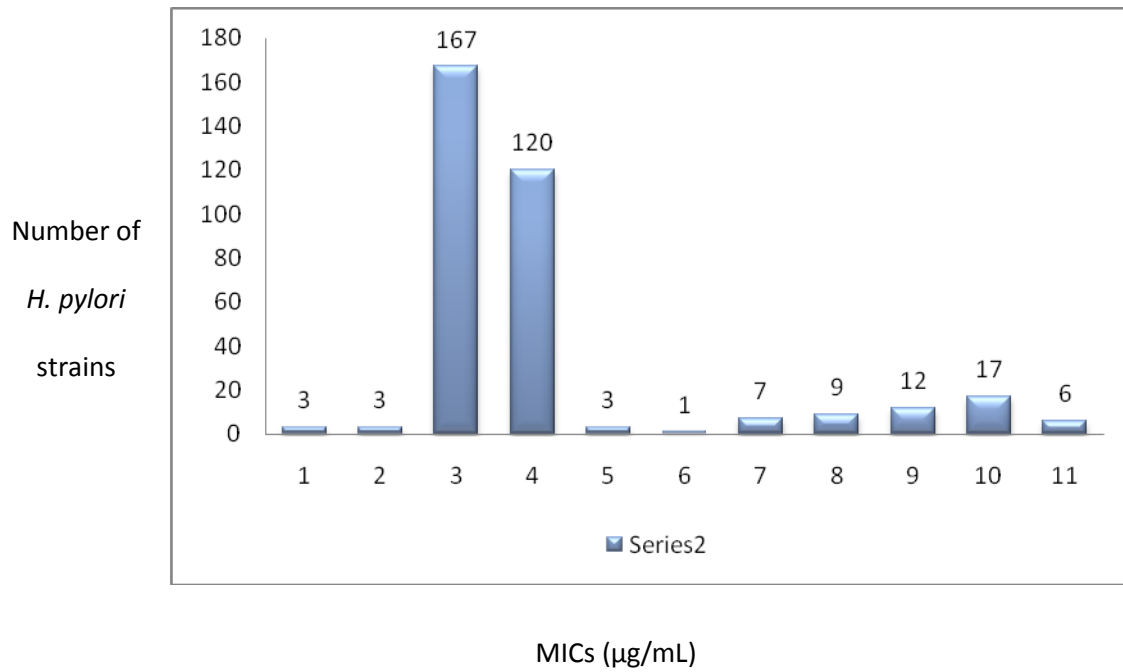
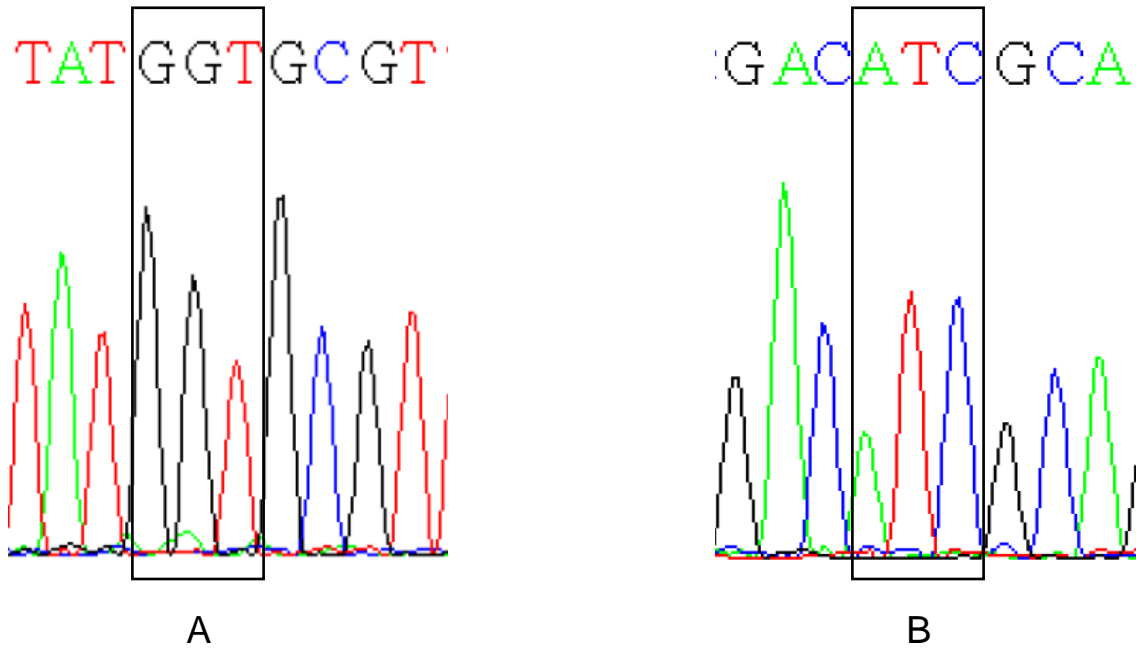


Figure 2. Most common mutation in *gyrA* gene of *H. pylori* Colombian strains. (A) D91G, 91 (GGT); (B) N87I, 87(ATC);



References

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinos, E., Martinez, J. W. & Beltran, L. (2009a). [Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia]. *Rev Med Chil* **137**, 1309-1314.

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F. & Reinos, E. (2009b). Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4022-4024.

Bogaerts, P., Berhin, C., Nizet, H. & Glupczynski, Y. (2006). Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* **11**, 441-445.

Bourke, B., Ceponis, P., Chiba, N. & other authors (2005). Canadian *Helicobacter* Study Group Consensus Conference: Update on the approach to *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents--an evidence-based evaluation. *Can J Gastroenterol* **19**, 399-408.

Cambau, E., Allerheiligen, V., Coulon, C., Corbel, C., Lascols, C., Deforges, L., Soussy, C. J., Delchier, J. C. & Megraud, F. (2009). Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **47**, 3600-3607.

Caselli, M., Zullo, A., Maconi, G., Parente, F., Alvisi, V., Casetti, T., Sorrentino, D. & Gasbarrini, G. (2007). "Cervia II Working Group Report 2006": guidelines on diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Italy. *Dig Liver Dis* **39**, 782-789.

Cattoir, V., Nectoux, J., Lascols, C., Deforges, L., Delchier, J. C., Megraud, F., Soussy, C. J. & Cambau, E. (2007). Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* **29**, 389-396.

CLSI, Clinical, and, Laboratory, Standards & Institute (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing:twentieth informational supplement: M100-S20. *CLSI, Wayne, PA, USA*.

Chey, W. D. & Wong, B. C. (2007). American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* **102**, 1808-1825.

Choi, I. J., Jung, H. C., Choi, K. W. & other authors (2002). Efficacy of low-dose clarithromycin triple therapy and tinidazole-containing triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* **16**, 145-151.

De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E. & Zullo, A. (2010). Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis* **19**, 409-414.

Duque-Jamaica, R., Arevalo-Galvis, A., Poutou-Pinales, R. A. & Trespalacios, A. A. Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **15**, 303-312.

Fock, K. M., Katelaris, P., Sugano, K. & other authors (2009). Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1587-1600.

Fontana, C., Favaro, M., Minelli, S., Criscuolo, A. A., Pietroiusti, A., Galante, A. & Favalli, C. (2002). New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3765-3769.

Graham, D. Y., Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J., Jr., Klein, P. D. & Adam, E. (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2007). A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* **12**, 275-278.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. *Drugs* **68**, 725-736.

Graham, D. Y. & Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* **59**, 1143-1153.

Henao, S. C., Quiroga, A., Martinez, J. D. & Otero, W. (2009). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* **24** 110 -114.

Howden, C. W. & Hunt, R. H. (1998). Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* **93**, 2330-2338.

Hung, K. H., Sheu, B. S., Chang, W. L., Wu, H. M., Liu, C. C. & Wu, J. J. (2009). Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* **14**, 61-65.

Kato, M., Yamaoka, Y., Kim, J. J. & other authors (2000). Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2214-2216.

Kim, J. J., Reddy, R., Lee, M., Kim, J. G., El-Zaatari, F. A., Osato, M. S., Graham, D. Y. & Kwon, D. H. (2001). Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* **47**, 459-461.

Kim, J. M., Kim, J. S., Kim, N., Jung, H. C. & Song, I. S. (2005). Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother* **56**, 965-967.

Kim, K. S., Kang, J. O., Eun, C. S., Han, D. S. & Choi, T. Y. (2002). Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* **17**, 599-603.

Liu, Y., Ponsioen, C. I., Xiao, S. D., Tytgat, G. N. & Ten Kate, F. J. (2005). Geographic pathology of *Helicobacter pylori* gastritis. *Helicobacter* **10**, 107-113.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. & other authors (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781.

Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N. & other authors (2006). Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* **11**, 243-249.

Murakami, K., Okimoto, T., Kodama, M. & other authors (2009). Sitafloxacin activity against *Helicobacter pylori* isolates, including those with *gyrA* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3097-3099.

Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bebear, C. M., Lamouliatte, H. & Megraud, F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2724-2728.

Rey, M., Avila, J. M., Trespalacios, A. A., Villamizar, O. R., Otero, O. & Mercado, M. M. (2008). Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. *NOVA* **6**, 219 - 229.

Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2008). Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3465-3466.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 79-88.

Tankovic, J., Lascols, C., Sculo, Q., Petit, J. C. & Soussy, C. J. (2003). Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3942-3944.

Taylor, D. E., Ge, Z., Purych, D., Lo, T. & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2621-2628.

Trespalacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* **21**, 31 - 38.

Vakil, N. & Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **133**, 985-1001.

Versalovic, J., Osato, M. S., Spakovsky, K. & other authors (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* **40**, 283-286.

Wang, L. H., Cheng, H., Hu, F. L. & Li, J. (2010). Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol* **16**, 2272-2277.

Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. & Graham, D. Y. (1999). Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and *cagA* status. *Gut* **45**, 804-811.

Sequential Statistical Improvement of the Liquid Cultivation of *Helicobacter pylori*

Rocio Duque-Jamaica,^{*,†} Azucena Arévalo-Galvis,^{‡,§} Raúl A. Poutou-Piñales[†] and Alba A. Trespalacios[§]

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera de Microbiología Industrial, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá, DC, Colombia, [†]Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá, DC, Colombia, [‡]Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Maestría en Ciencias Biológicas, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá, DC, Colombia, [§]Laboratorio de Microbiología Especial, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá, DC, Colombia

Keywords

H. pylori, liquid culture, response surface methodology, Box-Behnken design, general factorial design, D-optimal reduce design

Reprint requests to: Raúl A. Poutou-Piñales, Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá, DC, Colombia.
E-mail: rpoutou@javeriana.edu.co

Abstract

Background: Colonization of the gastric mucosa by *Helicobacter pylori* is one of the most important causes of acute and chronic gastric pathologies in humans. Achieving the growth of *H. pylori* in liquid media is of great importance in the development of clinical studies. In this study, we developed a sequential optimization strategy based on statistical models to improve the conditions of liquid culture of *H. pylori*.

Materials and Methods: Four statistical models were sequentially used. First, a Box-Behnken design was used to select the best process conditions (shaking speed, inoculum concentration, and final volume of culture). Secondly, a general factorial design was used to evaluate the influence of adding gel blocks or gel beads (shape and composition). Then a D-optimal reduce design was carried out to allow the selection of the most influential factors in increasing the cell concentration (culture media components). Finally, another Box-Behnken design was used to optimize the concentration of the culture media components previously selected.

Results: After 12 hours of liquid culture a concentration of 25×10^8 cells per mL ($9.4 \log_{10}$ cells per mL) of *H. pylori* was obtained, compared with a predicted 32×10^8 ($9.5 \log_{10}$ cells per mL), which means between 1 and 5 \log_{10} units higher than some previous reports.

Conclusions: The sequential statistical approach increased the planktonic *H. pylori* cell culture. The final culture media and conditions were: Brain Heart Infusion, blood agarose (1.5% w/v), lamb's blood (3.18% v/v), DENT (0.11% v/v), and Vitox (0.52% v/v) at 60 rpm and 37 °C with filtered CO₂ (5% v/v) bubbled directly into the culture media in a final volume of 76.22 mL.

Helicobacter pylori is associated with pathologies of varying severity. This organism was first isolated in 1982 and has been identified as the causal agent of most cases of peptic ulcer or chronic gastritis, increasing the risk of gastric cancer from three to six times [1–4]. It is known that over 90% of gastric lymphomas (MALT) are caused by *H. pylori* [3]; this organism persists as an asymptomatic infection for decades in most individuals, although only a minority develops significant clinical manifestations [5].

Helicobacter pylori requires a complex growth medium with microaerophilicity being its main characteristic (O₂ between 2% and 5%, and CO₂ between 5% and 10%). Typically, for liquid cultures, Brucella broth (BD) and Mueller-Hinton and Brain Heart Infusion (BHI) have been used, supplemented with calf serum between 2% and 10% or β -cyclodextrin between 0.2% and 1%, often with supplements such as antibiotics, amino acids, and vitamins. In many laboratories, usually high humidity and microaerophilic (85% N₂, 10% CO₂, and

5% O₂) conditions are used at 37 °C and neutral pH [6]. The fetal bovine serum has been used as culture media supplement in most studies and it remains one of the most influential factors *in vitro* [7].

In general the culture medium for a microorganism must be improved to increase the biomass (*X*) or product yield (*Y_{p/s}*) and/or productivity (*P*). The process of improving the culture medium through the study of one-factor-at-a-time is a laborious and time consuming method and involves changing one variable at a time (the concentration of the supplements, the atmosphere, temperature, etc.) while fixing the other variables arbitrarily [8], and does not ensure the actual determination as the optimal conditions, as a result of ignoring the interactions between variables. The limitations of the optimization using the method of one-factor-at-a-time can be solved using statistical methods such as the response surface methodology (RSM), which has been widely used for this purpose, amongst others [8].

The sequence of statistical designs employed in this study respond to several considerations; a Box-Behnken analysis as RSM design allowed including numeric and/or categorical factors, the numeric factors varies over three levels represented as -1, 0, and +1, this design generates fewer runs than three-level factorial (which mean a time reduction) [9]. Following a general factorial design was used considering that as a simple factorial design allows analyzing from 1 to 12 factors where each factor may have different numbers of levels and a D-optimal is a flexible structure design to analyze categorical factors influence and the number of runs are determined by a selection criterion chosen during the build resulting in a reduce design [10].

The aim of this study was to evaluate the effect of culture conditions (shaking speed, inoculum size, and culture medium volume), additives (gel-shape and composition), basic culture medium (BHI, Brucella, and Mueller-Hinton) and supplements type and concentration (Lamb-Blood, Bovine fetal serum, Laked horse-blood, DENT, Preston, IsoVitaleX, and Vitox) in the production of *H. pylori* cells (liquid culture), through a sequential statistical analysis, considering that an increase in the concentration of this microorganism in liquid culture will be very useful for clinical research and molecular epidemiology studies.

Materials and Methods

Strain

Helicobacter pylori NCTC 11637 was used in all the experimental assays aimed to improve the culture media composition and conditions for liquid culture of

the microorganism [11,12]. The strain previously stored at -70 ± 2.0 °C in 28 g/L of BD supplemented with 20% (v/v) of glycerol (Sigma, St Louis, USA) was grown on modified Wilkins-Chalgren agar (BD) and incubated at 37 ± 1.0 °C under microaerobic conditions (10% (v/v) CO₂) during 96 hours. Brucella broth colony suspensions were used to inoculate liquid cultures.

Mini-Bioreactors and General Experiment Conditions and Monitoring

All the experiments were carried out at 37 ± 1 °C during 24 hours. Experiments were designed with the help of Design-Expert 8.0.0 (2009) software. The experiments were carried out in 100 mL shake flasks under microaerobic conditions (10% (v/v) CO₂) in a mini-bioreactor designed to increase the "CO₂ transfer coefficient", through CO₂ direct bubbling into the liquid culture medium (Fig. 1). After 12 and 24 hours of culture the optical densities at 600 nm (OD_{600nm}) were measured in a spectrophotometer (Thermo Scientific Evolution 100 Uv-V) [13]. The approximate

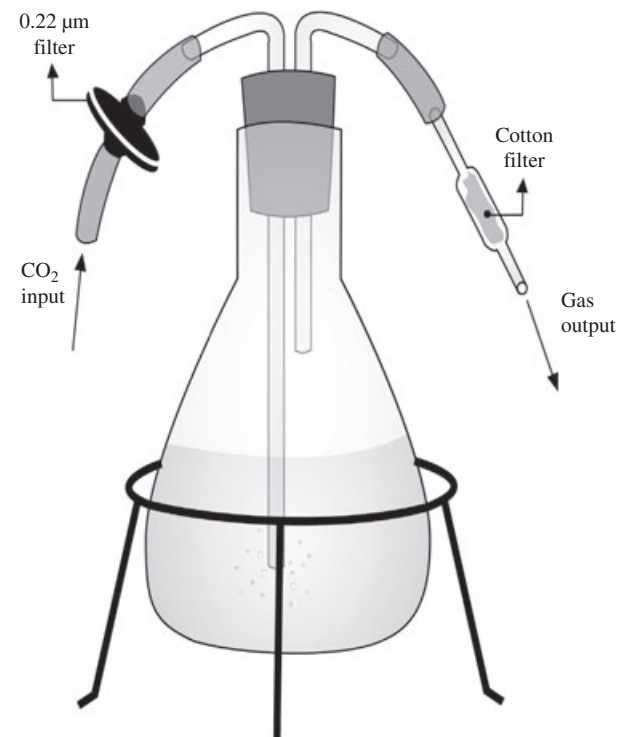


Figure 1 System designed (mini-bioreactor) for shake-flask liquid culture of *Helicobacter pylori*. The gas (10% CO₂) flow is bubbled directly into the culture medium with the main objective of increasing the cell access to the gas, what we call the CO₂ transfer coefficient, trying to simulate an aerobic liquid culture when the air is bubbled directly into the liquid mass.

concentration (cells per mL) was calculated by transforming the OD_{600nm} values through a McFarland (Remel, Lenexa, USA) calibration curve, described by the following equation:

$$y = 5 \times 10^{-10}X + 0.0377 \quad R^2 = 0.9875 \quad (1)m1$$

Starting from the cell concentrations (cells per mL) obtained after 0, 12, and 24 hours of culture, it was possible to calculate the data of the dependent variable, as follows:

$$\log_{10}\left(\frac{X}{X_0}\right) \quad (2)m2$$

Where: X is the concentration (cells per mL) at different times of culture and X_0 is the concentration (cells per mL) at the beginning of the culture [14].

All the inoculums and cultures of 12 and 24 hours of each assay were tested for Gram phenotype, urease, catalase, oxidase, and growth on modified Wilkins-Chalgren agar (BD).

Sequential Statistical Designs

Selection of significant culture conditions through a Box-Behnken design.

The culture medium (28 g/L BD, supplemented with 7% (v/v) Bovine fetal serum (Gibco, Brazil), 1% (v/v) IsoVitaleX (BD), 0.4% (v/v) DENT (Oxoid)) was assessed for three factors (culture conditions): shaking speed (X_1), inoculum size (X_2), and culture medium volume (X_3), at three different levels each (Table 1).

Selection of different gel shape and composition through a General Factorial Design.

A general factorial design, with three level of only one categorical factor was carried out to select the utility of gel addition into the culture medium to decrease the

superficial tension and to improve the biomass production of *H. pylori* [15] (Table 2). Culture medium employed was the same previously described for Box-Behnken design and the conditions were those selected from the Box-Behnken's results analysis (shaking speed (X_1), inoculum size (X_2) and culture medium volume (X_3)).

Selection of significant variables through a D-optimal reduce design.

For the selection of the significant categorical variables for biomass production improvement of *H. pylori*, three basic media (Z_1), (BHI (Scharlau, Barcelona, Spain), Brucella (BD) and Mueller-Hinton (BD)), three types of blood derivates (Z_2) (Lamb-Blood, Bovine fetal serum (Oxoid) and Laked horse-blood (Oxoid)), two mixtures of antibiotics (Z_3), (DENT (Oxoid), Preston (Oxoid), none) and a two mixtures of vitamins (Z_4) (IsoVitaleX (BD), Vitox (Oxoid) and no vitamin addition) were assessed with a D-optimal reduced design. The reduction of the design resulted from the analysis of the main effect of factors.

The experimental design with the name, code, and level of the variables is shown in Table 3. Conditions for culture were those selected from previous Box-Behnken and general factorial designs, respectively.

Selection of significant concentrations through a Box-Behnken design.

Taking into account the results of previous designs, where the significant levels of variables X_1 , X_2 , X_3 and level selection of categorical variables Y_1 , Z_1 , Z_2 , Z_3 and Z_4 were selected, a second design, Box-Behnken type was used to study the numeric levels of variables selected before (Z_1 , Z_2 , Z_3 and Z_4). To avoid confusions with variable codes, the Z variables were renamed D variables.

Table 1 Box-Behnken experimental design

| Factor | Factor code | Basic level | Interval variation | Factor values | Coded value |
|------------------------------|-------------|-------------|--------------------|---------------|-------------|
| Shaking speed (rpm) | X_1 | 92 | 50 | 42 | -1 |
| | | | | 92 | 0 |
| | | | | 142 | +1 |
| Inoculum size (% v/v) | X_2 | 10 | 5 | 5 | -1 |
| | | | | 10 | 0 |
| | | | | 15 | +1 |
| Volume of culture media (mL) | X_3 | 50 | 37-38 | 33 | -1 |
| | | | | 50 | 0 |
| | | | | 83 | +1 |

Table 2 General factorial design

| Factor | Factor code | Factor values | Coded value | Ref. |
|--------|-------------|---|-------------|------|
| Gel | Y_1 | Agar-agar blocks (Scharlau) (8 × 1 cm ² , 0.8% w/v) | A_1 | [15] |
| | | Blood agarose blocks LMP (Promega, Madison, USA) (8 U of ~1 cm ² , 1.5% w/v) | A_2 | |
| | | Calcium alginate beads (Sigma, St Louis, USA) (40 U of ~3 mm ³ , 0.8% w/v) | A_3 | |

Table 3 D-optimal experimental design

| Factor | Factor code | Factor levels or values | Coded value |
|-----------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| Base medium | Z ₁ | BHI | 1 |
| | | Brucella | 0 |
| | | Mueller-Hinton | -1 |
| Blood or Derivative | Z ₂ | Lamb-Blood (7% v/v) | 1 |
| | | Bovine fetal serum (7% v/v) | 0 |
| | | Laked Horse Blood (7% v/v) | -1 |
| Antimicrobial mixture | Z ₃ | DENT (0.4% v/v) | 1 |
| | | Preston (0.4% v/v) | 0 |
| | | Without antibiotic | -1 |
| Vitamin mixture | Z ₄ | IsoVitalex (1% v/v) | 1 |
| | | Vitox (1% v/v) | 0 |
| | | Without vitamin | -1 |

Results

Box-Behnken Design Results

The experiment consisting of four factorial points, six star points configuration, and six center points and two dependent variables ($\log_{10}(X/X_0)$ cells per mL at 12 and 24 hours of culture) reported a quadratic model and a linear model for 12 and 24 hours of culture respectively; the RSM data analysis to obtain the quadratic model for the best response at 12 hours of culture is shown in Table 4, among other results of different designs employed.

Table 4 shows that the model is significant at 12 hours and the Pred. R^2 of 0.7971 is in reasonable agreement with the Adj. R^2 of 0.7453. In this experiment, the lag phase was more evident until 12 hours in

some of the interactions studied, and significant interactions were identified in some combinations at which no decrease of cell concentration at 12 hours of culture occurred (data not shown).

The predicted values compared to the model results are shown in Table 5. The quadratic model explained the mathematical relationship between the independent variable and the dependent responses. The mathematical expression of the relationship between the *H. pylori* cell production with variables like shaking speed, inoculum percentage, and culture medium volume at 12 hours of liquid culture is shown below in terms of coded factors. The significance of the different factors is represented in the following equation:

$$\begin{aligned} \log_{10}(X/X_0) \text{ cells per mL}(12 \text{ h}) &= -2.39100 + 0.024360X_1 + 0.19683X_2 + 0.038401X_3 \\ &\quad - 1.21683 \times 10^{-4}X_1^2 + 0.013132X_2^2 + 4.81268 \\ &\quad \times 10^{-4}X_3^2 - 5.05685 \times 10^{-4}X_1X_2 - 2.44250 \times 10^{-4}X_1X_3 \\ &\quad - 7.74136 \times 10^{-3}X_2X_3 \end{aligned} \quad (3)m3$$

The results of the ANOVA (Table 4) indicate that the predictability of the model is at a 90% confidence interval. A coefficient of determination (R^2) value of 0.9090 showed a reliable equation. A p value of .0368 indicates that the model is statistically significant. The model is suitable for predicting within the range of chosen variables (Fig. 2).

After 35 optimization cycles navigating through the design surface, the following combination was selected based on the mini-bioreactor and shaker capacity and functionality: X_1 (60 rpm), X_2 (5.6% v/v), and X_3 (76.2 mL). A desirability of 1 was indicated on the

Table 4 ANOVA of sequential statistical improvement of *Helicobacter pylori* liquid culture

| Design | Time of culture (hours) | Adjusted model | SS | df | MS | F value | Prob (p) > F | R^2 | Adjusted R^2 | Predicted R^2 | PRESS | Adequate precision |
|-------------------|-------------------------|-------------------|-------|----|-----------------------|---------|--------------|--------|----------------|-----------------|-------|--------------------|
| Box-Behnken | 12 | Quadratic | 5.610 | 9 | 0.620 | 5.550 | .0368 | 0.9090 | 0.7453 | 0.7971 | 1.250 | 9.859 |
| | 24 | Quadratic | 0.060 | 1 | 0.060 | 0.490 | .5211 | 0.1494 | -0.0826 | -0.8092 | 2.690 | 3.085 |
| General Factorial | 12 | Linear | 0.150 | 2 | 0.075 | 2.880 | .1327 | 0.4899 | 0.3199 | -0.1476 | 0.350 | 3.394 |
| | 24 | Linear | 0.120 | 2 | 0.060 | 5.310 | .0470 | 0.6392 | 0.5189 | 0.1881 | 0.150 | 4.549 |
| D-optimal reduce | 12 | Main | 3.050 | 2 | 1.530 | 21.170 | .0019 | 0.8759 | 0.8345 | 0.7208 | 0.970 | 8.837 |
| | 24 | Main | 3.740 | 2 | 1.870 | 37.320 | .0004 | 0.9256 | 0.9008 | 0.8326 | 0.680 | 11.583 |
| Box-Behnken | 12 | Reduced cubic | 0.160 | 7 | 0.023 | 7.350 | .0040 | 0.8511 | 0.7354 | 0.3526 | 0.120 | 9.853 |
| | 24 | Reduced quadratic | 0.031 | 4 | 7.71×10^{-3} | 3.590 | .0380 | 0.5446 | 0.3929 | 0.0272 | 0.055 | 5.967 |

SS, sum of squares; df, degrees of freedom; MS, mean square; PRESS, predicted residual sum of squares; F value, test for comparing the variance associated with that term with the residual variance; it is the mean square for the term divided by the mean square for the residual; Prob (p) > F: the probability value associated with the F value for the term; it is the probability of getting an F value of this size if the term did not have an effect on the response. Digits in bold, means that models are significant.

Table 5 The Box-Behnken design results of the second-order RSM fitting in the form of ANOVA for the independent variables on *Helicobacter pylori* liquid culture in actual and predicted values at 12 hours of culture

| Flask no. | Type of point | Shaking speed (rpm) X_1 | Inoculum (% v/v) X_2 | Culture medium (mL) X_3 | Log (X/X_0) Cells per mL | |
|-----------|---------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------|
| | | | | | Actual (12 hours) | Predicted (12 hours) |
| 1 | Fact | 142.0 (+1) | 15.0 (+1) | 33.0 (-1) | 0.35 | 0.34 |
| 2 | Fact | 142.0 (+1) | 5.0 (-1) | 83.0 (+1) | 0.07 | 0.063 |
| 3 | Fact | 42.0 (-1) | 15.0 (+1) | 83.0 (+1) | 0.11 | 0.10 |
| 4 | Fact | 42.0 (-1) | 5.0 (-1) | 33.0 (-1) | -0.11 | -0.12 |
| 5 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -0.38 | -0.23 |
| 6 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -0.26 | -0.23 |
| 7 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -0.07 | -0.23 |
| 8 | Axial | 21.29 (-2) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | 0.21 | 0.22 |
| 9 | Axial | 162.71 (+2) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -2.23 | -2.22 |
| 10 | Axial | 92.0 (0) | 2.93 (-2) | 58.0 (0) | 0.51 | 0.52 |
| 11 | Axial | 92.0 (0) | 17.07 (+2) | 58.0 (0) | 0.00 | 7.2×10^{-3} |
| 12 | Axial | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 22.64 (-2) | 0.40 | 0.41 |
| 13 | Axial | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 93.36 (+2) | 0.00 | 7.2×10^{-3} |
| 14 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -0.35 | -0.39 |
| 15 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | 0.11 | -0.39 |
| 16 | Center | 92.0 (0) | 10.0 (0) | 58.0 (0) | -0.90 | -0.39 |

Negative values resulted from Eqn 2 as evidence of the lag phase of growth and means that the specific cell growth rate (μ_x) is lower than the specific cell death rate (μ_d), ($\mu_x < \mu_d$), which is a normal behavior of many microorganism depending of several facts as cell adaptability to the culture media, cultivation conditions, and inoculum concentration between others [23].

software and a prediction of 1.27819 log (X/X_0) cells per mL. These conditions were set for the general factorial design.

General Factorial Design Results

The model was significant only at 24 hours (Table 6). Therefore, the Pred. R^2 of 0.1881 is not as close to the Adj. R^2 of 0.5189 as one could normally expect. This may indicate a large block effect or a possible problem with the model and/or data. However the F -value of 5.31 implies that the model is significant in relation to the noise (Table 6). The Adeq. Precision of 4.549 > 4.0 indicates an adequate signal; by this reason, the model could be used to navigate the design space.

In this analysis, the cells per mL adhered to the different gel shapes assessed were not included because of the necessity of having free viable cells.

The addition of blood agarose blocks allowed the increase of the *H. pylori* cell concentration from 8.0 up to 8.4 log₁₀ cells per mL, compared to the addition of agar blocks that allowed an increase to 8.2 log₁₀ of cells per mL which is not quite different. At this point, the addition of blood agarose blocks was set for the rest of the experiments.

Figure 3 and Table 4 shows the main effect of the different levels of factor Y_1 and the significance of the model, respectively.

D-Optimal Reduce Design

Significant effect was detected for Z_2 at both 12 and 24 hours of culture (Table 4). Taking into account that the variables of the design were categorical, no optimization graphic was obtained but the effect of Z_2 levels can be seen in Fig. 4.

At this point the best result was obtained with the following culture media and conditions: BHI, blood agarose (1.5% w/v), Lamb blood, DENT, and Vitox at 60 rpm, 37 °C, with filtered CO₂ (5% v/v) bubbled directly into the culture media in a final volume of 76.2 mL and inoculated with a 5.6% v/v of inoculums at $\sim 61 \times 10^6$ cells per mL.

Box-Behnken Design

This model was more significant for 12 hours of culture (Table 4) and Fig. 5 shows the model results at 12 hours and the prediction. The results obtained with the D-optimal reduce allowed us to propose the levels of the factors for the last Box-Behnken design

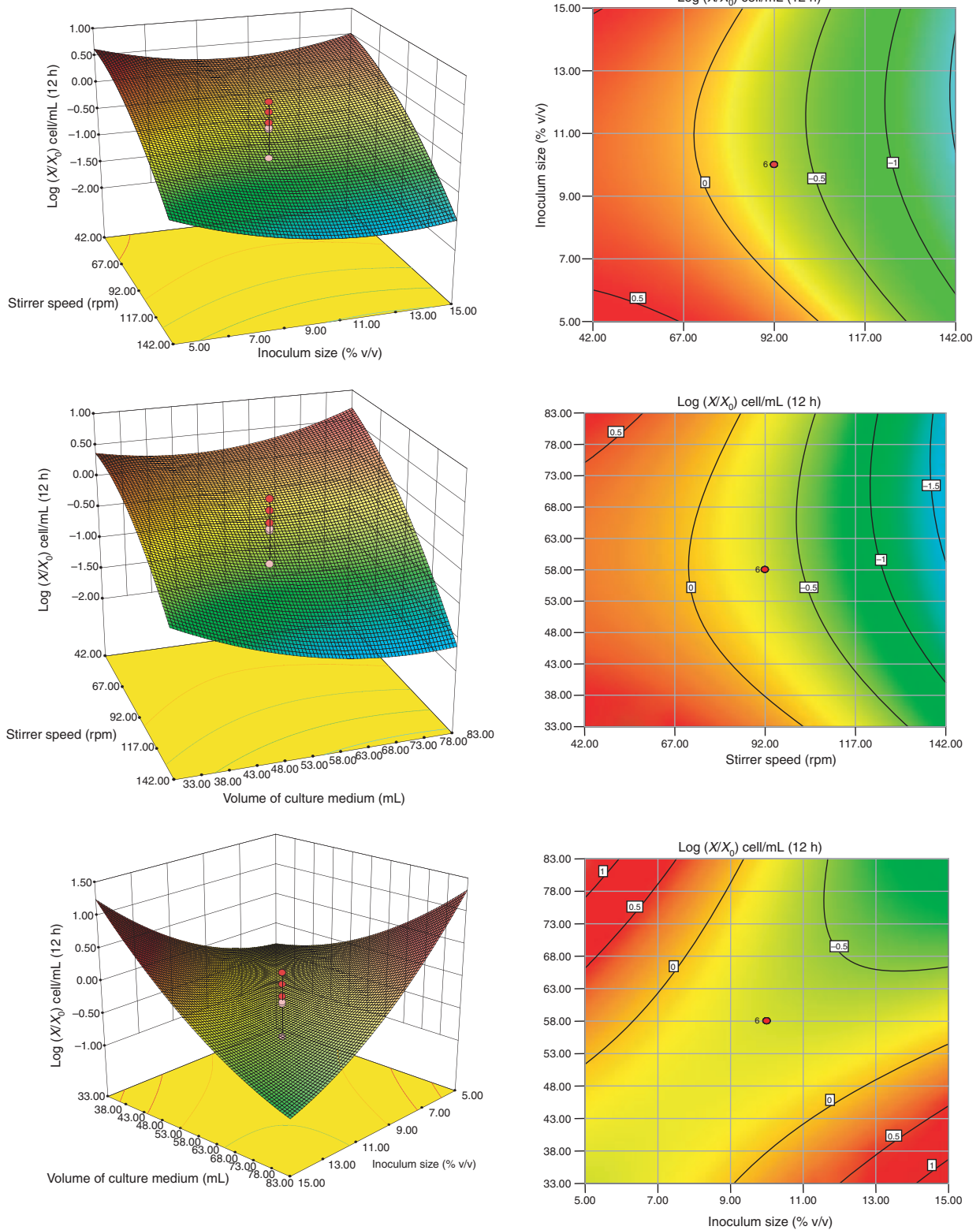


Figure 2 Response surface methodology (RSM) with Box-Behnken design. Main factors effect over $\log_{10} (X/X_0)$ cells per mL (*Helicobacter pylori*), at 12 hours of liquid culture. Top surface and contour graphics: X_1 versus X_2 (X_3 maintained at 58 mL (0)), middle surface and contour graphics: X_1 versus X_3 (X_2 maintained at 10%v/v (0)) and bottom surface and contour graphics: X_2 versus X_3 (X_1 maintained at 92 rpm (0)).

Table 6 Second Box-Behnken experimental design

| Factor | Factor code | Factor values (% v/v) | Coded value |
|------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Lamb-blood | D_1 | 3 | -1 |
| | | 5 | 0 |
| | | 7 ^a | +1 |
| DENT | D_2 | 0.1 | -1 |
| | | 0.25 | 0 |
| | | 0.4 ^a | +1 |
| Vitox | D_3 | 0.5 | -1 |
| | | 1.25 | 0 |
| | | 2 | +1 |

^aNumeric levels assessed with the D-optimal reduce design. The Vitox level assessed before was 1% v/v but this level was not included in this design.

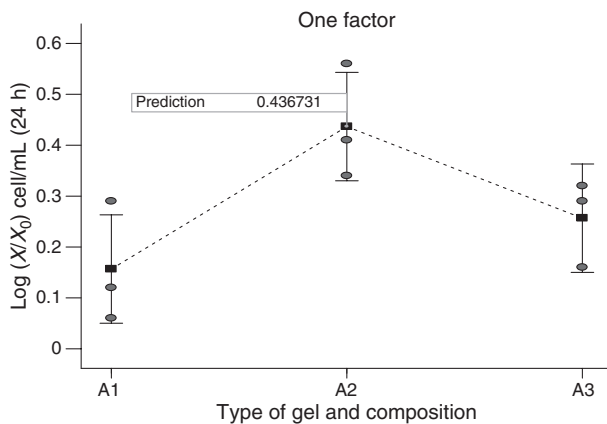


Figure 3 General factorial design. Main effect of factor's levels Y_1 (A_1 , A_2 , A_3) on the $\log_{10} (X/X_0)$ cells per mL at 24 hours of liquid culture.

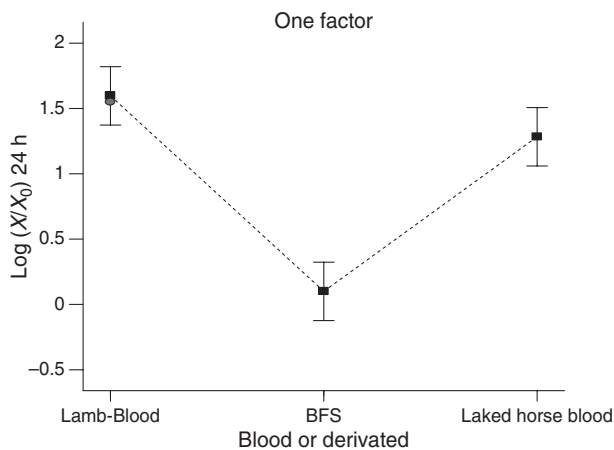


Figure 4 D-optimal reduce design. Effect of factor level on the response of $\log_{10} (X/X_0)$ at 24 hours of *Helicobacter pylori* liquid culture. Z_1 = BHI, Z_2 = Lamb Blood, Z_3 = DENT, and Z_4 = Vitox.

(Table 6). The increase of cells per mL was around 2 logarithmic units by the end of the sequential statistical approach (Table 7).

On the other side, all of the inoculums as well as the samples taken from 0, 12, and 24 hours of culture resulted positive as expected for urease, catalase and oxidase, and the typical morphology was observed after Gram staining. It is very important to highlight that the cultivation in agar after liquid culture was positive for all cases.

As previously mentioned, all the cultures were tested for Gram phenotype, urease, catalase, oxidase and growth on modified Wilkins-Chalgren agar (BD), resulting as expected (data not shown).

Discussion

A general consideration of the results of the ANOVA for the different experimental designs is that the values of $p > F$ less than .0500 indicate that the model is significant, in terms of Adeq. Precision, values >4.0 measure the signal corresponding to the noise ratio and indicates that the model can be used to navigate in the design space.

Box-Behnken Design Analysis

Box-Behnken is a fractional factorial design obtained by combining two-level factorial designs with incomplete block designs, and the RSM is used to analyze data from experimental designs to correlate the effect of independent variables in a second-order model [16].

The main objective of this experiment was far more than a simple assessment of the shaking speed, inoculum size, and effective working volume. Among these factors there is a close relationship that must be micro-biologically understood. The shaking speed and the effective working volume regulate the “volumetric mass transfer coefficient,” (in this case $K_L a$ for CO_2) in the liquid medium and ensures the culture homogeneity and access to nutrients by microorganisms [14].

The inoculum size and its relationship with the actual effective working volume influence the adaptation of microorganisms to fresh medium, affecting the duration of the lag phase, an aspect that is critical for the recovery of high concentrations of final biomass [14,17].

In this experiment, the estimated response seems to have a functional relationship only in a local region or near the central points of the model. In this sense, the quadratic model was used to explain the mathematical relationship between independent and dependent variables on responses at 12 hours of cell culture (Eqn 3).

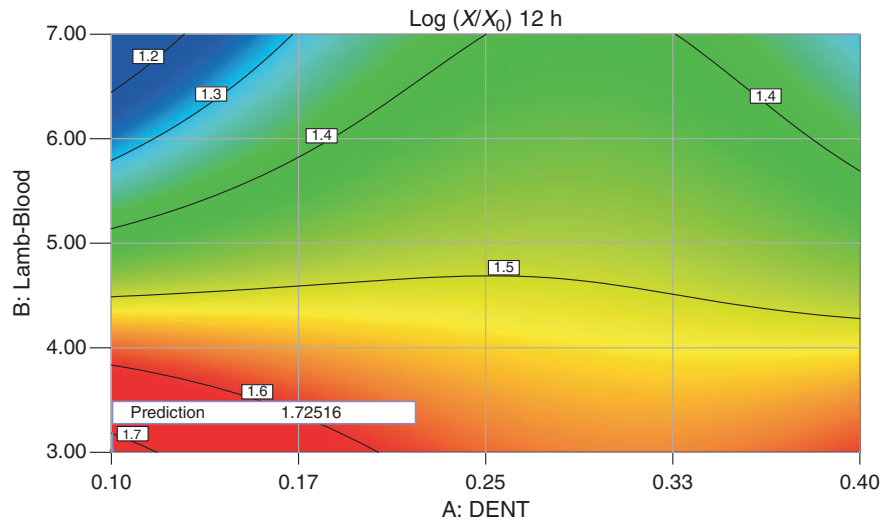


Figure 5 Box-Behnken design. Results of the final Box-Behnken design. The contour graphic represents a prediction of 1.72516 log₁₀ (X/X₀) cells per mL at 12 hours of liquid culture of *Helicobacter pylori*. The prediction is fulfilled with the following factor levels: D₁ (Lamb-blood) 3.18% v/v, D₂ (DENT) 0.11% v/v, and D₃ (Vitox) 0.52% v/v.

Table 7 Maximum cells per mL obtained with the sequential experimental designs

| Experimental design | Initial cells per mL ± SD | Maximum cells per mL obtained (time of culture) | Model predictions | |
|---------------------|---|---|----------------------|--|
| | | | Initial cells per mL | Final cells per mL (time of culture) |
| Box-Behnken | ~11 × 10 ^{7a} | 40 × 10 ⁷ (12 hours) | 61 × 10 ⁶ | 12 × 10 ⁸ (12 hours) |
| General factorial | 71 × 10 ⁶ ± 22 × 10 ⁵ | 26 × 10 ⁷ (24 hours) | 71 × 10 ⁶ | 19 × 10 ⁷ (24 hours) |
| D-optimal reduce | 61 × 10 ⁶ ± 63 × 10 ⁴ | 27 × 10 ⁸ (24 hours) | 61 × 10 ⁶ | 24 × 10 ⁸ (24 hours) |
| Box-Behnken | 61 × 10 ⁶ ± 52 × 10 ⁴ | 25 × 10 ⁸ (12 hours) | 61 × 10 ⁶ | 32 × 10 ⁸ (12 hours) ^b |

^aIn this experiment, several inoculum sizes were assessed and therefore no standard deviation (SD) is shown.

^bIt has to be tested by decreasing the factor levels to D₁ (Lamb-blood) 3.18% v/v, D₂ (DENT) 0.11% v/v, and D₃ (Vitox) 0.52% v/v.

Figure 2 shows the log₁₀ (X/X₀) at 12 hours of culture, when each of the levels of factors was studied, the 3D response surface and 2D contour plot represent the regression. The main objective of the response surface is an efficient hunting, detection or grouping of the optimal values of the variables so as to maximize the response. Each 3D curve represents an infinite number of combinations of two test factors, while other factors are kept at their zero levels. In this sense, the elliptical shape is obtained only when there is a perfect interaction between the independent variables [18].

In our case, the contours are not quite elliptical, suggesting that probably a wider range of levels of each factor should be tested for increasing the navigation space model, but taking into account the capacity of the mini-bioreactor, the possibilities of the orbital shaker, the levels of the factors and the limitations of our

laboratory, the surface model navigation was not extended. The optimization criteria using the Design-Expert 8.0.0 (2009) software were set as follows: the goal values of the independent variables (X₁, X₂ and X₃) were set in the form of a range of values, whereas the goal value of the dependent variable (log (X/X₀) cells per mL at 12 hours) was set as a maximum value; all of them with an importance of 3.

General Factorial Design Analysis

The addition of blood agarose (LMP) blocks (1.5% w/v) to the culture media for *H. pylori* was previously described by Kitsoss and Stadtländer (1998). The main objective of this design was to favour the *H. pylori* growth by decreasing the surface tension as previously reported [15]. This design varied significantly (data not

shown) when the adhered cells [15] were summed to the planktonic cells at both 12 and 24 hours of culture, but we considered the convenience of having planktonic cells because of the ease to transfer them to agar plates. This is why we selected the factor A₂ as the most influential factor for the next experiments.

D-Optimal Reduce Design Analysis

The main objective of this experimental design was to select the easiest-to-find additives in the local market. Reynolds and Penn reported that all *H. pylori* strains included in their study had an absolute requirement of leucine, valine, methionine, arginine, histidine, and phenylalanine for its growth, but other strains also required alanine or serine [19,20], while the growth was not limited by the absence of aspartic acid, glutamic acid, glycine, lysine, threonine, tryptophan, or tyrosine [19]. This amino acids requirements were detected too by Schilling et al. [21] when developed the in silico metabolic model for *H. pylori* 26695.

The difference between the IsoVitaleX and Vitox mixtures is that the latter contains the co-enzyme co-carboxylase (thiamine 100 mg/L) to activate the Krebs cycle, while their amino acid and vitamin compositions are similar. The growth of *H. pylori* strain NCTC 11637 is not inhibited, as it could be the case with other strains, in the absence of tyrosine, aspartic acid, threonine, lysine, serine, glycine, cysteine, cystine, tryptophan or glutamic acid, but it is inhibited in the absence of methionine, cysteine-cystine, arginine, proline or histidine [19,20].

The absence of Vitox (data not shown) favored the model response, but taking into account that different *H. pylori* strains would be cultivated with the resulting culture media and conditions selected from this study, we preferred to build the next experimental design changing the Vitox concentration, considering that all the *H. pylori* strains do not respond in the same way in the presence of amino acids [19], and that our laboratory aims are directed to the biopsy cultures that probably carry behavior-unknown strains.

Box-Behnken Experimental Design Analysis

The final design of this work was directed to assess different additive concentrations to minimize the use of additives and to maximize the cells per mL of *H. pylori* in liquid culture. Several criteria for numeric level decision of the different factors were considered. Regarding lamb blood, we considered that an increased concentration could favor the risk of contamination and turbidity interference in the spectrophotometer

measurements, therefore the previous assessed level (7% v/v) was set as (+1) and two lower levels were assessed (5 as 0 and 3 as -1) (Table 6).

In the case of DENT, we considered that being an expensive antimicrobial mixture and that probably higher concentrations could be risky for *H. pylori* in spite of its natural resistance to these components, we decided to set the previous assessed level (0.4% v/v) as (+1) and to assay two lower levels set as 0 (0.25) and -1 (0.1) (Table 6).

Vitox is a vitamin and amino acid mixture, which acts as a nutrient source for the microorganism; the criterion to decide the levels in this experiment was influenced by the advantage for the cell of having free amino acids [19–22]. For this reason, the previous level assessed was not included (Table 6).

Several authors have improved a liquid culture for *H. pylori* using similar or modified medium components, but employing different methodologies, and we are not aware of any report using CO₂ (5% v/v) bubbled directly into the culture medium.

Some authors have reported final concentrations of cells of around 1×10^9 cells per mL (9 log₁₀ cells per mL) after ~50 hours of post-inoculation (3 logs of growth, 1 logarithmic unit higher, and 38 hours longer than in this work) [19]. Nedenskov reported $\sim 13 \times 10^6$ cells per mL (7 log₁₀ cells per mL) after 120 hours of culture (2 logarithmic unit lower and 108 hours longer than in this work) [20]. On the other side, Kitsos et al., reported 1×10^{10} cells per mL (10 log₁₀ cells per mL) at 48 hours of culture (5 logs of growth, 2 logarithmic units higher, and 12 hours longer than in this work) [15].

Testerman et al., reported 6×10^7 cells per mL (8 log₁₀ cells per mL) after 72 hours of culture (4 logs of growth, 1 logarithmic unit lower, and 60 hours longer than in this work) [23]. Bury-Moné et al., reported 50×10^6 cells per mL (8 log₁₀ cells per mL) after 24 hours of culture (1 logarithmic unit lower and 12 hours longer than in this work) [24]. Other work of Testerman et al., report around 52×10^7 cells per mL (8 log₁₀ cells per mL) after 18–30 hours of incubation (1 logarithmic unit lower and between 6 and 18 hours longer than in this work) [22].

All these studies has been based the liquid culture improvement on the composition of culture media and component concentration; developing expensive and complex culture media, but ignoring the effect of CO₂ supply into the media and the O₂ removal.

Table 7 shows the progressive increase in cells per mL of *H. pylori* through the sequential statistical improvement showing 25×10^8 cells per mL at 12 hours of culture (9.4 log₁₀ cells per mL), which is

the nearest value to the predicted 32×10^8 cells per mL at 12 hours (9.5 log₁₀ cells per mL). It is important to remark that the maximum concentration of *H. pylori* in liquid culture (under the previous conditions of our laboratory) obtained for this strain was around 10^3 cells per mL after 3 or 4 days of culture and besides not all the cultures resulted viable in agar-plate growth conditions.

Using a typical aerobic mini-bioreactor, but supplying CO₂ instead of air and by using the sequential statistical approach it was possible to improve the cells per mL of *H. pylori* in liquid culture, minimizing the concentration of easiest-to-find additives. Surely some of previous culture media improved by other author will offer best results considering our mini-bioreactor design. The statistical prediction of 32×10^8 cells per mL at 12 hours has to be tested and fulfilled under the following culture conditions: BHI, blood agarose (1.5% w/v), lamb blood (3.18% v/v), DENT (0.11% v/v), and Vitox (0.52% v/v), at 60 rpm and 37 °C with filtered CO₂ (5% v/v) bubbled directly into the culture medium in a final volume of 76.2 mL and inoculated with 5.6% v/v of inoculum at $\sim 61 \times 10^6$ cells per mL.

Acknowledgements and Disclosures

This work was supported by COLCIENCIAS (Colombia), grant 120340820464. We also thank Dr. Ivonne Gutiérrez for the critical reading of the manuscript. Competing interests: the authors declare that they have no competing interests related with the results of the manuscript.

References

- Bai Y, Zhang YL, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY. Cloning and expression and immunogenicity of *Helicobacter pylori* BabA₂ gene. *World J Gastroenterol* 2004;10:2560–2.
- Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:83–8.
- Miehlke S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N, Morgner A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori vacA*, *iceA*, and *cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1008–13.
- Arévalo A, Trespalacios AA, Otero W. Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 2009;24:388–95.
- Ko JS, Seo JK. *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* in Korean Children. *Helicobacter* 2002;7:232–6.
- Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:449–90.
- Shibayama K, Nagasawa M, Ando T, Minami M, Wachino J-i, Suzuki S, et al. Usefulness of adult bovine serum for *Helicobacter pylori* culture media. *J Clin Microbiol* 2006;44:4255–7.
- Choudhari S, Singhal R. Media optimization for the production of β-carotene by *Blakeslea trispora*: a statistical approach. *Biores Technol* 2008;99:722–30.
- Acero-Ortega C, Dorantes L, Hernández-Sánchez H, Tapia MS, Gutiérrez-López G, Alzamora S, et al. Response surface analysis of the effects of Capsicum extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J Food Eng* 2005;67:247–52.
- Sethuraman VS, Raghavarao D, Sinha BK. Optimal *sn* factorial designs when observations within-blocks are correlated. *CSDA* 2006;50:2855–62.
- Marshall BJ, Goodwin CS. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:68.
- Yokota S, Amano K, Hayashi S, Fujii N. Low antigenicity of the polysaccharide region of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides derived from tumors of patients with gastric cancer. *Infect Immun* 1997;65:3509–12.
- Wang J, Wan W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. *Int J Hyd Ener* 2009;34:235–44.
- Doran PM. *Principios De Ingeniería De Los Bioprocesos*. Zaragoza, España: Acribia S. A., 1998.
- Kitsos CM, Stadtländer CTK-H. *Helicobacter pylori* in liquid culture: evaluation of growth rates and ultrastructure. *Curr Microbiol* 1998;37:88–93.
- Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Biores Technol* 2008;99:5602–9.
- Xia HX, English L, Keane CT, O'Morain CA. Enhanced cultivation of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Pathol* 1993;46:750–3.
- Tanyildizi MS, Özer D, Elibol M. Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochem* 2005;40:2291–6.
- Reynolds DJ, Penn CW. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology* 1994;140:2649–56.
- Nedenskov P. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3450–3.
- Schilling CH, Covert MW, Famili I, Church GM, Edwards JS, Palsson BO. Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695. *J Bacteriol* 2002;184:4582–93.
- Testerman TL, Conn PB, Mobley HLT, McGee DJ. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *J Clin Microbiol* 2006;44:1650–8.
- Testerman TL, McGee DJ, Mobley HLT. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol* 2001;39:3842–50.
- Bury-Moné S, Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, Thibonnier M, De Reuse H, et al. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter* 2006;11:296–303.

Detección de resistencia a claritromicina y levofloxacinina por ASP-PCR

Introducción

El trabajo descrito en los capítulos anteriores nos ha revelado que la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos esta presente en los aislamientos colombianos y como se observa en levofloxacina es un problema que se ha venido incrementando con el tiempo. El cultivo y las pruebas de susceptibilidad no se hacen rutinariamente en Colombia, por lo tanto los clínicos no tienen ninguna herramienta para seleccionar con buen criterio el mejor tratamiento para sus pacientes.

En el capítulo anterior se demostró que el principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina es por causa de mutaciones puntuales en los genes 23S rRNA y en la región QRDR de *gyrA*. Este conocimiento nos permite proponer la implementación de dos pruebas alelo específicas para la detección de estas mutaciones. En este capítulo se presentan dos manuscritos, uno de ellos con los resultados de la prueba para detección de mutaciones en el gen 23S rRNA relacionadas con resistencia a claritromicina y mutaciones en el gen *gyrA* relacionados con resistencia a levofloxacina. En el segundo manuscrito, la prueba alelo específica se estandariza en biopsias utilizadas para la prueba rápida de ureasa. En este estudio se determinó la estabilidad de las mutaciones cuando las biopsias son dejadas a temperatura ambiente durante 30 días. Los resultados indican que es posible utilizar estas muestras para fines de diagnóstico molecular incluso aunque no se mantenga una cadena de refrigeración para el transporte y conservación de las biopsias. Los resultados de esta alternativa para el diagnóstico molecular de resistencia a

claritromicina fueron sometidos al Journal of Digestive Diseases y aceptado para publicación.

Allele-Specific PCR assay for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens from Colombia including identification of a new *gyrA* mutation.

Alba A. Trespalacios¹, Emiko Rimbara^{2,3}, William. Otero⁴, Marcela M. Mercado¹, Jorge E. Caminos⁵, Rita Reddy^{2,3}, David Y. Graham^{2,3}.

¹Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C, Colombia

²Department of Medicine, Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center Houston, TX, United States

³Baylor College of Medicine, Houston, TX, United States

⁴Gastroenterology Unit Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

⁵Biochemistry Unit, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

Corresponding author. Present address: Alba A. Trespalacios, Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 N° 43-82. Bogotá – Colombia. Tel: 571 +3208320 ext 4155.

E-mail: alba.trespalacios@javeriana.edu.co

Objective: The aim of this study was to use Allele-Specific PCR (ASP-PCR) to detect mutations predictive of clarithromycin and fluoroquinolone resistance in DNA from gastric mucosal biopsies samples from Colombian patients infected with *H. pylori*.

Methods: Antimicrobial susceptibility to clarithromycin and levofloxacin in clinical *H. pylori* isolates were tested by agar dilution. DNA was extracted from gastric tissue biopsies from Colombian patients, and regions involved in clarithromycin (23S rRNA gene) and fluoroquinolone (*gyrA* gene) resistance were amplified by PCR and DNA sequencing. ASP-PCR described previously to determine 23S rRNA and *gyrA* mutation of *H. pylori* were modified and performed using DNA extracted from gastric biopsies. A new primer was designed to identify mutation related with the N87I mutation in the GyrA protein. The concordance, sensitivity and specificity was evaluated by comparing the results of agar dilution (phenotypic test) and sequence of 23S rRNA and *gyrA* genes from isolates of *H. pylori* with each ASP-PCR.

Results: Agar dilution showed 55 clarithromycin-susceptible *H. pylori* strains and 5 with resistant strains; 54 patients infected with levofloxacin-susceptible strains and 6 with resistant strains. Analysis of the 23S rRNA sequence detected 4 strains with an A2143G mutation and 1 strain with A2142G mutation; the sequences of the remaining 55 strains were wild-type. Analysis in the quinolone resistant determination region (QRDR) of *gyrA* gene showed 54 sequences with wild-type genotype compatible with their susceptible phenotype. Substitutions in the amino acid sequence of QRDR of GyrA were observed in the 6 levofloxacin resistant strains. Three had N87I mutations, 2 D91G mutations and 1

D91N mutation. Using agar dilution as the “gold standard”, the sensitivity and specificity of ASP-PCR of 23S rRNA gene using gastric biopsies was 100% for two characteristics. The same result was obtained when the results was compared with the sequence data. ASP-PCR of *gyrA* gene with original primer had a sensitivity of 60% and specificity of 92,7 %. Testing with new primers improved the sensitivity to 100%, while specificity remained 92,7 %.

Conclusions: We developed a new primer for detection of N87I mutations in levofloxacin resistant *H. pylori* and standardized two ASP-PCRs previously described for detection of mutations that confer clarithromycin and levofloxacin resistance in *H. pylori* from gastric biopsy specimens.

Keywords: ASP-PCR, mutations, *gyrA*, 23S rRNA, sequencing, agar dilution.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is an important human pathogen that causes gastroduodenal inflammation resulting in duodenal ulcer disease, gastric ulcer disease, gastric adenocarcinoma and primary B-cell gastric lymphoma.^{1,2} The National Institutes of Health in the United States, the Maastricht Consensus in Europe, and the Canadian Consensus all recommended eradication for the treatment/or prevention of these disorders and also to reduce the occurrence of new gastric cancers after endoscopic resection.³ The most common method for the eradication of *H. pylori* infections consists of the administration of a proton pump inhibitor (PPI) and antimicrobial agents such as amoxicillin, clarithromycin, metronidazole, fluoroquinolone, or tetracycline.⁴ Antimicrobial resistance is now the most important factor determining the outcome of *H. pylori* eradication therapy.³ Resistance to clarithromycin and resistance to fluoroquinolones are particularly important as they cannot be overcome by increasing the dose or duration of therapy⁴⁻¹⁰ and in both phenotypic resistance is correlated with clinical and microbiological failure. Mutations leading to resistance have been described for macrolides and fluoroquinolones.^{11,12} Resistance to clarithromycin results from structural changes in the 23S rRNA molecule caused by mutation of the 23S rRNA gene. Most common mutations are A-G transitions at position 2143 (A2143G) and 2142 (A2142G).¹³⁻¹⁷ These mutations have been confirmed to confer resistance by mutagenesis studies.^{18,19} Other mutations observed in low-level clarithromycin resistant *H. pylori* isolates include A2144G, A2142C [11] and C2694A.²⁰

Fluoroquinolone resistance caused by point mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) of the *gyrA* gene which encodes subunit A of DNA gyrase.²¹ The amino acid substitutions observed in clinical strains have been primarily reported at

positions 87 (Asn to Lys) or 91 (Asp to Gly, Asp to Asn, or Asp to Tyr²²⁻²⁴) although resistant strains lacking these mutations have also been described.²⁵

In routine clinical practice, the detection of clarithromycin and levofloxacin resistance is based on phenotypic methods such as E-test or agar dilution; however, these methods are time-consuming and take up to 2 weeks for completion.²⁶ Molecular methods to detect the point mutations conferring resistance have an advantage of providing rapid results. Allele-specific PCR (ASP-PCR) is especially useful to determine single nucleotide polymorphism (SNP) in DNA samples and this technique allows the identification of mutations without direct sequencing or digestion with restriction enzymes.^{24,27,28} The aim of this study was to use ASP-PCR to identify mutations predictive of clarithromycin and fluoroquinolone resistance in DNA from gastric mucosal biopsy samples from Colombian patients infected with *H. pylori*. The concordance, sensitivity and specificity for each ASP-PCR were determined by comparing the results of agar dilution (phenotypic test) and sequence of 23S rRNA and *gyrA* genes from isolates of *H. pylori* with each ASP-PCR in DNA from gastric specimens.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples: Gastric biopsy samples from Colombian patients referred for gastroscopy at the Gastroenterology Unit of Clínica Fundadores, Bogotá, Colombia; were used in this study. Written informed consent for participation was obtained from each of the patients before entry into the study. The protocol was approved by ethical committee of Javeriana University and Clínica Fundadores. These patients were part of a clinical trial to

assess the efficacy of a triple therapy with levofloxacin. The status of the infection was confirmed by rapid urease test (RUT) and histopathology (Giemsa stain). Two antrum biopsies specimens were obtained of each patient, and one of the tissue specimens was cultured for *H. pylori* and the other was used for DNA extraction.

Bacterial strains, culture conditions, and determination of susceptibility to clarithromycin and levofloxacin: Biopsies samples were crushed in 0.5 mL of PBS and cultured in Wilkins Chalgren Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) containing 7% horse blood, vancomycin (10 mg/L) and trimethoprim (5 mg/L). The plates were incubated at 37°C under microaerophilic conditions for up to 14 days and identified as *H. pylori* by Gram stain, urease, catalase and oxidase reactions.²⁹

MICs for the recovered *H. pylori* strains were measured for clarithromycin and levofloxacin using the agar dilution method according to the CLSI recommendation.³⁰ The resistance breakpoint for clarithromycin and levofloxacin was determined as ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$.²³

DNA sequencing of 23S rRNA gene and *gyrA* gene of *H. pylori* isolates: Total genome DNA was extracted from *H. pylori* isolates using DNAzol® kits (Invitrogen - USA). The DNA samples were stored at -20°C until use. Primers 23S rRNA F (5'- CCA CAGCGATGTGGTCTCAG -3') complementary to position 2191 to 2210 and 23S rRNA R (5'- CTCCATAAGAGCCAAAGCCC -3') complementary to position 2596 to 2615 were used to amplify a fragment of 425-bp of the peptidyltransferase region of the 23S rRNA in *H. pylori* (GenBank accession number U27270 and described by Kim KJ.¹⁶) PCR amplification of DNA was performed by a MyCycler thermal cycler (BIORAD – USA) in a

final volume of 50 µL containing 1 µg of *H. pylori* genomic DNA, 1 µM concentration of primers and 42 µL of Super Mix (Invitrogen – USA). The cycling program was 1 cycle at 95°C for 5 min; 35 cycles of 95°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final extension step at 72°C for 10 min.

Primers complementary to regions flanking the 428-bp coding sequence of the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* (codons 38 to 154) were used for the amplification of the *gyrA* gene. The *gyrA* primer sequences were: *gyrA* F (5'-TTTRGCTTATTCMATGAGCGT-3') and *gyrA* R (5'-GCAGACGGCTTGGTARAATA-3'). The PCR mixture (50 µL final volume) contained 1 µg of *H. pylori* genomic DNA, Super Mix (Invitrogen - USA) and 0.5 µM (each) primer. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 26 cycles of denaturation at 94°C for 60 s, annealing at 56°C for 60 s, and extension at 72°C for 30 s, with a final extension at 72°C for 5 min.

PCR products (23S rRNA and *gyrA*) were purified by Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA-USA) and sequenced by Macrogen (Korea).

DNA preparation and PCR analysis for gastric biopsies specimens: DNA was isolated from the gastric tissue specimens by using QIAmp DNA mini kits (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA preparations were subjected to PCR for *ureA* and *vacA* genes to confirm the presence of *H. pylori* DNA. PCR for the *ureA* gene was performed using primers: *ureA*-F (5'-AACCGGATGATGTGATGGAT-3') and *ureA*-R (5'-GGTCTGTCGCCAACATTTTT-3') reported by Kim *et al.*³¹ The amplification was conducted using GoTag polymerase (WI, USA) under the following conditions: Initial

denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 20 s, and extension at 72°C for 30 s, with final extension 72°C for 5 min. PCR for the *vacA* gene was performed using GoTag polymerase (WI, USA) and the primers *vacA*-F (5'- TACAACAAACACACCGCAAAA -3') and *vacA*-R (5'- TGTAGCGATACCCCAACAA-3') reported by Ayala *et al.*³² The PCR condition for the *vacA* gene amplifications were: Initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 20 s, and extension at 72°C for 30 s, with final extension 72°C for 5 min.

Allele-Specific PCR for to determine 23S rRNA mutation of *H. pylori* from DNA extracted from gastric biopsies: ASP-PCR for 23S rRNA gene was performed with four primers described previously by Furuta *et al.*²⁷ The primer sequences were: FP-1 (5'- TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'); FP2143G (5'- CCGCGGCAAGACAGAGA-3'); RP-1(5'-GACTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTAC-3') and RP2142G(5'-AGTAAAGGTCCACGGGGTATTCC-3'). ASP-PCR was performed with KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase, obtained a band of 320-bp for both wild type (wt) and mutant, 238-bp for A2142G mutation and 118-bp for A2143G mutation..

The mix for KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), was performed using: 2.4 µL of distilled water, 10 µL of 2X reaction Xtreme buffer, 4 µL of dNTPs (200 µM each), 0.3 µM each primer, 0.4 µL KOD Xtreme Hot Start DNA polymerase and 2 µL of DNA template. The amplification was conducted under the following conditions: 1 cycle at 94°C for 2 min; 40 cycles of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s, 68°C for 20 s, with a final extension at 72°C for 2 min.

Allele-Specific PCR for to determine *gyrA* mutation of *H. pylori* from DNA extracted from gastric biopsies: ASP-PCR for the *gyrA* gene was performed with the primers described previously by Nishizawa *et al.*²⁴ (Table 1). Three new primers were designed to determine mutations at positions A260T, T261C, T261A, related with N87I mutation in the GyrA protein. The design of the primers was based on the *gyrA* sequence of *H. pylori* 26695 (Table 1).

ASP-PCR amplification of the *gyrA* gene using the new primers set was performed in a final volume of 20 µL containing: 0.8 µL of distilled water, 10 µL of 2X reaction Xtreme buffer, 2 µL of dNTPs (200 µM each), 5.8 µL of primer mixture (8 pmol of *gyrA* primer R, 2 pmol of primer F261A1, 2 pmol of primer F261G1, 8 pmol of primer F271A5, 10 pmol of primer F271A9, 6 pmol of primer F271T9, 6 pmol of primer F272G1, 6 pmol of primer F272G9, 6 pmol of primer F87ATC, 2 pmol of primer F87ATT and 2 pmol of primer F87ATA), 0.4 µL KOD Xtreme Hot Start DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) and 1 µL of DNA template. The amplification was conducted under the following conditions: 1 cycle at 94°C for 2 min; 40 cycles of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s, 68°C for 20 s, with a final extension at 68°C for 2 min. ASP-PCR amplification with original primers was performed by the method described by Nishizawa *et al.*²⁴. Samples were defined as positive for mutation of *gyrA* gene when 254-bp band was detected.

RESULTS

Gastric biopsies from 80 patients were entered including 60 patients with active *H. pylori* infections and 20 found to be *H. pylori* negative.

Clarithromycin and levofloxacin susceptibility by agar dilution: The MICs for all strains was determined for clarithromycin and levofloxacin. The assessment of clarithromycin susceptibility by agar dilution showed 55 patients infected with susceptible strains and 5 with resistant strains. The distribution for levofloxacin susceptibility was 54 patients infected with susceptible strains and 6 with resistant strains.

Nucleotide sequence analysis in DNA of strains: The sequence for the peptidyltransferase region of the 23S rRNA and QRDRs of *gyrA* was obtained for susceptible and resistant *H. pylori* strains. Analysis of the 23S rRNA sequence detected 4 strains with A2143G mutation and 1 strain with A2142G mutation; the sequences the remaining 55 strains were wild-type. Analysis in the QRDR of *gyrA* gene showed 54 with wild-type genotype compatible with their susceptible phenotype. Three wild-type variants were observed: 28 strains had the sequence AAC (N87), 18 had AAT (N87) and 8 had ACC (N87T). Various substitutions in the amino acid sequence of QRDR of GyrA were observed in the 6 levofloxacin resistant strains. Three strains had N87I mutations, 2 had D91G mutations and 1 had D91N mutation.

PCR for the ureA gene and vacA gene of *H. pylori* in biopsies samples:

In 80 biopsies, the *ureA* gene and *vacA* gene were detected in 60 biopsies in which culture were positive; the remaining 20 biopsies were negative by both PCRs.

ASP-PCR for mutations in 23S rRNA gene of *H. pylori* in biopsies samples: Of the 60 biopsies positive by culture, ASP-PCR classified 55 biopsies as wild-type and 5 as resistant; 1 showed A2142G and 4, A2143G mutations (Figure 1). ASP-PCR for mutations

in 23S rRNA was performed using mixtures in various proportions of DNA from the wild-type and A2143G or A2142G mutant samples. ASP-PCR was able to detect the mutant or wild type DNA at concentrations as low as 2 ng/ μ L (data not shown).

ASP-PCR for mutations in *gyrA* gene of *H. pylori* in biopsies samples: Two different set of primers were used to identify mutations in the *gyrA* gene. The original set of primers described by Nishizawa *et al.*²⁴ classified the DNA biopsies samples as 48 wild-type and 12 resistant genotypes. The distribution of genotypes detected by ASP-PCR with the a new primer plus the original primers was: 45 wild-type and 15 resistant. The ASP-PCR with the new primer detected 3 samples with *gyrA* mutation at codon 87 (N87I) (Figure 2). No amplification was observed in 20 DNA biopsies samples of patients whose status was negative for *H. pylori*. Mixtures in various proportions of DNA strains samples from the wild-type and N87I, D91G and D91N mutant samples were performed and the ASP-PCR was able to detect the mutant DNA concentration as low 5 ng/ μ L. (data not shown)

Concordance, sensitivity and specificity of ASP-PCR for mutations in 23S rRNA gene of *H. pylori*: One hundred percent concordance was obtained when the ASP-PCR 23S rRNA results were compared with agar dilution and sequence methods. There was complete agreement between the different techniques; additionally the molecular test correctly classified all those negative for *H. pylori* infection (i.e., they showed no amplification in any sample). Using agar dilution as the “gold standard”, the sensitivity and specificity of ASP-PCR of 23S rRNA gene was 100% for two characteristics. The same result was obtained when the results was compared with the sequence data.

Concordance, sensitivity and specificity of ASP-PCR for mutations in *gyrA* gene of *H.*

pylori: Concordance between phenotypic susceptibility tests and sequence for ASP-PCR *gyrA* using the original primers and the new set of primers was 92.7 % for susceptible samples for both set of primers (Table 2). No amplification with both set of primers was observed in negative samples for *H. pylori*. ASP-PCR of *gyrA* gene with original primer had sensitivity of 60% (IC95% 17 - 93%) and specificity of 92.7 %. The molecular test with new primers improved the sensitivity to 100% (IC95 46-100%), while specificity remained 92.7%.

DISCUSSION

Accurate and rapid detection of antibiotic resistance has an important role in the selection of optimal antibacterial agents for the treatment of patients infected by *H. pylori*.^{27,33} However such information is rarely available at time of starting therapy in part because conventional antimicrobial susceptibility testing requires culture of the bacterium which is time consuming and often unavailable. In addition, approximately 10% of the attempts fail. Overall, phenotyping methods are both expensive and cumbersome.³⁴ In Colombia, as in most of the world, culture and susceptible test are not available in routine *H. pylori* clinical practice. Genetic tests are simple, straight forward and theoretically are good tools to rapidly detect the resistance to macrolides and fluoroquinolones using direct detection with DNA from gastric biopsies samples.

In the present study, we used ASP-PCR methods to detect mutations in the 23S rRNA and *gyrA* gene of *H. pylori*. The methods were useful for easily identifying susceptible organisms from those resistant to clarithromycin or levofloxacin using gastric

mucosal biopsies. Our results showed a good correlation between ASP-PCR and both agar dilution and direct sequencing (i.e., 100% the concordance, sensitivity and specificity for ASP-PCR of 23S rRNA gene were obtained). However this results could be different if additional mutations to A2142G or A2143G are present in the samples as the methods used in this study were designed to detect only the most common described mutations. Colombian samples in this study had only A2142G and A2143G mutations and the molecular test was able to discriminated perfectly between biopsies samples susceptible with wild-type sequence and those with the resistance with mutations A→G at positions 2142 or 2143. Additionally, the molecular test correctly classified all negative patient as no sample showed any amplification.

The analysis of sequences for *gyrA* of Colombian *H. pylori* resistance strains showed D91G, D91N and N87I mutations and the susceptible strains with wild-type sequences showed the presence of 18 strains with N87(AAT) 8 with N87(AAC) and 28 with N87T(ACC). We used ASP-PCR with the original primers described for Nishizawa *et al.*²⁴ to detect mutations C261A, C261G, G271A, G271T, A272G in the *gyrA* gene, that correspond to the following GyrA amino-acid changes, N87K(AAA), N87K(AAG), D91N(AAT), D91Y(TAT), D91G(GGT), respectively. The concordance between phenotypic susceptibility tests and sequence for this ASP-PCR *gyrA* was 92.7 % for susceptible samples and 60% for resistant samples. No amplification was observed in negative samples for *H. pylori*. The sensitivity and specificity of this molecular test was 60% and 92.7 % respectively. The reason of lower sensitivity was due to presence of mutations N87I in our samples which were not detected by the original test and two of our five resistant strains carried this mutation. Importantly, false negative results have a clinical

impact in that patients infected with resistant strains were not detected using the test. When other similar techniques for the detection of levofloxacin resistance were reviewed, including Genotype Helicobacter DR (a commercial test), we found that none of them detects the N87I mutation. As such, because the N87I mutation was present in 40% of Colombian strains resistant to levofloxacin, the failure to detect these resistance strains would likely result in failure of the treatment in Colombian patients. We therefore designed three new primers to detect the mutation N87I [one primer for each codon of Isoleucine (I) amino-acid]. The ASP-PCR was performed with the original primers plus the new primers. The molecular test with the new primers had improved sensitivity (to 100%) although the specificity remained 92.7 %. The proprieties of the test with the new primers are more appropriated for resistance detection to fluoroquinolones in Colombian *H. pylori* strains of biopsies specimens positives for *H. pylori*. With respect to specificity, the discordant results between the genotyping and phenotyping methods for levofloxacin was most likely related to the presence of mixed infections with both wild type and mutant genotypes in 4 of the gastric biopsy specimens. Our gold standard was agar dilution, and we only recovered susceptible strains, however the ASP-PCR was able to detect resistance strains in this samples. Because it is often difficult culture *H. pylori* in all gastric biopsies, and cultures do not always recover all the strains present in the sample, molecular test are a good alternative to detect resistant genotypes in gastric biopsy specimens. However the method has some difficulties to know: (i) use many primers, for this reason need longer standardization. (ii) No detect all mutations described in *gyrA* gene, for this reason the test could be adapt in accordance with the mutations found in each area. Once the test is implemented is a good solution saving time and useful for routine clinical practice because use DNA from biopsies samples, and theoretically, genotypic analyses would allow the

patients receive appropriate treatment and prevent treatment failure due to unrecognized resistance.

In conclusion, we developed a new primer set for detection of N87I mutation in *H. pylori* levofloxacin resistance and standardized two ASP-PCR using DNA from gastric biopsy specimens previously describe for detection of mutations that confer clarithromycin and levofloxacin resistance in *H. pylori* isolates. These assays provide a specific and rapid means of predicting resistance to clarithromycin and levofloxacin and their application could be of enhanced value in the management of *H. pylori* infections. The optimization in gastric biopsy tissue without the need for culture, allows the implementation of this test in Colombia, a country where culture and susceptibility tests are not routinely performed.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by COLCIENCIAS (Colombia), Grant 120340820464 and Internal Project of Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center and Baylor College of Medicine. The authors declare that they have no competing interests related with the results of the manuscript.

Dr. Graham is supported in part by the Office of Research and Development Medical Research Service Department of Veterans Affairs, Public Health Service Grant DK56338, which funds the Texas Medical Center Digestive Diseases Center, DK067366 and CA116845. The contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the VA or NIH.

REFERENCES

1. Graham DY. Efficient identification and evaluation of effective *Helicobacter pylori* therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009, **7**: 145–8.
2. Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, Saverymuttu S. PCR-Based Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection and Real-Time Determination of Clarithromycin Resistance Directly from Human Gastric Biopsy Samples. *Journal Of Clinical Microbiology* 2001; **39**: 1217–20.
3. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Favalli C. New Site of Modification of 23S rRNA Associated with Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**: 3765–9.
4. Furuta T and Graham DY. Pharmacologic aspects of eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin N Am* 2010; **39**: 465–80.
5. Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T and López-Brea M. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; **48**:3703–7
6. Chang, Sheu BS, Cheng H, Yang Y, Yang H and Wu J. Resistance to metronidazole, clarithromycin and levofloxacin of *Helicobacter pylori* before and after clarithromycin-based therapy in Taiwan *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009; **24**:1230–5.
7. Hung IFN, Chan P, Leung S, Chan FSY, Hsu A, But D, Seto WK, Wong SY, Chan CK, Gu Q, Tong TSM, Cheung TK, Chu KM, Wong BCY. Clarithromycin–Amoxicillin-Containing Triple Therapy: A valid empirical first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication in Hong Kong? *Helicobacter* 2009; **14**: 505–11.

8. Wolle K, Leodolter A, Malfertheiner P and König W. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. *Journal of Medicine Microbiology* 2002; **51**:705–9.
9. De Francesco V, Zullo A, Perna F, Giorgio F, Hassan C, Vannella L, Cristofari F, Panella C, Vaira D and Lerardi E. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and [13C] urea breath test values. *Journal of Medical Microbiology* 2010; **59**:588–91.
10. Perna F, Zullo A, Ricci C, Hassan C, Morini S and Vaira D. Levofloxacin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* re-treatment: Role of bacterial resistance. *Digestive and Liver Disease* 2007; **39**:1001–5
11. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, and Megraud F. Evaluation of a new test, GenoType HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical Microbiology* 2009; **47**:3600–7.
12. Wang G, Wilson TJ, Jiang Q, Taylor DE. Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(3):727-33
13. Ahmad N, Zakaria WR, Abdullah SA, Mohamed R. Characterization of clarithromycin resistance in Malaysian isolates of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 3161-5.
14. Sin-Loong H, Eng Lai T, Chook Koon S and Khean-Lee G. Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia. *Journal of Digestive Diseases* 2010; **11**:101–5.
15. Garrido L and Toledo H. Novel Genotypes in *Helicobacter pylori* Involving Domain V of the 23S rRNA gene. *Helicobacter* 2007; **12**:505–9.

16. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 2002; **17**: 599-603.
17. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Mégraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut* 1999; **44**:463–7.
18. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; **41**: 2621–8.
19. Wang G, Sayeedur M, Humayun Z and Taylor D. Multiplex sequence analysis demonstrates the competitive growth advantage of the A-to-G mutants of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999; **43**:683–5.
20. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:3465-6.
21. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, Mitani T, Morita Y, Tamura T, Kinoshita S, Okano Y, Kumagai S and Kasuga M. Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* 2006; **11**: 243–9.
22. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations

- leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; **29**:389-96.
23. Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* 2009; **14**:61-5.
24. Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, Kobayashi I, Hibi T. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:303-5.
25. Wang LH, Cheng H, Hu FL, Li J. Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol*. 2010;**16**:2272-7.
26. Burucoa C, Garnier M, Silvain C and Fauche JL. Quadruplex Real-Time PCR assay using Allele-Specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **46**:2320–26.
27. Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, Shirai N, Nakamura A, Kodaira C, Nishino M, Okuda M, Okimoto T, Murakami K, Fujioka T, Hishida A. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**:1810-5.
28. Nakamura A, Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Kajimura M, Soya Y, Hishida A. Determination of mutations of the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* by allele specific primer-polymerase chain reaction method. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**:1057-63.
29. Kist M. Isolation and identification of bacteria of the genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Zentralbl Bakteriol* 1991; **276**: 124–39.

30. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement: M100-S20*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
31. Kim N, Marcus EA, Wen Y, Weeks DL, Scott DR, Jung HC, Song IS, Sachs G. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infection and Immunity* 2004; **72**:2358-68.
32. Ayala G, Chihu L, Perales G, Fierros-Zárate G, Hansen LM, Solnick JV, Sánchez J. Quantitation of H. pylori cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. *Microb Pathog.* 2004;**37**:163-7.
33. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Mégraud F, Midolo P, Maggi-Solcà N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**:1500-4.
34. Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:3166-70.

Figure 1.

Representative electrophoresis patterns of ASP-PCR products for determination of mutations at position 2142 and 2143 of the *23S rRNA* gene of *Helicobacter pylori* in biopsies samples. Band of 320-bp indicates the presence of *H. pylori* 23S rRNA gene and bands of 238-bp and 118-bp indicates the presence of A2142G and A2143G mutation, respectively.

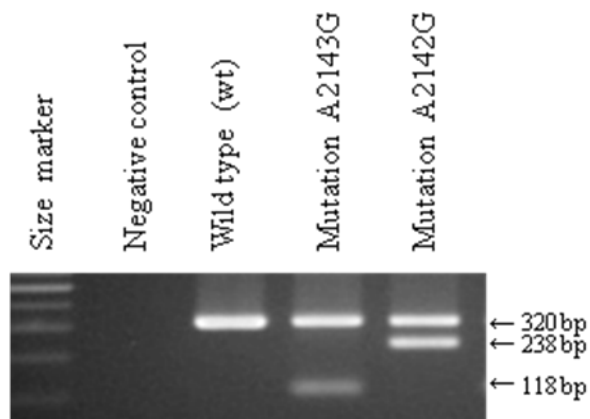


Figure 2.

Allele-Specific PCR products amplified with new sets of primers for determination mutant *gyrA* genotypes of *H. pylori* in biopsies samples. Band of 254-bp appear in samples with mutation in *gyrA* gene. Samples with wild-type sequence show no band.

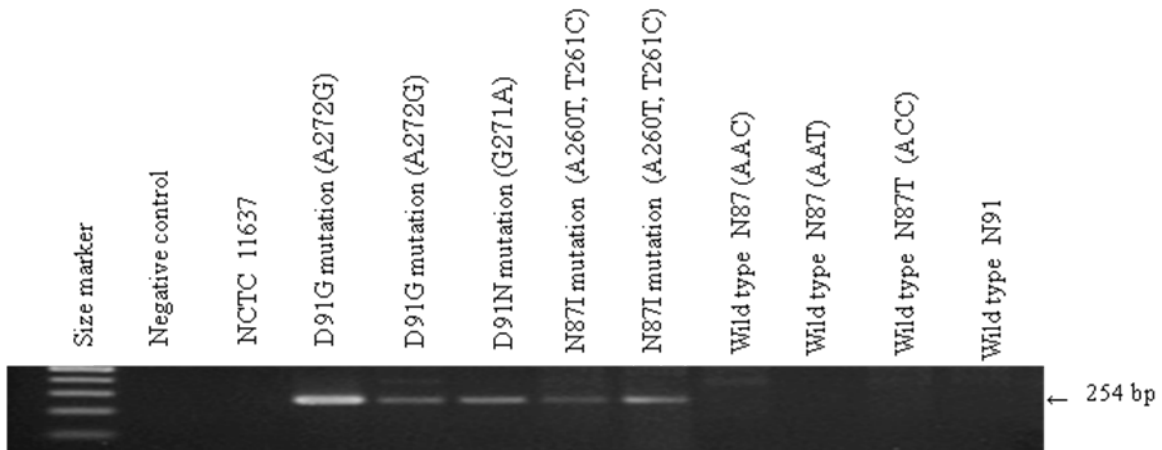


Table 1.

Oligonucleotide sequences of primers used in ASP-PCR method to determine *gyrA* mutation of *H. pylori* at positions 261, 271, and 272.

| Primer direction | Mutation | Primer name | Sequence ^{*1} | |
|------------------|--------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Forward | C261A | F261A1 | CCCCCATGGCGAG <u>AA</u> aG | |
| | C261G | F261G1 | CCC CCA TGG CGAG <u>AA</u> gG | |
| | G271A | F271A5 | GCGATAACGCGGTTTAG <u>a</u> A | |
| | | F271A9 | GCGATAATGCGGTTTAG <u>a</u> A | |
| | G271T | F271T9 | GCGATAATGCGGTTA <u>A</u> tA | |
| | A272G | F272G1 | GCGATAACGCGGTTTAG <u>G</u> gT | |
| | | F272G9 | GCGATAATGCGGTTTAG <u>G</u> gT | |
| | A260T, T261C | F87ATC ^{*2} | CCCCCATGGCGAGAt <u>c</u> G | |
| | A260T | F87ATT ^{*2} | CCCCCATGGCGAGAt <u>T</u> G | |
| | A260T, T261A | F87ATA ^{*2} | CCCCCATGGCGAGAta <u>G</u> | |
| | Reverse | | <i>gyrA</i> R | GTTAGGCAGACGGCTTGGTARAATA |

^{*1} In the primer sequence the penultimate nucleotide to distinguish between wild-type and mutant sequences is shown in lowercase. The 1-bp mismatch at another nucleotide is underlined.

^{*2} News oligonucleotides sequences of primers used in AS-PCR method to determine mutation (N87I) at positions (A260T, T261C, T261A), were based on the *gyrA* sequence of *H. pylori* 26695.

Table 2. Concordance of ASP-PCR *gyrA* with agar dilution and DNA-sequence of isolates.

| Culture and agar dilution | Sequence of strain | ASP – PCR for <i>gyrA</i> | Total of samples | Concordance |
|--|--------------------|---------------------------|------------------|-------------|
| Concordance of all 3 methods with original primer | | | | |
| Susceptible | Wild type | Wild type | 51 | 92.7% |
| | Wild type | Mutant | 4 | |
| Resistant | Mutant | Mutant | 3 | 60% |
| | Mutant | Wild type | 2 | |
| Negative | No data | Negative | 20 | 100% |
| Concordance of all 3 methods with new primers set | | | | |
| Susceptible | Wild type | Wild type | 51 | 92.7% |
| | Wild type | Mutant | 4 | |
| Resistance | Mutant | Mutant | 5 | 100% |
| Negative | No data | Negative | 20 | 100% |

Detection of clarithromycin resistance in *H. pylori* following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days

YUAN LI, EMIKO RIMBARA, SELVI THIRUMURTHI, *ALBA TRESPALACIOS, RITA REDDY, SAMAN SABOUNCHI, TARAQ ASSED ATTUMI, DAVID YATES GRAHAM

Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center, Ben Taub General Hospital, and Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

***Current address:** Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia

Running head: Susceptibility testing of stored samples

Words: 2370

*Corresponding author:

DAVID YATES GRAHAM, M.D.

Department of Medicine, Michael E. DeBakey Veterans Affairs, Medical Center and Baylor College of Medicine, RM 3A-320 (111D), 2002 Holcombe Boulevard, Houston, TX 77030, USA, e-mail: dgraham@bcm.edu

Abstract

Objective: Traditional *H. pylori* eradication therapy has been undermined by increasing antimicrobial, especially clarithromycin, resistance. Susceptibility testing in most areas is difficult or unavailable. We assessed whether gastric biopsies stored at room temperature in a rapid urease test get were suitable for *H. pylori* clarithromycin susceptibility testing.

Methods: After 30 days of storage at room temperature, DNA was extracted from a gastric biopsy present within a rapid urease test (Hpfast). *H. pylori* status and clarithromycin susceptibility were evaluated used *H. pylori*-specific PCR for *ureA*, *vacA*, and allele-specific primer-polymerase chain reaction of the 23S rRNA genes. The PCR results were compared with histology, RUT, and culture. *H. pylori* positive was defined as RUT and either culture or histology positive; *H. pylori* negative as RUT, culture and histology negative.

Results: Samples from 31 subjects were evaluated; 11 were *H. pylori* positive including 9 by culture; 8 of which had allele-specific primer-PCR results from the RUT specimen for the detection of mutations of the 23S rRNA gene. When both tests were available, culture and PCR results were concordant in 8/8 (100%). Fifteen of the 20 histology, RUT and culture negative cases had

all 3 PCR's negative. In one all 3 were positive; in 3 only the 23S rRNA was positive and in 1 only *ureA* was positive.

Conclusion: Gastric biopsy specimens stored within the gel of an RUT for 30 days can be used to for molecular testing confirm the diagnosis of *H. pylori* infection and test forr clarithromycin susceptibility.

Key words: Susceptibility tests; clarithromycin resistance; polymerase chain reaction; noncryogenic storage; rapid urease tests

Introduction

Helicobacter pylori is a major human pathogen etiologically involved in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer disease, gastric adenocarcinoma, and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma¹. *H. pylori* eradication therapy is recommended whenever an *H. pylori* infection is detected². The most successful *H. pylori* eradication regimens contain an antisecretory agent and two or more antimicrobial agents. Clarithromycin is one of the most widely used antimicrobials in *H. pylori* eradication regimens. However, clarithromycin resistance has been increasing worldwide and currently clarithromycin resistance is the major cause of treatment failure³⁻⁵. The decision regarding which *H. pylori* treatment regimen to use differs from most other common infections in that culture and susceptibility testing is not generally available such that clinicians are required to make empiric choices in terms of a treatment regimen. Regularly updated data regarding local and regional patterns of resistance would be especially useful to allow clinicians to choose among eradication regimens but is generally unavailable.

One approach to obtaining susceptibility data despite lack of culture facilities is to use molecular methods. Clarithromycin susceptibility is especially amenable to this strategy as clarithromycin resistance is most

commonly caused by point mutations of the 23S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene, the main component of the 50S subunit. The most common mutations associated with resistance are at position 2142/43 (A2142 to G/C/T; A2143 to G/C) in the peptidyltransferase region from the V domain. The mutations result in prevention of clarithromycin binding to 50S ribosomal subunit ⁶. Major mutations are transitions from A to G or T to C and transversion is A to T or G to C from adenine to guanine at positions 2142 and 2143 of the 23S rRNA gene (A2142G and A2143G) ⁷. Many methods to detect these mutations are available including direct sequence, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism ⁸, real-time PCR assays ⁹, microelectronic chip array ¹⁰ and fluorescent in situ hybridization ¹¹.

Molecular techniques to assess clarithromycin resistance often use gastric mucosal biopsies collected specifically for that purpose. However, biopsy samples originally taken for rapid urease testing have also been utilized ¹². In developing countries endoscopy is often readily available although the ability to reliably freeze, store and ship frozen samples for subsequent molecular testing to off site facilities is often difficult or impossible.

The aim of this study was to determine whether gastric mucosal biopsy samples used for rapid urease testing and stored for 30 days at room temperature in situ in the RUT gel could also be used successfully for molecular testing to confirm the presence of *H. pylori* infection and to determine clarithromycin susceptibility. It was hypothesized that if this were possible, it should theoretically be possible to easily and reliably determine the prevalence of clarithromycin resistance in developing countries despite the lack of adequate cryogenic storage capability. This would then allow susceptibility information to be provided to clinicians and also used to help interpret the outcome of clinical trials.

Materials and methods

Patients and *H. pylori* infection diagnosis

Patients who underwent upper endoscopy at the Ben Taub General Hospital, Houston, Texas between April and July, 2010 were enrolled. After informed consent was obtained, 3 gastric biopsy biopsies were obtained at the incisura: one for the RUT, one for histology and one for culture. Additional biopsies were taken from the gastric antrum and body for histology. Biopsy

forceps were large capacity style with needle (Boston Scientific Radial Jaw 4, Natick, MA). The biopsy for the rapid urease test (RUT) (*Hpfast*, CheckMed systems, Camp Hill, PA) was placed in the RUT gel which was then placed in an RUT warmer at 37C (Helicoview, GI Supply, Camp Hill, PA) for up to 24 hours. The sample was interpreted after 24 hours and the RUT test containing the biopsy was then stored in at room temperature for 30 days after which the biopsy was recovered from the gel and the deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted (see below).

The specimen for culture was immediately placed in *H. pylori* transport media and frozen at -70°C until cultured¹³. Biopsies for histology were sent to the clinical laboratory for staining with hematoxylin and eosin and for immunohistochemical stains for *H. pylori*.

The study was approved by the institutional review board at Baylor College of Medicine and all subjects signed informed consent prior to entry.

Culture and clarithromycin acceptability testing

Biopsies were crushed between frosted ends of sterilized slides and the homogenized tissue suspension was inoculated on non-selective and

Helicobacter pylori special peptone agar (HPSPA) selective plates consisting of a horse blood agar (HBA) plate (nonselective medium) or an HBA plate containing 10 µg/mL nalidixic acid, 5 µg/mL trimethoprim, 3 µg/mL, vancomycin and 2 µg/mL amphotericin B (selective medium). Plates were incubated under microaerophilic conditions at 37°C for up to 14 days as previously described ¹⁴. *H. pylori* isolates were defined as Gram-negative spiral-shaped bacilli that were oxidase, catalase, and urease positive. Fresh growth from brain heart infusion plates containing 7% horse blood was harvested in 6mL of saline and adjusted to turbidity equivalent to a No. 2 McFarland turbidity standard. The suspended inoculum was applied uniformly on the entire surface of Mueller Hinton Agar plates containing 5% sheep blood were covered with 0.3–0.5 mL of each suspended inoculum to produce a lawn of bacterial growth. A clarithromycin E-test strip (AB Biodisk, Solna, Sweden) was applied to the surface of plate and after incubation in microaerophilic conditions at 37°C for 72 h, results were read according to the manufacturer's guide. The minimal inhibitory concentration (MIC) was recorded as the lowest concentration that inhibited visible growth of organisms. For clarithromycin, the cut-off for resistance was an MIC of >1 mg/L.

DNA extraction from the gastric biopsy samples

DNA was extracted from gastric biopsy using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacture's instruction. The extracted DNA was stored at -70°C until use.

PCR for the *ureA*, *vacA* gene and allele-specific primer-PCR for the 23S rRNA gene

PCR for the *ureA* gene of *H. pylori* was performed using GoTaq polymerase (Promega, WI, U.S.A.) and the primers *ureA*_197F (5'-AACCGGATGATGTGATGGAT-3') and *ureA*_413R (5'-GGTCTGTCGCCAACATTTTT-3') reported by Kim *et al*¹⁵. PCR condition for the *ureA* gene is performed as follows: Denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C for 20 sec, and extension at 72°C for 30 sec, with final extension 72°C for 5 min.

PCR for the *vacA* gene was performed using GoTaq polymerase (Promega, WI, U.S.A.) and the primers *vacA*_8U21F (5'-TACAACAAACACACCGCAAAA -3') and *vacA*_131L20AR (5'-

TGTAGCGATACCCCAACAA-3') reported by Ayala *et al* ¹⁶. PCR condition for the *vacA* gene is performed as follows: Denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C for 20 sec, and extension at 72°C for 30 sec, with final extension 72°C for 5 min.

Allele-specific primer-PCR for the detection of the 23S rRNA gene mutations, A2142G and A2143G, were performed according to the method reported by Furuta *et al.* ¹⁷. KOD Xtreme Hot start DNA polymerase kit (Toyobo, Osaka, Japan) was used for PCR System. The total volume of PCR system was 10 µL which included approximately 0.1 µg of DNA , 0.2U KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase, 4 µmol dNTPs (each), 5 µL 2X Xtreme Buffer and 0.3 nmol/L of primers FP-1 (5'-TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC -3'), RP-1 (5'-GACTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTAC -3'), RP2142G (5'-AGTAAAGGTCCACGGGGTATTCC -3'), and FP2143G (5'-CCGCGGCAAGACAGAGA -3'). allele-specific primer-PCR was performed as follows: denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 98°C for 10 sec, annealing at 65°C for 30 sec, and extension at 68°C for 20 sec, with final extension 72°C for 2min. The 320bp fragment indicates the presence of wild-type *H. pylori* 23S rRNA gene, while 238 bp

and 118 bp fragments indicates the presence of a mutation A2142G and A2143G, respectively, which cause clarithromycin resistance. All PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel along with a 100bp DNA marker.

Analyses

Those performing the PCR, culture, and histology were blinded to the histological, RUT, and culture results until all analyses were completed. For primary analysis we defined a positive test as a positive RUT and one other test (either culture or histology). The requirement for a positive RUT was based on the premise that positive results of both the RUT and the molecular testing require that the specimen utilized contain adequate numbers of bacterial cells (i.e., a positive RUT would guard against the problem that the infection may exhibit patchiness in terms of presence and intensity of the infection). For example, a single biopsy might be from an area of intestinal metaplasia and be falsely negative. *H. pylori* negative was defined as all three tests negative. To better understand the limitations of the approach, we separately examined cases in which the RUT was negative and both culture and histology were positive.

Results

Thirty-one subjects (21 women, 10 men, average age 55.2) entered including 11 (33.3%) with active *H. pylori* infections. Eight has positive culture and histology, two had positive RUT and histology, and one had positive RUT and culture.

In 9 of the 11 (81%) *H. pylori* positive cases the PCR for *ureA*, *vacA*, and the *H. pylori* 23S rRNA gene were also positive (Table 1); all three PCR's were negative in two cases (Table 1). Fifteen of the 20 *H. pylori* negative cases (75%) were negative by all three PCR's. Three of the samples in which the RUT, culture, and histology were negative and the PCR for *ureA* and *vacA* were all negative were positive by PCR for the 23S rRNA gene. In addition, one negative by RUT, histology and culture was positive for *ureA*, *vacA*, and the 23S rRNA gene and likely represents the presence of a true positive but at low *H. pylori* density. However, the remaining three in which only the 23S rRNA gene was positive likely represent false positive results possibly related to the presence of cross reacting organisms.

The results of clarithromycin susceptibility testing of the 9 *H. pylori* isolates were compared with the results of allele-specific primer-PCR obtained from biopsies stored at room temperature for 30 days. Two isolates were clarithromycin resistant (MIC = 12 mg/L and 3 mg/L). In one the PCR was negative; the other allele-specific primer-PCR of the biopsy sample showed an A2142G mutation consistent with the presence of resistance [i.e., the results of susceptibility testing in which the two methods were both positive were in concordance in 8/8 (100%)]. In two cases the culture was positive but the PCR was negative. Follow up of the two cases negative by PCR (one susceptible and one resistant by culture) was done. The susceptible strain was recultured and PCR confirmed a susceptible genotype (wild type). The other strain was not recoverable from the stock and thus PCR could not be done.

Discussion

Rapid urease testing is a convenient and inexpensive way to diagnosis *H. pylori* infection and is used worldwide in both clinical and in basic research. After interpretation of the RUT, the biopsy specimen utilized for RUT testing is typically discarded. Here, we asked whether it might be possible to store the RUT device containing the sample in the gel at room

temperature and still utilize the sample to confirm *H. pylori* status, and more importantly, to test whether the organism was susceptible to clarithromycin. Our results confirmed the hypothesis that gastric biopsies obtained for rapid urease testing could be stored in the RUT get at room temperature and still used to provide data regarding the presence of the infection as well as clarithromycin susceptibility. This technique would be especially useful to retrospectively examine the effects of clarithromycin resistance on the results of clinical trials, particularly those done in areas where *H. pylori* infections were prevalent but advanced medical facilities offering culture or molecular susceptibility testing were not. We believe that this technique should allow testing even in regions lacking reliable electrical supplies and cold storage facilities. Theoretically, the RUT sample could simply be mailed to an off-site facility. However, this hypothesis will require to be tested directly.

There are several caveats regarding the study and the data. First, the study design was based on the premise that a positive RUT result would increase the likelihood that the specimen would contain a sufficient number of organisms (i.e., DNA) to allow clarithromycin susceptibility testing using molecular methods. To reduce the chance of false positive results from unrelated organisms (e.g., oral flora) that might be present, we utilized PCR

assays for both the *ureA* and *vacA* genes to confirm the presence of *H. pylori* in the specimen¹⁸⁻²⁰.

Two RUT's and one other test positive samples were negative for all three PCR's despite being RUT positive. Importantly, 4 of the 20 (20%) presumably *H. pylori* negative cases had positive PCR results for the presence of the *H. pylori* 23S rRNA gene; in 3 the *ureA* and *vacA* genes were not found consistent with the PCR for the *H. pylori* 23S rRNA gene being false positive and emphasizing the importance of confirming the presence of *H. pylori* by the presence of a positive RUT, PCR or both. Finally, it is unknown whether gel type RUT tests other than the one we used would provide similar or identical results.

This pilot study showed that gastric biopsy specimens positive by RUT using the *Hpfast* gel type RUT, and presumably other gel type RUT tests, can be used to evaluate clarithromycin susceptibility using molecular testing. Subsequent studies are underway to refine the methods including evaluating other methods of storing the biopsy sample, the effect of the size of the biopsy, whether more than one biopsy would reduce false negative results, whether the samples can be mailed, and the effect of higher and varying temperature (i.e., simulating tropical regions).

In conclusion, we showed that gastric biopsy specimens in an RUT gel can be used to confirm the diagnosis of *H. pylori* infection and to test clarithromycin susceptibility despite having been stored at room temperature for 30 days. This method could potentially be used for genotyping of pathogenetic genes of *H. pylori* and should prove useful for monitoring the susceptibility of *H. pylori* to antimicrobial agents.

Acknowledgments

Dr. Graham is supported in part by the Office of Research and Development Medical Research Service Department of Veterans Affairs, Public Health Service grant DK56338, which funds the Texas Medical Center Digestive Diseases Center, DK067366 and CA116845. The contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the VA or NIH. Dr. Graham is a unpaid consultant for Novartis in relation to vaccine development for treatment or prevention of *H. pylori* infection. Dr. Graham is also a paid consultant for Otsuka Pharmaceuticals regarding diagnostic testing until has received royalties on the Baylor College of Medicine patent covering materials related to ¹³C-urea breath test. The other authors have nothing to declare.

References



1. Graham DY, Sung JY. *Helicobacter pylori*. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology, diagnosis, management*. Philadelphia: WB Saunders Co, 2006: 1049-1066.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007; 56: 772-781.
3. Horiki N, Omata F, Uemura M, et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter*. 2009; 14: 86-90.
4. Megraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004; 53: 1374-1384.
5. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*. 2010; 59: 1143-1153.
6. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and

- association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 2621-2628.
7. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 477-480.
 8. Alarcon T, Vega AE, Domingo D, Martinez MJ, Lopez-Brea M. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: Prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 486-499.
 9. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, et al.. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4512-4518.
 10. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut.* 2000; 46: 608-614.

11. Xing JZ, Clarke C, Zhu L, Gabos S. Development of a microelectronic chip array for high-throughput genotyping of *Helicobacter* species and screening for antimicrobial resistance. *J Biomol Screen.* 2005 Apr;10(3):235-45.
12. Furuta T, Sagehashi Y, Shirai N, et al. Influence of CYP2C19 polymorphism and *Helicobacter pylori* genotype determined from gastric tissue samples on response to triple therapy for *H. pylori* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3: 564-573.
13. Han SW, Flamm R, Hachem CY, et al. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14: 349-352.
14. Graham DY, Hoffman J, El-Zimaity HM, Graham DP, Osato M. Twice a day quadruple therapy (bismuth subsalicylate, tetracycline, metronidazole plus lansoprazole) for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11: 935-938.
15. Kim N, Marcus EA, Wen Y, et al. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun.* 2004; 72: 2358-2368.

16. Ayala G, Chihu L, Perales G, et al. Quantitation of *H. pylori* cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. *Microb Pathog.* 2004; 37: 163-167.
17. Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: 1810-1815.
18. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 192-200.
19. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut.* 1994; 35: 905-908.
20. de Martel C., Plummer M, van Doorn LJ, et al. Comparison of polymerase chain reaction and histopathology for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Int J Cancer.* 2010; 126: 1992-1996.

← Archivar Spam Eliminar + ⇄ Mover a ▾ Etiquetas ▾ Más ▾

Journal of Digestive Diseases - Manuscript ID JDD-2011-01-0016.R1 [email]  
ref: SE-8-a] Recibidos | X

★ cddjournal@126.com [a través de](#) manuscriptcentral.com pa [mostrar detalles](#) 21 abr [Responder](#) ▾

21-Apr-2011

Dear Dr. Graham :

Your revised manuscript entitled "Detection of clarithromycin resistance in H. pylori following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days" by LI, Yuan; Rimbara, Emiko; Thirumurthi, Selvi; Trespalacios, Alba; Reddy, Rita; Attumi, Taraq; Sabounchi, Saman; Graham , David Y, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Digestive Diseases.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JDD-2011-01-0016.R1.

For your reference: the manuscript number of the PREVIOUS manuscript version is: JDD-2011-01-0016.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jdd> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jdd> .

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Digestive Diseases.

Sincerely,
Journal of Digestive Diseases Editorial Office

Eficacia de la terapia triple con levofloxacina en la erradicación de la infección por *H. pylori*

Trespalacios AA, Otero W, Mercado M, Caminos JE, Avila JM, Arévalo A, Rosero LE, Graham DY.

5. Introducción

El descubrimiento de *H. pylori* ha cambiado completamente el manejo de las enfermedades gastroduodenales (Marshall & Warren, 1984). El tratamiento de la infección consiste básicamente en la erradicación de la bacteria, motivo por el cual, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, el Consenso de “*Maastricht*” en Europa y el Consenso Canadiense recomiendan la terapia antibiótica (Chey & Wong, 2007; Hunt *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2008; Malfertheiner *et al.*, 2007; Saad & Chey, 2005). Los regímenes de erradicación más utilizados consideran la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos antimicrobianos entre los cuales los más usados actualmente son amoxicilina, claritromicina o metronidazol, sin embargo; debido a la resistencia de *H. pylori* a metronidazol y claritromicina, muchos pacientes que reciben tratamiento con terapias triples fallan en erradicar la infección en un 20 – 30 % (Furuta & Graham, 2010; Gisbert *et al.*, 2008a; Gisbert *et al.*, 2010; Graham & Yamaoka, 2007; Graham *et al.*, 2008; Graham & Fischbach, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Molina-Infante *et al.*, 2010; Rimbara *et al.*, 2011). Varios estudios han reportado tasas de erradicación inferiores a 75% o incluso de 50% en análisis por intención a tratar (ITT) (Gisbert *et al.*, 2007; Nadir *et al.*, 2011). Debido al descenso en la eficacia de las terapias se requiere con urgencia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas más eficientes para la erradicación de la infección. Una alternativa en reemplazo a claritromicina o metronidazol en la terapia triple, es levofloxacin; una fluoroquinolona, isómero de la ofloxacin (Cheng *et al.*, 2010;

Nista *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2006), de amplio espectro antibacteriano, con actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y patógenos respiratorios atípicos (Gisbert *et al.*, 2008a). Su efecto antibacteriano se basa en la inhibición de la ADN girasa (Gisbert & Morena, 2006). La levofloxacin es rápidamente absorbida después de administración oral con una biodisponibilidad de 100% y buena distribución en los tejidos y fluidos corporales. Tiene una vida media de 9 a 16 horas con predominante excreción renal y puede ser administrada en una sola dosis diaria, con poca interacción con otros medicamentos y pocos efectos adversos. Tiene efecto sinérgico con los IBP, potenciando su efecto antimicrobiano. Varios ensayos clínicos aleatorizados han evaluado la eficacia de la levofloxacin como una alternativa válida en reemplazo a los antibióticos de la terapia estándar (claritromicina y metronidazol) (Nista *et al.*, 2003). Resultados favorables han sido confirmados in vivo, indicando que la mayoría de pacientes con resistencia a metronidazol y claritromicina han sido curados con un esquema basado en levofloxacin. La tasa de erradicación por análisis de ITT en ensayos clínicos de este esquema ha sido alta variando entre 87 – 92%, sin embargo estos resultados deben ser evaluados localmente para conocer su eficacia y seguridad (Cheng *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Saad *et al.*, 2006).

La tasa de prevalencia de resistencia de *H. pylori* a metronidazol en Colombia es superior al 70%, razón por la cual su inclusión en los tratamientos de erradicación ha venido en desuso (Henao *et al.*, 2009a). La prevalencia de la resistencia a claritromicina en Colombia varía entre regiones desde 3,8% en el sur del país (Alvarez *et al.*, 2009a; Alvarez *et al.*, 2009b), hasta 13 -15% en la ciudad de Bogotá (Henao *et al.*, 2009b; Trespalacios *et al.*, 2010). Pocos estudios de

eficacia de las terapias triples se han realizado en Colombia, el primero de ellos se condujo en la ciudad de Bogotá en el año 2000, para aquel momento la eficacia de la terapia triple estándar con claritromicina fue de 92%; una disminución se observó en un estudio realizado en la ciudad de Pasto, en el sur del país y publicado en 2009 en donde la eficacia de la terapia (omeprazol, claritromicina, amoxicilina) por análisis de ITT fue de 85% (Fischbach *et al.*, 2009). Sin embargo debido al aumento de la resistencia de *H. pylori* a claritromicina especialmente en Bogotá, es probable que su eficacia haya disminuido en los tiempos actuales. En consecuencia a lo anteriormente expuesto, es importante monitorear la eficacia de la terapia triple estándar con claritromicina en nuestro medio, así como evaluar nuevas alternativas de tratamiento, como la terapia triple basada en levofloxacina, que se postula como una solución de tratamiento en lugares en donde la resistencia a claritromicina es alta (Antos *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2010; Gatta *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2010; Molina-Infante *et al.*, 2010; Nista *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010).

Además de evaluar la eficacia de las terapias de erradicación es importante realizar pruebas para la determinación de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos. La selección de la terapia antimicrobiana en las enfermedades infecciosas se fundamenta en los resultados de pruebas de susceptibilidad; sin embargo el tratamiento de *H. pylori* difiere de la mayoría de infecciones comunes porque el cultivo y las pruebas de susceptibilidad no se realizan; por lo tanto el tratamiento de la infección es empírica (Rimbara *et al.*, 2011); sin embargo la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos es un factor muy importante en el manejo de la infección y la determinación de la resistencia antes de seleccionar la

terapia de erradicación debería ser mandatorio. En Colombia no se realizan cultivos ni pruebas para la determinación de la resistencia, las pruebas convencionales como el E-test o la dilución en agar son técnicas costosas, requieren entrenamiento especial de los profesionales que la realizan y toman alrededor de dos a tres semanas antes de obtener el resultado, lo que no permite que sean implementadas como pruebas de rutina. Recientemente, se ha propuesto que la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacin, pueden ser una buena alternativa para determinar la resistencia de la bacteria a los antimicrobianos utilizados en las terapias triples de erradicación, por estos motivos; el presente trabajo evaluó la eficacia y seguridad de dos terapias en las cuales claritromicina o amoxicilina fueron reemplazadas con levofloxacin; frente a la terapia triple estándar y adicionalmente analizó la influencia de las mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina y levofloxacin con el éxito de estas terapias de erradicación.

5.1 Pacientes y metodología

5.1.1 Diseño del estudio

Para evaluar la eficacia de las terapias se condujo un estudio clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego; siguiendo las recomendaciones de CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) para la calidad de los ensayos clínicos con grupos en paralelo (Moher *et al.*, 2001)

5.1.2 Población estudio

Se incluyeron pacientes con dispepsia funcional o úlceras pépticas con edades entre 19 y 70 años remitidos a endoscopia digestiva alta por síntomas dispépticos, que no hubiesen recibido tratamientos previos de erradicación de *H. pylori* dentro de los tres meses anteriores y que no hubiesen recibido en el mes anterior, medicamentos antisecretores, bismuto o antibióticos. La dispepsia funcional, se clasificó como molestias posprandiales (B1a) o dolor abdominal (B1b), de acuerdo a los criterios del consenso ROMA III (Talley, 2007). Los pacientes fueron incluidos de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

5.1.2.1 Tamaño de la muestra.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó con el programa “tamaño de la muestra 1.0” por el método de aproximación normal por corrección por continuidad bajo los siguientes criterios:

- a. Error tipo I: 5%
- b. Error tipo II: 10%
- c. Proporción en grupo control del 70%
- d. Proporción del grupo experimental del 90%
- e. Tasa de asignación entre grupos de 3

El tamaño de la muestra según los cálculos realizados fue de 75 pacientes por grupo, definiendo los grupos de tratamiento como sigue:

- Esquema 1: Esomeprazol + levofloxacina + amoxicilina
- Esquema 2: Esomeprazol + claritromicina + levofloxacina

- Esquema 3 (terapia estándar): Esomeprazol + claritromicina + amoxicilina

Se incluyó adicionalmente un 10% más de los pacientes en cada grupo, previniendo pérdidas de seguimiento o de adherencia.

5.1.2.2 Criterios de inclusión:

Pacientes con dispepsia funcional con edades entre 19 y 70 años, con infección por *Helicobacter pylori* confirmada por prueba rápida de ureasa, histopatología y cultivo. Solo se incluyeron los pacientes que firmaron el consentimiento informado antes de ingresar al estudio después de una explicación completa y detallada del estudio. El protocolo y el consentimiento informado, fueron aprobados por el comité de ética de la Clínica Fundadores y la Pontificia Universidad Javeriana.

5.1.2.3 Criterios de exclusión:

Se excluyeron del estudio pacientes con alguna de las siguientes enfermedades concomitantes serias: insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), accidente cerebrovascular (ACV), diabetes descompensada, alteraciones de la coagulación, cirrosis, cirugía gástrica previa, mujeres en etapa reproductiva que no estén planificando, embarazadas o que estén lactando, alérgicos a quinolonas, penicilinas o a inhibidores de la bomba de protones (IBPs), enfermedades psiquiátricas, adicción a drogas o alcohol.

5.1.3 Definición de variables:

| VARIABLES DEPENDIENTES | ESCALA DE MEDICIÓN | UNIDAD DE MEDICIÓN |
|------------------------------|--------------------|--|
| Resistencia a claritromicina | Nominal | SI/NO |
| Resistencia a Amoxicilina | Nominal | SI/NO |
| Resistencia a levofloxacina | Nominal | SI/NO |
| Eficacia de los tratamientos | Razón | Proporción de erradicación de <i>Helicobacter pylori</i> |

| VARIABLES INDEPENDIENTES | ESCALA DE MEDICIÓN | UNIDAD DE MEDICIÓN |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| Edad | Razón | Años |
| Genero | Nominal | Hombre/Mujer |
| Lugar de procedencia | Nominal | Ciudad - Departamento |
| Esquema de tratamiento | Nominal | 1, 2 o 3 |

5.1.3. 1 Medidas de desenlace

El punto final ("end point") primario del estudio fue la erradicación de *H. pylori* la cual se determinó mediante la "Prueba Respiratoria de la Urea (UBT)" entre 6 y 8 semanas después del tratamiento. El cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, se evaluó en una entrevista al final del tratamiento y contando los medicamentos contenidos en las cajas retornadas por el paciente para esta entrevista. Se consideró que el tratamiento fue cumplido cuando se tomaron en su totalidad el (100%) los medicamentos prescritos. Al ser incluidos en el estudio, a todos los pacientes, se les entregó información detallada sobre los efectos adversos que pueden presentarse con los diferentes medicamentos. Dos veces durante el tratamiento los pacientes fueron contactados vía telefónica para conocer los efectos adversos presentados durante el tratamiento, los cuales fueron anotados en un cuestionario validado (de Boer *et al.*, 1996) que incluyó

diarrea, sabor metálico, náuseas, sensación de distensión abdominal, pérdida del apetito, vómito, dolor abdominal, dolor en las piernas, estreñimiento y rash. La intensidad de cada síntoma se evaluó utilizando una escala de Likert, con una escala de cero a tres, en donde 0 significa ausencia de síntomas y 3 intensidad severa del síntoma. Los cuestionarios se entregaron a cada paciente en el momento de ingresar al estudio. Los pacientes llenaron diariamente el formulario en las respectivas casillas que evaluaron cada síntoma durante el tratamiento. Esos formularios se entregaron al médico en la entrevista post tratamiento.

5.1.4. Recoleccion, manejo y almacenamiento de datos

5.1.4.1 Aleatorización

Se utilizó una secuencia de números generada en computadora, para distribuir de manera aleatoria a los pacientes para recibir uno de los tres esquemas de tratamiento (1, 2, 3), todos suministrados durante diez días. Los esquemas fueron los siguientes:

- **Esquema 1 (ELA):** Esomeprazol 40 mg en ayunas y antes de la cena + levofloxacina 500 mg después del desayuno y de la cena + amoxicilina 1g después de desayuno y después de la cena.
- **Esquema 2 (ECL):** Esomeprazol 40 mg en ayunas y 40 mg antes de la cena + claritromicina 500 mg después del desayuno y 500 mg después de la cena + levofloxacina 500 mg después del desayuno.

- **Esquema 3 (ECA):** Esomeprazol 40 mg en ayunas y 40 mg antes de la cena + claritromicina 500 mg después del desayuno y después de la cena + amoxicilina 1g después del desayuno y 1g después de la cena.

5.1.5 Procedimiento

5.1.5.1 Determinación de la susceptibilidad fenotípica y genotípica de *H. pylori* a claritromicina, levofloxacina y amoxicilina.

A todos los pacientes que ingresaron al estudio se les determinó la susceptibilidad a los tres antibióticos evaluados en las terapias por la técnica de dilución en agar y por secuenciación directa de productos de PCR de regiones de los genes *gyrA* y 23S rRNA, relacionados con resistencia a claritromicina y levofloxacina. La metodología fue descrita en el capítulo 3.

5.1.5.2 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables en estudio evaluando, mediante test estadísticos, la igualdad de las variables para cada uno de los grupos, para variables categóricas se utilizó chi cuadrado y para las continuas prueba de *t student's* a una significancia del 5%. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico PASW 18.

La eficacia del tratamiento fue evaluada por protocolo (PP) en donde se incluyeron los pacientes que cumplieron el esquema de tratamiento en su totalidad y por intención a tratar (ITT) donde se incluyeron todos los pacientes elegidos independientemente del cumplimiento del protocolo de tratamiento. La evaluación de asociación de las variables predictivas fue realizado mediante un análisis univariado, las variables relacionadas con la presencia de mutación que fueron

significativas en el análisis univariado fueron incluidas en un análisis de regresión logística para determinar la probabilidad de éxito en presencia o ausencia de mutación. Se calcularon IC95% para los factores de asociación obtenidos en el estudio.

5.2 Resultados

5.2.1. Pacientes incluidos en el ensayo clínico

Un total de 240 pacientes incluidos desde abril de 2009 a abril de 2011 fueron aleatorizados para recibir alguna de las tres terapias a evaluar en el estudio. Las características de los grupos de acuerdo a las recomendaciones CONSORT se muestran en la Figura 5.1. El cumplimiento del tratamiento en los pacientes de los grupos 1 y 3 fue del 100% y en el grupo 2 fue de 95%, en este grupo se presentaron pérdidas de seguimiento en dos pacientes por cambio de domicilio y dos por presentar efectos adversos severos.

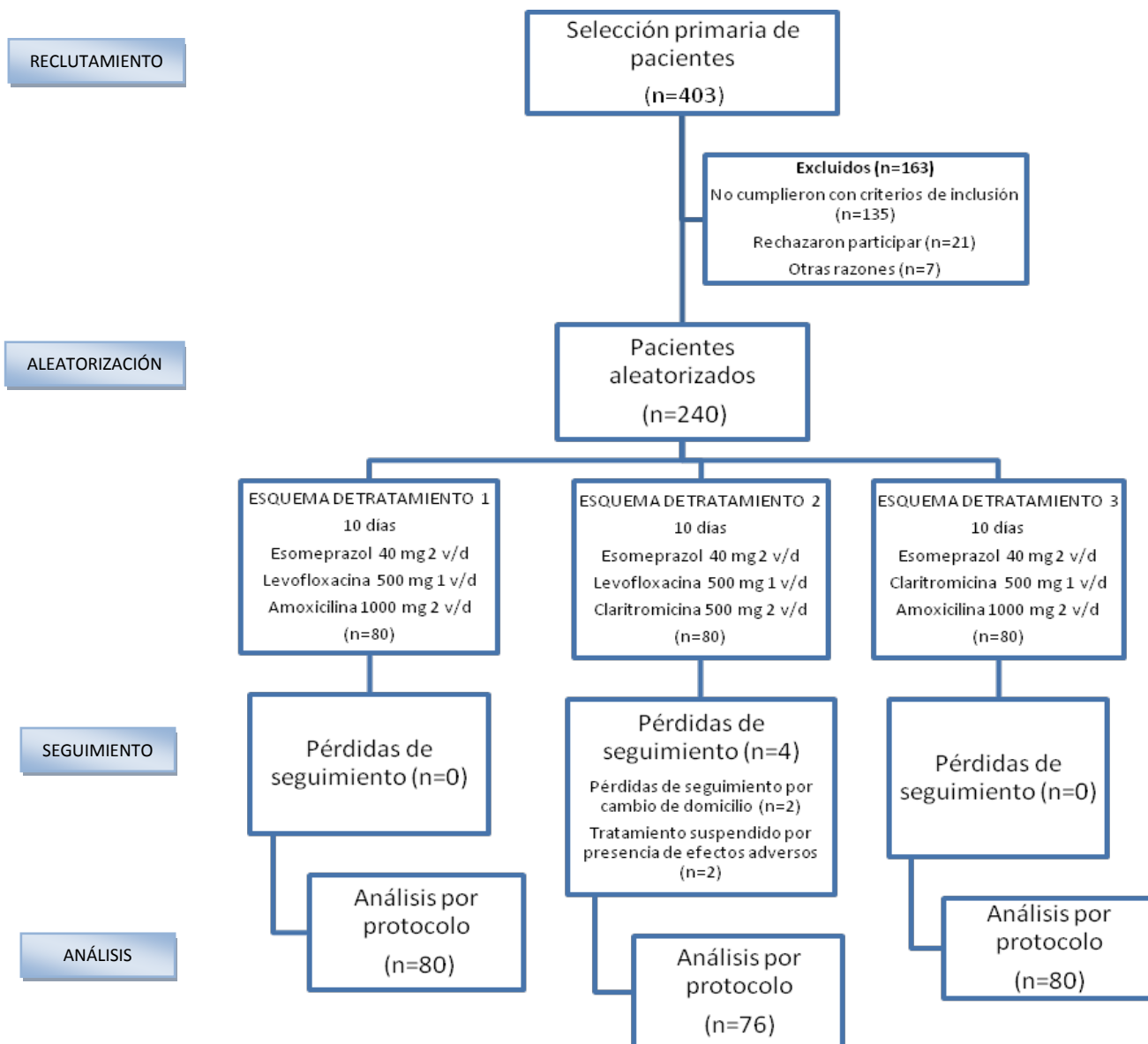


Figura 5.1. Diagrama de flujo según CONSORT del progreso de los pacientes a través de las fases del ensayo clínico

5.2.2. Características demográficas

Los tres grupos tuvieron características comparables en edad, sexo, peso, historia de fumar y antecedentes gastroduodenales. La mayoría de los pacientes fueron originarios de la región andina. Las características completas de los grupos en el estudio se encuentran resumidas en la tabla 5.1.

| Características | Grupos de tratamiento | | | p |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|------|
| | ELA (n=80) | ECL (n=76) | ECA (n=80) | |
| Edad | 47± 12 (21-70) | 46± 11 (21-69) | 45± 11 (21-73) | 0.70 |
| Género Masculino/Femenino | 26/54 | 25/51 | 23/57 | 0.82 |
| Peso (Kg); media rango | 65,6(47-105) | 68,2 (49-120) | 66,7 (65-120) | 0.40 |
| Talla (cm); media rango | 162 (144-177) | 162 (148-179) | 161 (150-180) | 0.84 |
| *Fumador Si/No | 8/62 | 7/61 | 3/63 | |
| Antecedentes | | | | |
| **Enfermedad gastroduodenal Si/No | 57/16 | 53/20 | 49/25 | 0.55 |
| ***Cáncer gástrico Si/No | 27/44 | 26/45 | 28/50 | 0.76 |
| Procedencia | | | | |
| Región andina | 74 | 70 | 76 | 0.73 |
| Región pacífica | 1 | 1 | 3 | |
| Región oriental | 1 | 0 | 0 | |
| Región Caribe | 4 | 4 | 1 | |

*Sólo se obtuvo información de 204 pacientes

**Sólo se obtuvo información de 232 pacientes

***Sólo se obtuvo información de 225 pacientes

Tabla 5.1. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio. No se observaron diferencias significativas en las características demográficas de los individuos incluidos.

5.2.3. Cumplimiento con el tratamiento y eventos adversos.

El cumplimiento en tratamiento para el grupo ECL fue 95%, dos pacientes cambiaron de domicilio y no retornaron a las pruebas de verificación de la erradicación, dos pacientes suspendieron el tratamiento por efectos adversos, uno por diarrea severa y otro presentó alergia y debió ser hospitalizado. Ninguno de estos pacientes regresó para verificar la erradicación de la infección. En los grupos ELA y ECA, todos los pacientes completaron el tratamiento (100% de cumplimiento). Se presentaron eventos adversos en los tres grupos de tratamiento los cuales fueron leves o moderados, sin efectos residuales una vez que terminaron el tratamiento. El sabor metálico fue el efecto adverso más común, seguido por diarrea, dolor abdominal y náusea. La terapia que presentó menor número de efectos adversos fue ELA, en la tabla 5.2, se pueden observar los diversos efectos adversos presentados por los pacientes en cada grupo de tratamiento.

| Efecto adverso | ELA (n=80) | ECL (n=76) | EAC (n=80) |
|---------------------------|------------|------------|------------|
| Dolor abdominal | 10 | 10 | 13 |
| Sabor metálico | 7 | 38 | 31 |
| Diarrea | 11 | 12 | 20 |
| Dolor de cabeza | 10 | 9 | 7 |
| Nausea | 9 | 7 | 12 |
| Vomito | 1 | 1 | 1 |
| Rash | 3 | 2 | 2 |
| Mareo | 11 | 6 | 15 |
| Pérdida de apetito | 3 | 3 | 5 |
| Otros | 15 | 12 | 15 |

Tabla 5.2. Detalle de los efectos adversos observados durante el estudio

5.2.4. Eficacia de las terapias en la erradicación de *H. pylori*: En la tabla 5.3, se encuentra el análisis por protocolo (PP) y por intención tratar (ITT) de la tasa de erradicación en los tres grupos del estudio. De acuerdo al análisis PP, la tasa de éxito en los tres grupos fue similar (ELA: 75%, ECL: 83% y ECA: 71%).

| | ELA (n=80) | | ECL (n=76) | | ECA (n=80) | |
|---------------------------------|------------|-----|------------|-------|------------|-----|
| Tasa de erradicación PP | 60/80 | 75% | 63/76 | 83% | 57/80 | 71% |
| Tasa de erradicación ITT | | | 63/80 | 78,8% | | |
| Efectos adversos | 31/80 | 39% | 29/76 | 38% | 43/80 | 54% |

Tabla 5.3. Proporción de erradicación de *H. pylori* en los sujetos participantes, cumplimiento de las terapias y efectos adversos de cada uno de los grupos en el ensayo clínico. PP: análisis por protocolo. ITT: análisis por intención a tratar.

Para el estudio general así como para los tratamientos individuales se asumió la hipótesis de un éxito terapéutico mayor al 90%. En ninguno de los tratamientos se obtuvo una proporción de éxito superior al 90%, tabla 5.4.

| Tratamiento | Proporción de éxito (IC95%) | P |
|-----------------------|-----------------------------|----|
| ELA (n=80) | 75% (65%- 85%) | NS |
| ECL (n=76) | 83% (74%- 92%) | NS |
| ECA (n=80) | 71% (61%- 82%) | NS |
| Global (n=286) | 76% (71% – 82%) | NS |

Alfa= 0,05

Tabla 5.4. Tasa de erradicación de las terapias ELA (esomeprazol, levofloxacin, amoxicilina), ECL (esomeprazol, claritromicina, levofloxacin) y ECA (esomeprazol, claritromicina, amoxicilina).

5.2.5 Análisis por protocolo de los esquemas de tratamiento

La terapia de primera elección en nuestro medio es la triple terapia estándar compuesta por IBP + claritomicina + amoxicilina. Este tratamiento fue utilizado como tratamiento de referencia para comparar los otros dos esquemas en estudio IBP + claritromicina + levofloxacina e IBP + levofloxacina + amoxicilina. En este estudio se esperaba que las terapias propuestas como alternativas tuvieran una proporción de falla inferior a la de la terapia estándar. En la evaluación de la eficacia del tratamiento ECL vs terapia clásica (ECA), se encontró una diferencia de 12% en la tasa de erradicación por análisis PP, sin embargo este tratamiento en análisis por ITT a tratar solo fue superior a la terapia estándar en un 7 %, con un riesgo relativo de 0,59. El número necesario a tratar (NNT) con esta terapia es de 9 pacientes para obtener un éxito terapéutico.

A continuación se presentan los resultados del desenlace de la terapia ECL comparado con la terapia estándar.

| Tratamiento | Desenlace | | (n) total |
|-------------|-----------|-------|-----------|
| | Falla | Éxito | |
| ECL | 13 | 63 | 76 |
| ECA | 23 | 57 | 80 |

Riesgo Relativo (RR) 0,59 (IC95% 0,32 – 1,08)
NNT = 9

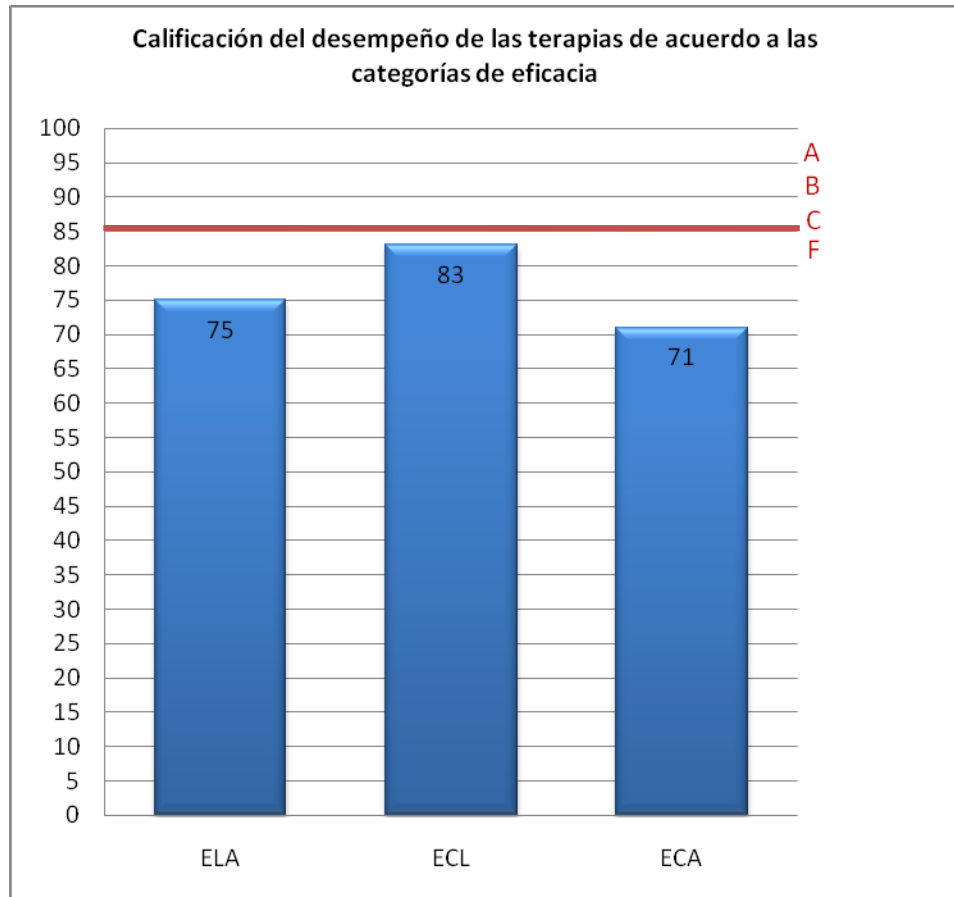
La terapia ELA fue superior solo en 4% frente a la terapia estándar (ECA) por PP, con un riesgo relativo de 0,86. El NNT con esta terapia es de 27 pacientes para obtener un éxito terapéutico. A continuación se presentan los resultados del desenlace de la terapia ELA comparado con la terapia estándar.

| Tratamiento | Desenlace final | | (n) total |
|-------------|-----------------|-------|-----------|
| | Falla | Éxito | |
| ELA | 20 | 60 | 80 |
| ECA | 23 | 57 | 80 |

Riesgo Relativo (RR) = 0,86 (IC95% 0,52 – 1,45)
NNT = 27

5.2.6. Calificación del desempeño de las terapias de acuerdo a las categorías de eficacia para las terapias de erradicación de *H. pylori*.

De acuerdo a los criterios establecidos por Graham *et al*, para clasificar los estudios clínicos en categorías de eficacia por análisis por PP o por ITT, se busca que solo los tratamientos con calificación A o B sean utilizados de manera empírica como terapia de erradicación. En el análisis por PP, las categorías son las siguientes: A o excelente (≥ 95), B o buena (90 – 94%); C o regular (86 – 89%) y F o inaceptable ($\leq 85\%$), la categoría D no se contempla en el análisis por PP (Graham *et al.*, 2007). De acuerdo a este criterio las tres terapias evaluadas en este trabajo se clasifican en la escala F ($\leq 85\%$), por lo tanto su uso de manera empírica es inaceptable. A continuación en la gráfica 5.1, se observa la clasificación de las terapias de acuerdo a este criterio de clasificación.



Gráfica 5.1. Clasificación de las terapias ELA, ECL y ECA de acuerdo a los criterios de calidad de de las terapias de erradicación para *H. pylori*. Todas las terapias se ubican por debajo del 85% de eficacia, lo que las ubica en la categoría F o inaceptables.

5.2.7. Análisis de la falla terapéutica y su relación con la resistencia genotípica y fenotípica a claritromicina y levofloxacin en las terapias evaluadas.

La resistencia global a amoxicilina en el grupo de estudio fue de 2,1% (5/236). En el grupo ELA hubo tres pacientes con aislamientos resistentes amoxicilina y los otros dos pacientes estuvieron en el grupo ECL. No hubo ningún paciente con *H. pylori* resistente a amoxicilina en el grupo ECA. A continuación se describe la falla terapéutica en cada uno de los grupos de tratamiento y la influencia de la resistencia a claritromicina, levofloxacin y amoxicilina en el fracaso terapéutico.

En el grupo de pacientes que recibieron la terapia EAL, la presencia de mutaciones en *gyrA*, se asoció con bajas tasas de erradicación, solo el 7,7% (1/13) de los pacientes con cepas con mutaciones en *gyrA* tuvieron erradicación de la infección, la tasa de erradicación en las cepas sin mutaciones en este gen fue de 88% (59/67). Cuando se analizó el éxito terapéutico de acuerdo a los resultados de las pruebas fenotípicas por dilución en agar, se observó que el 7,1% (1/14) cepas resistentes y el 89,3% (59/66) de las cepas susceptibles fueron erradicadas. En general los resultados de las pruebas fenotípicas con las pruebas genotípicas tuvieron un buen acuerdo. En este grupo hubo tres pacientes infectados con cepas resistentes a amoxicilina, pero susceptibles a levofloxacin, en los tres pacientes la infección se erradicó; en las cepas que fueron susceptibles a amoxicilina la infección se erradicó en 93,5% (72/77) de los casos. Adicionalmente; de manera global en el tratamiento ELA la proporción de falla fue

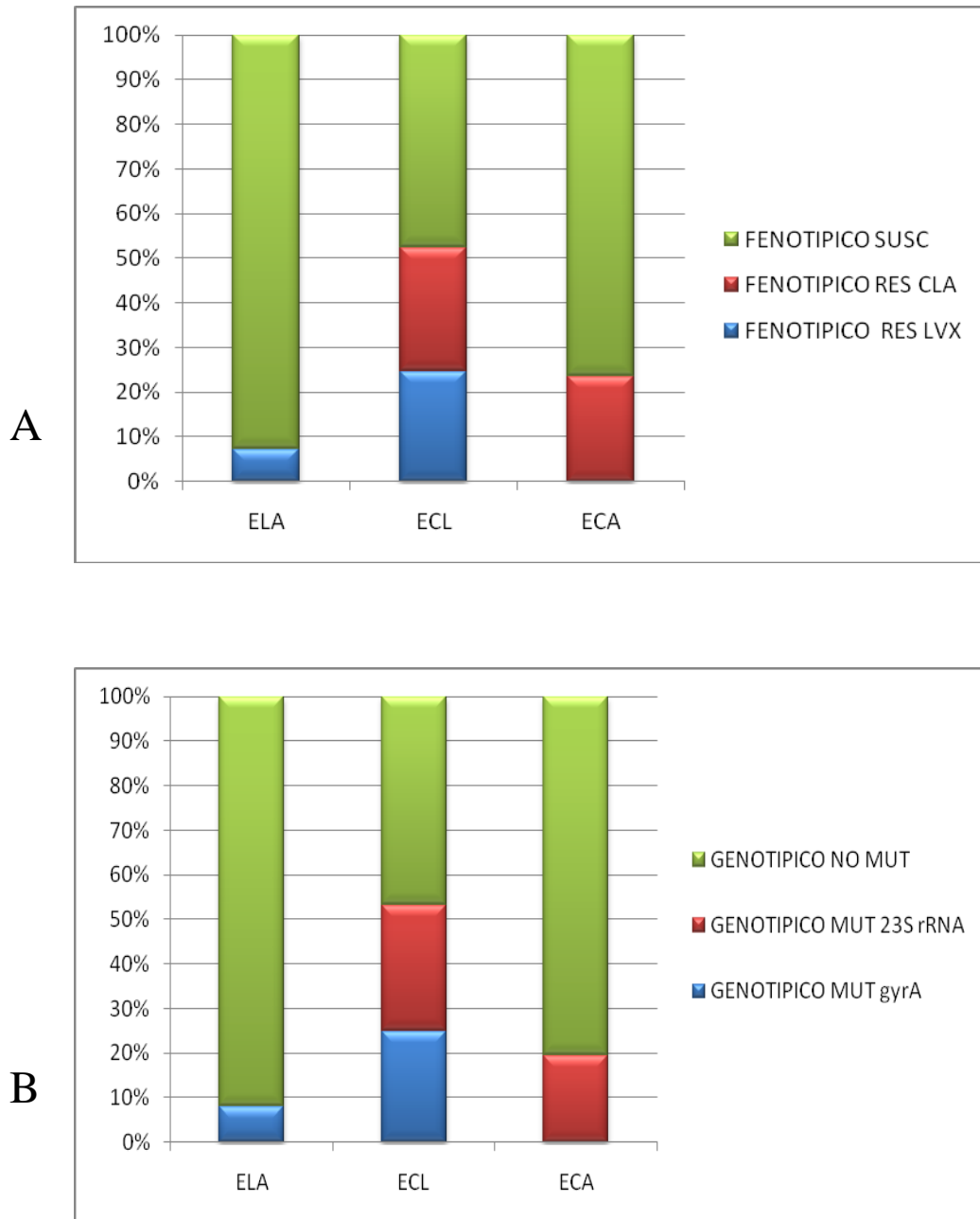
de 25% (20/80), de las cuales el 60% (12/20) son explicadas principalmente por las mutaciones D91G y N87I en el gen *gyrA*.

En la terapia ECL, se observó la influencia de la resistencia a claritromicina o levofloxacina en la tasa de erradicación de la infección. En las cepas con presencia de mutaciones en *gyrA* la tasa de erradicación fue 50% (7/14) y 57% (4/7) para las cepas con mutaciones en 23S rRNA. La tasa de éxito entre las cepas resistentes a levofloxacina por dilución en agar fue 50% (7/14) y 55,5% (5/9) en las cepas resistentes a claritromicina. Se observó erradicación de una cepa con mutación A2143G y N87I, que presentaba resistencia fenotípica a levofloxacina (4 µg/ml) y susceptibilidad fenotípica a claritromicina (0,25 µg/ml). En las cepas que no presentaron mutación en los genes *gyrA* y 23S rRNA; la tasa de erradicación fue de 94,5% (52/55), la erradicación en el fenotipo de susceptibles a claritromicina y levofloxacina fue de 96,2% (51/53). En el análisis global del fracaso terapéutico en esta terapia, la falla fue de 17,1% (13/76), de las cuales el 23% (3/13) son explicadas por la mutación A2143G en el gen 23S rRNA y el 53,8% (7/13) son explicadas por las mutaciones D91G, N87I y N87K en el gen *gyrA*.

Para la terapia triple estándar ECA, se observó que la presencia de mutación en el gen 23S rRNA, influye negativamente en el éxito terapéutico, ya que solo el 21% (4/19) de las cepas con mutación en el gen fueron erradicadas. En este grupo se presentó una cepa con mutación A2142C, que fue erradicada con la terapia, las cepas con mutación A2142G presentaron falla en la

erradicación y el 18,8% (3/16) de las cepas con mutación A2143G fueron erradicadas. Se encontró éxito en la erradicación en 27,2% (6/22) de las cepas con resistencia fenotípica a claritromicina. Dentro de las cepas sin mutación en el gen 23S rRNA la tasa de erradicación fue 86,8% (53/61) y en las cepas con susceptibilidad fenotípica a claritromicina la tasa de éxito fue 87,9 % (51/58). En este grupo no hubo ninguna cepa resistente a amoxicilina y el éxito de erradicación entre cepas susceptibles a este antibiótico fue 92,5% (74/80). En el análisis global de la falla terapéutica para el tratamiento ECA la proporción de falla fue de 29% (23/80), de las cuales el 65% (15/23) son explicadas por mutaciones A2143G y A2142G.

En resumen los resultados muestran que la resistencia a levofloxacina o la presencia de mutación en el gen *gyrA* se relacionan con bajo éxito en la terapia ELA; 7,1% y 7,7% respectivamente. La resistencia a levofloxacina y la presencia de mutación en *gyrA* se relaciona con un éxito en la erradicación del 50% en la terapia ECL. Para esta misma terapia la resistencia a claritromicina y la presencia de mutación en el gen 23S rRNA muestran un éxito de 55,5 y 57% respectivamente. Finalmente la terapia ECA logro erradicar el 27 % de las cepas resistentes a claritromicina y el 21% de las cepas con mutación en el gen 23S rRNA. El resumen de estos resultados se observan en la gráfica 5.2.



Gráfica 5.2 Proporción de éxito terapéutico en cada terapia. (A) Efecto de la resistencia a claritromicina o levofloxacin en éxito terapéutico. (B) Efecto de las mutaciones en 23S rRNA o *gyrA* con el éxito terapéutico.

5.2.8. Determinación del riesgo relativo de fallar por efecto de resistencia o presencia de mutaciones.

Además del efecto de la resistencia y las mutaciones en la disminución de la tasa de erradicación, se determinó la relación entre la presencia de mutaciones y el riesgo de falla terapéutica. El riesgo relativo (RR) de falla por mutaciones en *gyrA* con la terapia ELA fue de 7,7 y en la terapia ECL de 5. El riesgo relativo de falla por mutaciones en 23S rRNA en la terapia ECA fue 6 y 2,9 en la terapia ECL. La presencia de mutaciones en *gyrA* y 23S rRNA en la terapia ECL es de 14, tabla 5.5.

| Tratamiento | Mutación | | RR (IC95%) |
|---------------------------|----------|----|-------------------|
| | SI | NO | |
| ELA % Falla (20/80) | 12 | 8 | 7,7 (3,96 – 15,1) |
| *ECL % Falla (13/76) | 7 | 6 | 5,0 (2,1 – 13) |
| **ECL % Falla (13/76) | 3 | 10 | 14,7 (4,7 – 46,7) |
| ***ECL % Falla (13/76) | 10 | 3 | 2,9 (1,1 - 8,3) |
| ECA % Falla (23/80) | 15 | 8 | 6,0 (3 - 12) |

Tabla 5.5. Riesgo relativo de falla en la terapia por causa de mutaciones en 23S rRNA o *gyrA*. ELA: riesgo relativo de falla por la presencia de mutaciones en el gen *gyrA*. *ECL: riesgo relativo de falla por mutaciones en *gyrA*. **ECL: riesgo relativo de falla por mutaciones en 23S rRNA. ***ECL: riesgo relativo de falla por doble mutación en *gyrA* y 23S rRNA. ECL: riesgo relativo de falla por mutaciones en 23S rRNA

El riesgo relativo de fallar por causa de resistencia fenotípica a los antibióticos en cada grupo de terapia fue:

- RR de 8,7 en la terapia ELA por causa de resistencia a levofloxacin
- RR de 5,1 en la terapia ECL por causa de resistencia a levofloxacin y RR de 3,3 por efecto de resistencia a claritromicina
- RR de 6 en la terapia ECA cuando hay resistencia a claritromicina

5.2.9. Análisis de regresión logística:

Se realizó un modelo de regresión logística para estimar la probabilidad de éxito terapéutico. Las variables asociadas al modelo fueron la presencia de mutación A2143G, N87I, D91G, obteniéndose una probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que no presentan ninguna mutación de un 98% y probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que tienen todas las mutaciones solo de 13%

El modelo propuesto es el siguiente:

(p) = Probabilidad de éxito terapéutico

$$\text{Logit}(p) = 4.168 - 2.46(x) - 2.26(y) - 1.26(z)$$

1. En este modelo se asume la probabilidad de éxito en un paciente que presenta todas las mutaciones, donde x, y, z son iguales a 1

$$\text{Logit}(p) = 4.168 - 2.46(1) - 2.26(1) - 1.26(1)$$

$$\text{Logit}(p) = -1.81$$

$$\text{Logit}(p) = \ln(\text{odds}) = -1.81$$

$$e^{-1.81} = 0.16$$

$$p = 0.16 / (1 + 0.16) = 13\%$$

La probabilidad de éxito terapéutico en un paciente que presenta todas las mutaciones es del 13%

2. En este modelo se asume la probabilidad de éxito en un paciente que no presenta ninguna mutación, donde x , y , z son iguales a 0

$$\text{Logit}(p) = 4.168 - 2.46(0) - 2.26(0) - 1.26(0)$$

$$\text{Logit}(p) = -4.168$$

$$\text{Logit}(p) = \ln(\text{odds}) = 4.168$$

$$E^{4.168} = 64.5$$

$$p = 64.5 / (1 + 64.5) = 98\%$$

La probabilidad de éxito terapéutico en un paciente que no presenta ninguna mutación es del 98%

De la misma manera se puede calcular la probabilidad de éxito dado que presente una u otra mutación. Esta regresión se realizó para las mutaciones más frecuentes encontradas en aislamientos colombianos de *H. pylori*, sin embargo la regresión debe ser adaptada localmente de acuerdo al patrón de mutaciones de cada región.

5. 4 Discusión

En el presente ensayo clínico aleatorizado utilizando medicamentos originales se ha encontrado que la triple terapia estándar (IBP + amoxicilina + claritromicina) tuvo una eficacia de 71% (IC95% 65-85%), la cual fue estadísticamente similar a las otras dos terapias triples que incluyeron levofloxacin en reemplazo de claritromicina o amoxicilina, con tasas de erradicación de 75 y 83% respectivamente. No hubo pérdidas en el seguimiento excepto en el grupo 2 (ECL), en el cual dos pacientes cambiaron de domicilio y otros dos suspendieron el tratamiento uno de ellos por diarrea severa y el otro por alergia, ninguna de las cuatro personas acudió a las pruebas de verificación de la erradicación. Por lo tanto los resultados finales tanto por ITT como por PP son similares. Si bien los mejores resultados se obtuvieron con la combinación esomeprazol + claritromicina + levofloxacin (ECL) (83%), comparada con la triple terapia estándar (ECA) no hubo diferencia estadísticamente significativa. Los resultados con la triple terapia estándar del presente estudio, contrastan claramente con los encontrados hace más de una década por investigadores colombianos, cuyas tasas de éxito oscilaron entre 87 y 92% utilizando como IBP pantoprazol o lansoprazol respectivamente (Gutierrez *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 2000). Este dramático descenso en la eficacia, probablemente está relacionado con la alta resistencia actual a la claritromicina, la cual de manera consistente se ha encontrado por encima de 15% en diversos trabajos realizados en nuestro medio (Henaó *et al.*, 2009a; Henaó *et al.*, 2009b; Trespalacios *et al.*, 2010) y que en el presente estudio globalmente fue de 13.6%, sin embargo la resistencia en el presente estudio se

realizó mediante dilución en agar que es el estándar de oro para este antibiótico y en los estudios previos se hizo con la prueba de E-test, la cual puede tener falsos positivos (Avila *et al.*, 2009). Aún así, el nivel de resistencia sigue siendo lo suficientemente alto para comprometer la eficacia final. El éxito del 71% de este esquema en nuestro medio, es similar a lo que se ha encontrado en la última década en diversas partes del mundo que oscila entre 53 y 73% para tratamientos de siete días a 67-79% en tratamientos de 10 días (Vakil & Megraud, 2007). La tasa de éxito de esta terapia está por debajo del 95% que es el umbral considerado excelente y aún más, por debajo del 80%, lo que la ubica como una terapia inaceptable para ser utilizada de manera empírica en tratamientos de primera línea (Graham *et al.*, 2007) y por lo tanto no se justifica seguirla utilizando.

Llama poderosamente la atención que en el 65% de las fallas terapéuticas en la terapia ECA son explicadas por resistencia a la claritromicina, destacando que aunque el microorganismo fuera sensible a la misma, en el 12,5 % la terapia no funcionó, lo cual plantea que además de la resistencia al antibiótico pueden estar subyacentes otras causas responsables del fracaso como por ejemplo el polimorfismo de metabolizador rápido del IBP en el sistema enzimático CYP2C19 que al estar presente, disminuye la capacidad para inhibir la producción de ácido y esto origina una clara menor eficacia del esquema aunque el microorganismo sea susceptible a los antibióticos utilizados (Furuta & Graham, 2010). Si bien el nivel de resistencia a la amoxicilina fue muy bajo (2.1%) como sucede en otras partes del mundo, este factor no se considera un factor que interfiera con la eficacia de los esquemas que la contienen (Furuta & Graham, 2010), en este estudio los resultados comprueban las consideraciones de los Drs. Furuta y Graham, al

encontrar que todos los pacientes con cepas resistentes a amoxicilina erradicaron la infección exitosamente, así que en otras palabras las causas de falla relacionadas a amoxicilina pueden depender del grado de la inhibición de la secreción de ácido, que influye en el desempeño de este antibiótico que es particularmente lábil a pH ácido (Furuta & Graham, 2010). Adicionalmente; se ha encontrado que la dosificación de dos veces al día, no permite mantener niveles sanguíneos que provean una adecuada concentración mínima inhibitoria, como si se lograría utilizando tres o cuatro dosis al día (Furuta & Graham, 2010). Estas consideraciones teóricas plantean la necesidad de investigarlas en un futuro ensayo clínico, en donde la dosificación y efecto de inhibición del pH ácido puedan ser analizadas. Si bien en el presente trabajo no tenemos los datos sobre el polimorfismo del CYP2C19, a todos los pacientes se les tomó muestra de sangre y se cuenta con el ADN obtenido de células mononucleares sanguíneas para llevar a cabo esta investigación en un futuro próximo, de acuerdo a un protocolo específico para tal fin.

Con el esquema IBP + levofloxacina + amoxicilina, la tasa de erradicación fue de 75%, inferior al 83% encontrado en España por el grupo de Gisbert *et al*, (Gisbert *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2008b) pero similar al encontrado (74%) por Castro-Fernández también de España (Castro-Fernandez *et al.*, 2009) Lamentablemente en ninguno de los dos trabajos, se investigó la resistencia a levofloxacina, que en nuestro trabajo fue del 15,6% y que como lo demuestra este estudio tiene un fuerte impacto en la falla terapéutica, ya que cuando una cepa es resistente a levofloxacina o tiene mutaciones en el gen *gyrA* la posibilidad de éxito en la terapia es tan solo de 7,1 a 7,7%; esto explica la baja tasa de erradicación

encontrada con dicha terapia en este estudio. Un trabajo similar a este, realizado en Taiwán, comparó de manera aleatorizada la triple terapia estándar con la triple terapia con levofloxacina, la tasa de erradicación fue de 74% con una prevalencia de resistencia a levofloxacina menor a 10% (Liou *et al.*, 2010). En este estudio en el 60% de los pacientes que tuvieron falla terapéutica, había resistencia a levofloxacina y sorprendentemente en el 40% restante, el microorganismo era sensible a este antibiótico. Se ignoran las causas de este comportamiento, sin embargo nuevamente, las dosis de amoxicilina dos veces al día que como hemos discutido podrían no dar suficientes niveles séricos constantes, así como el desconocimiento del metabolismo del IBP (Furuta & Graham, 2010) de manera plausible pudieran explicar al menos parcialmente los hallazgos. La dosis de 500 mg de levofloxacina una vez al día, utilizada por nosotros, sería una dosis adecuada si se tiene en cuenta que en terapias de rescate en estudios previos han demostrado que es similar en eficacia a 500 mg dos veces al día (Cheng *et al.*, 2007) y en contraste con nuestro estudio, investigadores italianos encontraron que la combinación que discutimos tuvo un éxito de 90% utilizando 250 mg de levofloxacina dos veces al día, amoxicilina 1 gr dos veces al día y la mitad de la dosis de esomeprazol utilizada por nosotros (Rispo *et al.*, 2007). En dicho trabajo tampoco se investigó la tasa de resistencia levofloxacina.

La tasa de eficacia del esquema IBP, claritromicina y levofloxacina tuvo una tasa de éxito del 83% (IC 95% 74-92%), la más alta de las tres terapias, lo cual es sorprendente si se tiene en cuenta que se están utilizando dos antibióticos para los cuales la prevalencia de resistencia es 14 y 15% respectivamente. Este hallazgo es similar al encontrado por Nista *et al.*, quienes encontraron una tasa de

éxito de 87% utilizando el mismo esquema, excepto menor dosis de Esomeprazol (Nista *et al.*, 2006). La mayor eficacia de esta combinación podría reforzar nuestra impresión previa sobre la influencia de la amoxicilina cuando se da en solo dos dosis al día, o que la claritromicina y la levofloxacin, pudieran tener un efecto sinérgico. Sin embargo, recientemente Gisbert *et al.*, encontraron que esta terapia tenía una eficacia de 73% (Gisbert *et al.*, 2010) cuando fue utilizada como terapia de primera línea en pacientes alérgicos a la penicilina, aunque en ese trabajo, no examinaron la tasa de resistencia a levofloxacin.

Este es el primer estudio aleatorizado, ciego, que se realiza en Colombia, que realiza pruebas de resistencia antimicrobiana pre tratamiento, como lo recomiendan los expertos, para comparar la triple terapia estándar con dos terapias triples con levofloxacin, demostró que en la actualidad la triple terapia estándar, la terapia más frecuentemente utilizada en nuestro medio, al igual que en otros países; ha disminuido notablemente su eficacia con una tasa de éxito por debajo del nivel recomendado para ser utilizada como terapia de primera línea (Rimbara *et al.*, 2011). De igual manera, las terapias triples con levofloxacin, son inferiores al 95% y como tal no constituyen alternativas de primera línea en nuestro medio. La resistencia a levofloxacin investigada por primera vez en nuestro medio, está aumentando de manera progresiva alcanzando en el presente estudio 15%, lo cual podría explicar su bajo rendimiento si se compara con los estudios iniciales realizados en otros países años antes, cuando la eficacia promedio era del 90%.

En este estudio la resistencia genotípica de las cepas de *H. pylori* a levofloxacin y claritromicina está asociada con el desenlace terapéutico. Nuestros

resultados demuestran que ninguna de las pruebas para evaluar la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos tiene una correlación perfecta con el desenlace en la erradicación de la infección, aquí se encontró muy buena correlación entre la resistencia fenotípica y genotípica a levofloxacina, pero este comportamiento no fue igual cuando se analizó la resistencia a claritromicina; en donde en un grupo de cepas las pruebas fenotípicas tuvieron mejor capacidad en predecir la falla terapéutica. Una explicación a esta situación puede ser la presencia de mecanismos diferentes a mutaciones en el gen 23S rRNA en las cepas con fenotipo resistente, en estos casos las bombas de expulsión o mecanismos de resistencia mediados por porinas pueden generar la diferencia. El otro caso en donde no se pudo predecir la falla fue cuando la cepa tiene resistencia genotípica y se tiene éxito en la terapia, la posible explicación es la presencia de heterorresistencia, en donde existe una mezcla de cepas susceptibles con resistentes y la terapia logra eliminar las resistentes, sin embargo desde el punto de vista práctico si las pruebas genotípicas se utilizan para predecir la falla terapéutica, estas pruebas generaran datos erróneos cuando la resistencia es mediada por mecanismos diferentes a mutaciones en el gen 23S rRNA, que en nuestro estudio ocurrió en el 17% de las cepas. Aunque existen diferencias en la predicción de la falla de acuerdo al método utilizado, es importante resaltar que los riesgos relativos de fallar son altos cuando mutaciones en *gyrA* o 23S rRNA están presentes, en especial con las mutaciones N87I, D91G y A2143G, de acuerdo a ello en este estudio se realizó un modelo de regresión logística para estimar la probabilidad de éxito terapéutico cuando están presentes estas mutaciones, de acuerdo a este modelo la probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que no

presentan ninguna mutación es de 98% y probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que tienen todas las mutaciones es solo de 13%. De acuerdo a los resultados de este estudio, las pruebas genotípicas para la determinación de resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina pueden ser una guía apropiada para la selección de la terapia de erradicación de *H. pylori*, en especial en lugares en donde el cultivo y las pruebas de susceptibilidad no se realizan.

En conclusión, la terapia esomeprazol + levofloxacina + amoxicilina y esomeprazol + levofloxacina + claritromicina durante 10 días no son más eficaces que la terapia triple estándar con claritromicina. La eficacia de las tres terapias fue inferior a 85% por análisis por protocolo, lo cual las clasifica como inaceptables y las inhabilita para ser formuladas de manera empírica. Las pruebas de susceptibilidad deben realizarse antes de seleccionar la terapia de erradicación. Se necesita seguir investigando de manera urgente otros esquemas terapéuticos en nuestra población teniendo en cuenta la alta prevalencia de la infección y la creciente resistencia del microorganismo a los antibióticos utilizados en la primera línea de tratamiento.

FINANCIACION

El presente trabajo fue financiado por Colciencias, como parte del proyecto “Erradicación de *Helicobacter pylori*: triple terapia con levofloxacina”. Código 1203-408-20464.

Referencias

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Corredor, L. F., Reinoso, E., Martinez, J. W. & Beltran, L. (2009a). [Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Colombia]. *Rev Med Chil* 137, 1309-1314.

Alvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F. & Reinoso, E. (2009b). Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4022-4024.

Antos, D., Schneider-Brachert, W., Bastlein, E. & other authors (2006). 7-day triple therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and high-dose esomeprazole in patients with known antimicrobial sensitivity. *Helicobacter* 11, 39-45.

Avila, J. M., Rey, M., Mercado, M. M., Villamizar, O. R., Otero, W. & Trespacios, A. A. (2009). Comparación de las pruebas de dilución en agar y PCR para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. *Revisión Sistemática de la literatura. Rev Col Gastroenterol* 24, 116 - 127.

Castro-Fernandez, M., Lamas, E., Perez-Pastor, A., Pabon, M., Aparcero, R., Vargas-Romero, J., Larraona, J. L. & Romero-Gomez, M. (2009). Efficacy of triple therapy with a proton pump inhibitor, levofloxacin, and amoxicillin as first-line treatment to eradicate *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* 101, 395-398, 399-402.

Cheng, H., Hu, F. L., Zhang, G. X. & other authors (2010). [Levofloxacin-based triple therapy for first-line *Helicobacter pylori* eradication treatment: a multi-central, randomized, controlled clinical study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90, 79-82.

Cheng, H. C., Chang, W. L., Chen, W. Y., Yang, H. B., Wu, J. J. & Sheu, B. S. (2007). Levofloxacin-containing triple therapy to eradicate the persistent *H. pylori* after a failed conventional triple therapy. *Helicobacter* 12, 359-363.

Chey, W. D. & Wong, B. C. (2007). American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 102, 1808-1825.

de Boer, W. A., Thys, J. C., Borody, T. J., Graham, D. Y., O'Morain, C. & Tytgat, G. N. (1996). Proposal for use of a standard side effect scoring system in studies exploring *Helicobacter pylori* treatment regimens. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8, 641-643.

Drossman, D. A. (2006). Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 7, 181-185.

Fischbach, L. A., Bravo, L. E., Zarama, G. R. & other authors (2009). A randomized clinical trial to determine the efficacy of regimens containing clarithromycin, metronidazole, and amoxicillin among histologic subgroups for *Helicobacter pylori* eradication in a developing country. *Helicobacter* 14, 100-108.

Furuta, T. & Graham, D. Y. (2010). Pharmacologic aspects of eradication therapy for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterol Clin North Am* 39, 465-480.

Gatta, L., Zullo, A., Perna, F. & other authors (2005). A 10-day levofloxacin-based triple therapy in patients who have failed two eradication courses. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 45-49.

Gisbert, J. P. & Morena, F. (2006). Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 35-44.

Gisbert, J. P., Gisbert, J. L., Marcos, S., Moreno-Otero, R. & Pajares, J. M. (2007). Levofloxacin- vs. ranitidine bismuth citrate-containing therapy after *H. pylori* treatment failure. *Helicobacter* 12, 68-73.

Gisbert, J. P., Bermejo, F., Castro-Fernandez, M. & other authors (2008a). Second-line rescue therapy with levofloxacin after *H. pylori* treatment failure: a Spanish multicenter study of 300 patients. *Am J Gastroenterol* 103, 71-76.

Gisbert, J. P., Gisbert, J. L., Marcos, S., Jimenez-Alonso, I., Moreno-Otero, R. & Pajares, J. M. (2008b). Empirical rescue therapy after *Helicobacter pylori* treatment failure: a 10-year single-centre study of 500 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 346-354.

Gisbert, J. P., Perez-Aisa, A., Castro-Fernandez, M., Barrio, J., Rodrigo, L., Cosme, A., Gisbert, J. L., Marcos, S. & Moreno-Otero, R. (2010). *Helicobacter pylori* first-line treatment and rescue option containing levofloxacin in patients allergic to penicillin. *Dig Liver Dis* 42, 287-290.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2007). A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* 12, 275-278.

Graham, D. Y. & Yamaoka, Y. (2007). One- or two-week triple therapy for *Helicobacter pylori*: questions of efficacy and inclusion of a dual therapy treatment arm. *Gut* 56, 1021-1023; author reply 1022-1023.

Graham, D. Y., Lu, H. & Yamaoka, Y. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. *Drugs* 68, 725-736.

Graham, D. Y. & Fischbach, L. (2010). Helicobacter pylori treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut 59, 1143-1153.

Gutierrez, O., Otero, O., Melo, M. & other authors (1996). Helicobacter pylori eradication: Duodenal ulcer vs Functional dyspepsia. Gastroenterology 110, A258.

Henao, S. C., Otero, W., Angel, L. A. & Martinez, J. D. (2009a). Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de Helicobacter pylori en pacientes adultos de Bogotá, Colombia. Rev Col Gastroenterol 24, 10 - 16.

Henao, S. C., Quiroga, A., Martinez, J. D. & Otero, W. (2009b). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de Helicobacter pylori. Rev Col Gastroenterol 24 110 -114.

Hunt, R., Fallone, C., Veldhuyzan van Zanten, S., Sherman, P., Smaill, F., Flook, N. & Thomson, A. (2004). Canadian Helicobacter Study Group Consensus Conference: Update on the management of Helicobacter pylori--an evidence-based evaluation of six topics relevant to clinical outcomes in patients evaluated for H pylori infection. Can J Gastroenterol 18, 547-554.

Kodama, M., Murakami, K., Okimoto, T. & Fujioka, T. (2008). [Guidelines for the management of Helicobacter pylori--Maastricht III-2005 and Japanese guidelines]. Nippon Rinsho 66, 804-810.

Kuo, C. H., Hu, H. M., Kuo, F. C. & other authors (2009). Efficacy of levofloxacin-based rescue therapy for Helicobacter pylori infection after standard triple therapy: a randomized controlled trial. J Antimicrob Chemother 63, 1017-1024.

Liou, J. M., Lin, J. T., Chang, C. Y. & other authors (2010). Levofloxacin-based and clarithromycin-based triple therapies as first-line and second-line treatments for Helicobacter pylori infection: a randomised comparative trial with crossover design. Gut 59, 572-578.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. & other authors (2007). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 56, 772-781.

Marshall, B. J. & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1, 1311-1315.

Moher, D., Schulz, K. F. & Altman, D. G. (2001). The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. Ann Intern Med 134, 657-662.

Molina-Infante, J., Perez-Gallardo, B., Fernandez-Bermejo, M. & other authors (2010). Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 31, 1077-1084.

Nadir, I., Yonem, O., Ozin, Y., Kilic, Z. M. & Sezgin, O. (2011). Comparison of two different treatment protocols in *Helicobacter pylori* eradication. *South Med J* 104, 102-105.

Nista, E. C., Candelli, M., Cremonini, F. & other authors (2003). Levofloxacin-based triple therapy vs. quadruple therapy in second-line *Helicobacter pylori* treatment: a randomized trial. *Aliment Pharmacol Ther* 18, 627-633.

Nista, E. C., Candelli, M., Zocco, M. A. & other authors (2006). Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 101, 1985-1990.

Otero, O., Gutierrez, O., Quintero, F., Orozco, C. & Ibañez, M. (2000). Eficacia de pantoprazol con claritromicina y amoxicilina para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera duodenal o dispepsia no ulcerosa. *Rev Col Gastroenterol* 15, 247 - 251.

Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 79-88.

Rispo, A., Di Girolamo, E., Cozzolino, A., Bozzi, R., Morante, A. & Pasquale, L. (2007). Levofloxacin in first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 12, 364-365.

Saad, R. & Chey, W. D. (2005). A clinician's guide to managing *Helicobacter pylori* infection. *Cleve Clin J Med* 72, 109-110, 112-103, 117-108 passim.

Saad, R. J., Schoenfeld, P., Kim, H. M. & Chey, W. D. (2006). Levofloxacin-based triple therapy versus bismuth-based quadruple therapy for persistent *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 101, 488-496.

Suzuki, H., Nishizawa, T. & Hibi, T. (2010). *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol* 5, 639-648.

Talley, N. J. (2007). Functional gastrointestinal disorders in 2007 and Rome III: something new, something borrowed, something objective. *Rev Gastroenterol Disord* 7, 97-105.

Trespacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* 21, 31 - 38.

Vakil, N. & Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133, 985-1001.

ANEXO 1

Erradicación de *Helicobacter pylori*: Triple terapia con levofloxacina.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado paciente:

Usted ha sido enviado por su médico tratante para realizarle una endoscopia de vías digestivas altas, la cual será realizada por gastroenterólogos expertos y al final de la misma como es usual, estos profesionales, le darán un resultado. Teniendo en cuenta que en el momento los profesionales de esta unidad de gastroenterología, están realizando una investigación, nos parece muy importante que usted conozca lo siguiente:

Helicobacter pylori es una bacteria que infecta el estómago de los seres humanos y produce gastritis crónica, la cual generalmente no produce ninguna molestia, sin embargo la infección puede producir úlceras en una de cada seis personas y ocasionalmente también puede producir tumores aunque en una menor proporción que puede ser aproximadamente en uno de cada 100 personas infectadas. Actualmente existen varias combinaciones de antibióticos para eliminar esta infección, pero cada día esta bacteria, desarrolla resistencia a los antibióticos y por ello un grupo de investigadores, expertos en la infección por *Helicobacter pylori* de la Universidad Javeriana y de la Universidad Nacional de Colombia, están realizando una investigación con el propósito de estudiar si una nueva combinación de antibióticos es más eficaz que la combinación que tradicionalmente ha sido utilizada para tratar esta infección. Para este estudio se incluirán 240 pacientes. Si usted tiene la infección, este grupo de investigadores, lo invita a participar en el estudio, el cual consiste en lo siguiente:

1. Durante la endoscopia, le serán tomadas unas biopsias (unas muestras muy pequeñas del tejido que recubre el estómago) para determinar si usted tiene la infección por *Helicobacter pylori*, y también se le tomarán otras muestras para estudiar si la bacteria que usted tiene en su estómago, es resistente o no a los antibióticos que se utilizan como los de primera línea para tratar la infección.
2. Si se comprueba que usted tiene la infección, a usted se le dará uno de tres esquemas de tratamiento con eficacia comprobada para esta infección. Estos antibióticos serán medicamentos originales, que no tendrán para usted ningún costo. Cualquiera de ellos se considera que son excelentes pero para los propósitos de la investigación, los investigadores y usted sólo sabrán que recibió la combinación #1, # 2 o # 3, que tendrán una duración de siete días. En cada grupo habrá aproximadamente 80 pacientes. Los antibióticos que hacen parte de estos esquemas son Amoxicilina, Claritromicina y Levofloxacina los cuales se combinarán con otro medicamento llamado esomeprazol, el cual se utiliza para el tratamiento de úlceras y del reflujo gastroesofágico. Todos estos medicamentos se utilizan de manera rutinaria en pacientes con diversas infecciones y por lo tanto no son sustancias experimentales. Lo que se desea es ver si en Colombia estos antibióticos todavía son útiles para eliminar la infección.

Capítulo 5

3. A las seis u ocho semanas después de terminar el tratamiento, a usted se le realizará una prueba para determinar si esa infección fue erradicada. Para esto se le hará un examen que se llama "prueba respiratoria de urea", que permitirá saber si usted tiene o no tiene la infección. Esta prueba también se realiza de manera rutinaria en todo el mundo y simplemente se va a seguir utilizando en su caso.
4. Al finalizar el estudio, a usted se le informará sobre los resultados de su caso, así como también sobre la eficacia o no de los medicamentos en toda la población de pacientes que hicieron parte del estudio.
5. El beneficio de esta investigación es múltiple: en su caso recibir un tratamiento eficaz para erradicar la infección y para el país poder determinar si *Helicobacter pylori* en nuestro medio, responde mejor a uno de los tres esquemas o si todos son iguales. Con base en esos resultados, otros colombianos se beneficiarán de las conclusiones de esta investigación.

Si usted no desea participar en el estudio, su atención médica no se modificará y se le atenderá con la misma ética, dedicación y alta calidad independientemente de que no participe. Aunque los medicamentos que usted recibirá son utilizados rutinariamente, nadie sabe si usted pueda tener algún efecto colateral (diarrea, alergias, sabor metálico etc) y por lo tanto, se le llenará una encuesta para determinar la frecuencia de estos.

En cualquier momento usted es libre de retirarse de la investigación, sin detrimento en la calidad de su atención médica. Cualquier información adicional, gustosamente será suministrada por su médico.

La decisión que Ud. tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que recibe esta institución.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

HC: _____

DIAGNOSTICO: _____

FECHA: _____

Luego de conocido el objetivo de la presente, yo _____

_____ identificado con C.C. _____,

Acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma _____ Fecha _____

Testigos:

Comparación de la prueba de antígenos fecales (Elisa) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura

Comparison of the enzyme immunoassay antigen test (Elisa) and urea breath test with histological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: systematic literature review

Yuli Carreño Poveda,¹ Marcela Mercado Reyes,² Alba Alicia Trespalacios,³ William Otero MD.⁴

¹ Estudiante Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

² Profesor Asistente. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

³ Profesora Asociada. Directora Especialización de Microbiología Médica. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

⁴ Profesor Asociado de Medicina. Coordinador de Gastroenterología. Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo Clínica Fundadores. Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 20-05-09
Fecha aceptado: 14-10-09

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue realizar una revisión sistemática de la literatura para comparar la prueba de antígenos fecales y la prueba del aliento de la urea, frente a la histología en pre y postratamiento para la detección de *Helicobacter pylori*. La búsqueda de los artículos se realizó en las bases de datos PUBMED, SCIENCE DIRECT, OVID, COCHRANE y MEDICLATINA publicados entre 2003 y 2008. Los resultados de sensibilidad (S) y especificidad (E) de las pruebas en pretratamiento fueron: Antígenos fecales S: 98%, E: 95%; pruebas del aliento, S y E de 100% y en postratamiento ambas pruebas tuvieron S y E de 100%. Las gráficas de Funnel Plot en 3 de los 4 grupos revelaron asimetría, y el test de heterogeneidad mostró en los 4 grupos que los estudios eran homogéneos para S y E. En conclusión, la histología sigue siendo la mejor alternativa para el diagnóstico de la infección antes del tratamiento; por el contrario, las pruebas de aliento de la urea y antígenos fecales son las mejores opciones para verificar la erradicación de la infección, siendo la de antígenos fecales una que puede implementarse fácilmente en laboratorios de rutina en países en vías de desarrollo como Colombia, en donde no se realizan pruebas de forma rutinaria para verificar la erradicación de la infección.

Palabras clave

Histología, antígeno, heces, ureasa, *Helicobacter*.

Abstract

This is a systematic review of literature of the results of sensibility (S) specificity (E), (VPP) positive predictive value, and (VPN) negative predictive value, of original articles published between 2003 and 2008, of the test of fecal antigens and urea breath test with the hematoxilin and eosin and giemsa stains in histology in pre and post treatment for the detection of *Helicobacter pylori*. The results showed S=98%, E 95% for the test of fecal antigens in pre treatment, E=100% y S=100% for the urea breath test of in pre treatment, E=100% y S=100% for the test of fecal antigens in post treatment and finally E=100% y S=100% for the urea breath test in post treatment. The graphs of Funnel Plot in 3 of the 4 groups revealed asymmetry, and the test of heterogeneity in the studies of the 4 groups were homogeneous so much for S as for E. In conclusion the histology continues being the best alternative for the diagnostic of the infection before the treatment; on the contrary the urea breath test and the test of fecal antigens are the best options to verify the eradication of the infection. The test of fecal antigens can be implemented easily in routine laboratories in developing countries as Colombia where there are not realized tests of the routine form to verify the eradication of the infection.

Key words

Histology, antigen, stool, urease, *Helicobacter*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ha sido reconocido como el agente etiológico de diversas patologías gastroduodenales, como gastritis aguda y crónica tipo B, cáncer gástrico, tumores de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), y, por su participación en el cáncer gástrico, hace casi tres lustros, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasificó como un carcinógeno tipo I o definido (1). *H. pylori* se adquiere fundamentalmente durante la infancia a través de la ruta oral/oral o fecal/oral y una vez que se establece, si no se erradica con antibióticos la infección puede persistir durante toda la vida (2). En países subdesarrollados, del 60 al 70% de los niños tiene seropositividad para esta infección, a la edad de 10 años, en contraste con el 20 a 40% de los adultos de los países desarrollados (3). Para el diagnóstico se utilizan pruebas invasivas y no invasivas, dependiendo respectivamente de la utilización o no de endoscopia digestiva alta (EVDA) (2, 4). En las primeras se encuentran histología (HST), cultivo (CT), test de ureasa rápida (TUR), y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (4). Estas pruebas tienen la ventaja de detectar infecciones activas de manera muy específica y con un valor de predicción positivo muy alto, pero las dificultades más comunes asociadas a las mismas son las molestias para el paciente y costos asociados con la realización de la EVDA. Las pruebas no invasivas se basan en la detección de productos derivados de la actividad metabólica bacteriana como la prueba del aliento o “Urea Breath test” (UBT) y de la respuesta del huésped a la infección, identificada por la presencia de anticuerpos específicos en suero, saliva, jugo gástrico y heces (5-8). Tienen la ventaja de obviar la necesidad y los costos de la EVDA, siendo más económicas y de fácil ejecución. No obstante, la decisión de utilizar una u otra prueba dependerá de las características clínicas del paciente y los propósitos de la misma (“escenario clínico”). Cuando el paciente tiene síntomas que justifiquen una EVDA, las pruebas invasivas son las que se realizan más a menudo y, por el contrario, en estudios de prevalencia o cuando se desea verificar la erradicación de la infección posttratamiento, las más utilizadas son las no invasivas, a no ser que no se disponga de ellas, en cuyo caso, se recurrirá a las invasivas. El objetivo del presente trabajo es, mediante una búsqueda sistemática de la literatura, comparar dos pruebas no invasivas, el test de antígenos fecales y el BT tanto en pre y en posttratamiento de erradicación, con la histología que es considerada el estándar de oro (*Gold standard*) (2, 4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la revisión se hizo una búsqueda de los artículos publicados sobre pruebas agnósticas, desde el año 2003 hasta el

2008, utilizando las bases de datos PUBMED, SCIENCE DIRECT, OVID, COCHRANE y MEDICLATINA, que describieran las características operativas del test de antígenos fecales con anticuerpos monoclonales y UBT frente a la tinción de hematoxilina-eosina y Giemsa en histología. No se hizo restricción con respecto a la edad de los pacientes, país, estado inicial del paciente, ni marca comercial de la prueba utilizada. Se utilizaron encabezados temáticos como “HPSA with monoclonal antibody” and UBT, biopsy and monoclonal antibody, biopsy and UBT, hematoxylin and Giemsa, Diagnosis of *Helicobacter pylori*, Non invasive methods, evaluation and Sensibility and comparative-study-trial. Finalmente se hizo una búsqueda en la base de datos Scielo desde el 2003 hasta el 2008 bajo los términos *Helicobacter pylori*, antígenos fecales, test de aliento de la urea, test de antígenos fecales con anticuerpos monoclonales y métodos diagnósticos para *H. pylori*.

Se excluyeron los artículos que utilizaran pruebas como el test de antígenos fecales con anticuerpos policlonales e inmunocromatografía, artículos con poca descripción de las técnicas de interés, o con más de una versión, publicaciones donde se utilizara como test de referencia pruebas como cultivo, test rápido de la urea, PCR test de aliento de la urea, test de antígenos fecales, serología, artículos de idioma diferente a inglés o español, resumen de artículos o comentarios de revistas no reconocidas en investigación.

Extracción de datos

Después de seleccionar los artículos, los datos se extrajeron de forma independiente en un formato previamente estandarizado. De cada artículo se obtuvieron datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo; en caso que no fueran expuestos estos valores por los autores se realizaban tablas de contingencia para poder hallarlos. La medida de resumen (*overall*) fue calculada con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las características operativas de las pruebas. Los resultados de cada estudio fueron ingresados al programa RevMan 5^o de la Biblioteca Cochrane.

La evaluación de la calidad metodológica se realizó mediante una lista de chequeo basándose en los parámetros de la guía para usuarios de la literatura médica (9). Los desacuerdos fueron resueltos con la ayuda de expertos por medio de discusión de acuerdo a los criterios establecidos.

Análisis estadístico

Se calcularon los parámetros diagnósticos de las pruebas tinción de hematoxilina-eosina y Giemsa en histología, test de antígenos fecales con anticuerpos monoclonales y test de aliento de la urea para cada estudio. La variación entre

los resultados de diferentes estudios se determinó con el test de heterogeneidad (Forest Plot), mediante el modelo de efectos aleatorios con un alfa de 0,05 y se utilizó una prueba de chi cuadrado. Para analizar hasta qué punto los resultados de los diferentes estudios podían combinarse en una única medida, se realizó la evaluación del grado de heterogeneidad, a través del cálculo del estadístico de Q utilizando la siguiente fórmula (10):

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (Ef_i - \bar{Ef})^2$$

Ef_i Representa el estimador del tamaño del efecto del i-ésimo ensayo.

\bar{Ef} Representa el promedio de los estimadores del tamaño del efecto de los k ensayos y combinados.

W Representa el inverso de la varianza del tamaño del efecto de i-ésimo ensayo clínico (varianza de cada Ef_i).

El estadístico Q se distribuye como una función de distribución χ^2 con k-1 grados de libertad y la hipótesis nula indica que los tamaños del efecto a través de los ensayos clínicos son homogéneos (11).

La exploración gráfica de las características operativas, se evaluó mediante la elaboración de la curva ROC con sensibilidad vs. 1 - especificidad y la búsqueda de sesgo de publicación se analizó mediante el uso del método gráfico del embudo "Funnel Plot".

RESULTADOS

De la exploración inicial se obtuvieron 130 artículos, después de leer el resumen de los mismos se excluyeron 27 y quedaron un total de 103; al realizar una evaluación más detallada se excluyeron 46 artículos (30 por uso de test de antígenos fecales con anticuerpos policlonales), (10 por uso de técnicas como la inmunocromatografía), (6 porque utilizaban otras técnicas), y quedaron un total de 57 artículos los cuales se empezaron a excluir por causas como metodología utilizada 35, artículos que no arrojaron datos de las características operativas 11, artículos que utilizaban otro estándar de referencia 12, revisiones o cartas de editor 10 y artículos que utilizaron muestras provenientes de animales 2, para un total de 24 artículos incluidos. En la base de datos de Scielo, se encontraron cinco artículos, tres de los cuales fueron excluidos porque no cumplían los objetivos de la revisión: uno estaba en portugués, otro tenía como objetivo encontrar el mejor punto de corte para del test de aliento de la urea y el otro porque utilizaba un test de antígenos fecales con anticuerpos policlonales. De los dos que se incluyeron, uno comparaba el UBT con histología y

el otro validaba esta prueba (50 mg de urea marcada con ^{13}C y 2g de ácido cítrico) con histología (tabla 1). Para mayor comprensión y análisis de los datos, se organizaron en 4 grupos, el grupo 1 hace referencia al test de antígenos fecales e histología en pretratamiento, grupo 2: artículos donde se describieran el UBT e histología en pre tratamiento, grupo 3: artículos donde se describiera el test de antígenos fecales e histología en postratamiento, grupo 4: artículos donde se describiera el UBT e histología en postratamiento.

Calidad metodológica

La calidad metodológica de los estudios fue adecuada en la mayoría de los aspectos evaluados, con excepción de algunos artículos donde no se describieron las pruebas a evaluar, y de los 24 artículos seleccionados tres no proporcionaron los datos para hallar la especificidad (figura 1).

ANÁLISIS DE DATOS

Grupo 1: Pretratamiento para test de antígenos fecales / histología. El total de estudios para este grupo fue de 12 referencias mostrando valores de sensibilidad de 98% en 5 de las 12 referencias y la especificidad solo se midió en 10 de 12 referencias, de las cuales 3 presentaron especificidad superior al 95%. Con una medida de resumen *overall* para la sensibilidad de 95% IC95% (93-96%) y para especificidad el *overall* fue de 94% IC 95% (93-94%) (figura 2).

Adicionalmente la prueba de heterogeneidad estimó que los estudios son homogéneos tanto para sensibilidad como para especificidad ($p=0,95$) y ($p=0,94$) respectivamente.

Con respecto a la curva ROC se observó en este grupo que los estudios con mayor área bajo la curva fueron Koletzo E =99%, Hino S=98%, Dore S= 97%, Asfeld S =98%; (11-14); esto se debe a que la sensibilidad y especificidad de estos estudios eran mayores al 95%. Los estudios que presentaron menor área bajo la curva fueron Andrew S=88%, Domínguez E=93%, Erzin E=93%, Calvet E=76% (15-19).

Sesgos de publicación

La presencia de sesgos en este estudio fue evaluada utilizando el gráfico de embudo (Funnel Plot) (20) también llamado gráfico de dispersión (scatter plots), gráfica del error estándar (precisión de la muestra) vs. la sensibilidad y la especificidad de cada estudio (tamaño del efecto evaluado). En este grupo el gráfico de embudo mostró asimetría hacia la izquierda, lo que indica posible presencia de sesgos de publicación.

Grupo 2: Pretratamiento para PAU/ histología. El total de referencias seleccionadas para este grupo fue de 12,

Tabla 1. Características de las referencias utilizadas.

| Autores | País | P | E | GS-Histología | No. de pacientes | Técnica | S | E | VPP | VPN |
|----------------------|-----------|------------------|-------------------------------|---|---|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Andrews et al 2003 | Londres | A | Dolor gástrico | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto n=72 Pos tto n=39 | Femtolab | 88% 87.50% | 98% 90.30% | 96% 70% | 94.00% 96.50% |
| Asfeld et al 2004 | Noruega | A | Dolor gástrico | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto n=122 Pos tto n=116 | Femtolab | 98.10% 100% | 94.10% 100% | 92.90% 100% | 98.40% 100% |
| Barriga et al 2004 | México | N (53) A (55) | Enf. Ácido-peptica | 2 biopsias | Pre tto n=108 | Breath Tek UBIT MR | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Calvet et al 2004 | España | A | Lesión péptica | 2 biopsias de antro | Pre tto n=72 | Femtolab | 98% | 76% | 91% | 94% |
| Castro et al 2004 | Brasil | A | Dolor gástrico | Mix de antro y de cuerpo | Pre tto n=54 | Quintron UBT | 92% | 94% | 96% | 89% |
| Chisholm et al 2004 | Londres | A | Dispepsia | Muestras de antro | Pre tto n=112 | IDEIA- HpStAR | 93.70% | 100% | 100% | 100% |
| Domínguez et al 2006 | España | A | Síntomas dispépticos | Muestras de antro | Pre tto n=237 Pos tto n=126 | HpStAR | 92.80% 80% | 70.70% 93% | 93.80% 74% | 67.40% 94.90% |
| Dore et al 2006 | Italia | A | Síntomas dispépticos | 2 antro. 1 ángulo 1 biopsia de cuerpo | Pre tto n=73 | HePy-Stool, Biolife | 97.00% | 94% | 95.00% | 97.00% |
| Erzin et al 2004 | Turquía | A | Síntomas dispépticos | 2 biopsias de antro 1 biopsia de cuerpo | Pre tto n=151 | Femtolab | 93% | 90% | 98.30% | 68.90% |
| Frenck et al 2006 | Egipto | N | Síntomas dispépticos | 1 biopsia de antro | Pre tto UBT n=98 Pre tto HPSA n=94 | (Meretek Inc Nashville) HpStAR | 98% 93.40% | 89% 87.50% | 88% 87% | 98% 93% |
| Grino et al 2003 | España | A | Úlcera sangrante | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto UBT n=66 | TAU-KIT, Isomed, SL, Madrid- España | 93.10% | 87.50% | 98.20% | 63% |
| Gurbuz et al 2005 | Turquía | A | Síntomas dispépticos | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto UBT n=65 | Heliprobe | 89.60% | 77% | 76.4% | 90.30% |
| Hannun et al 2006 | Finlandia | A | Pacientes con HP | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pos tto UBT n=50 Pos tto HPSA n=50 | Pt-Hepy-RR, Orión, IDEIA- HpStAR | 100% 93.70% | 100% 100% | 100% 100% | 100% 97.10% |
| Hino et al 2004 | Israel | N Y AD | Síntomas dispépticos | 1 biopsia de antro | Pre tto UBT n=70 Pos tto HPSA n=78 | Oridion Breath ID Femtolab | 100% 97.60% | 96.70% 94.40% | 97.50% 95% | 100% 97% |
| Koletzko et al 2003 | Alemania | N | Síntomas dispépticos | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto HPSA n=302 | Femtolab | 97.80% | 99% | 97.80% | 99% |
| Manes et al 2005 | Italia | A | Presencia de <i>H. pylori</i> | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pos tto UBT n=325 Pos tto HPSA n=325 | UBT Femtolab | 98.90% 88.10% | 99.50% 94.80% | 98.90% 87.40% | 99.50 95.20 |
| Nakota et al 2004 | Japón | A | Pacientes con endoscopia | 2 biopsias de antro y cuerpo superior | Pre tto UBT n=100 | UBT | 95.70% | 94.30% | 93.70% | 96 |
| NanJ-Peng et al 2003 | China | A | Pacientes con endoscopia | 2 mx de curvatura < de la región pilórica | Pre tto UBT n=100 | Capsule UBT | 100% | 100% | 100% | 100% |
| NanJ-Peng et al 2005 | Taiwan | A | Pacientes con endoscopia | 2 mx de curvatura menor | Pre tto UBT n=50 | UBT 500 mg | 100% | 100% | | |
| Ortiz et al 2007 | México | A | Dispepsia | 1 mx de antro y cuerpo | Pre tto UBT n=88 | (PAU-13Cs) | 90.20% | 93.30% | 90.20% | 85.00% |

Tabla 1. Características de las referencias utilizadas. (Continuación)

| Autores | País | P | E | GS-Histología | No. de pacientes | Técnica | S | E | VPP | VPN |
|---------------------|-----------|---|-------------------------------|---|--|---------------------------------------|----------------------------|----------------|-------------|--------------|
| Perri et al 2005 | Italia | A | Presencia de <i>H. pylori</i> | 1 biopsia de antro 1 biopsia de cuerpo | Pos tto UBT n=245 Pos tto HPSA n=245 | UBT HpStAR | 91% 100% | 100% 97.40% | 100% 91% | 100% 100% |
| Rasool et al 2007 | Pakistán | A | Dispepsia | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto UBT n=94 | Helicap, n syst, AB Stockholm, Suecia | 91% | 90% | 95% | 81% |
| Vejliola et al 2005 | Finlandia | A | Pacientes con endoscopia | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto HPSA Pos tto HPSA | IDEIA-HpStAR | 97.60% 93.70% | 98.40% | 93.70% | 98.40% |
| Weingart et al 2004 | Alemania | A | Presencia de <i>H. pylori</i> | 2 biopsias de antro 2 biopsias de cuerpo | Pre tto UBT n=50 Pos tto UBT n=50 Pre tto HPSA n=50 Pos tto HPSA n=50 | | 96% 100% 94% 100% | 100% | | |

P población, **E** estado inicial, **GS** gold estándar, **S** sensibilidad, **E** especificidad, **PPV** valor predictivo positivo, **PPN** valor predictivo negativo.

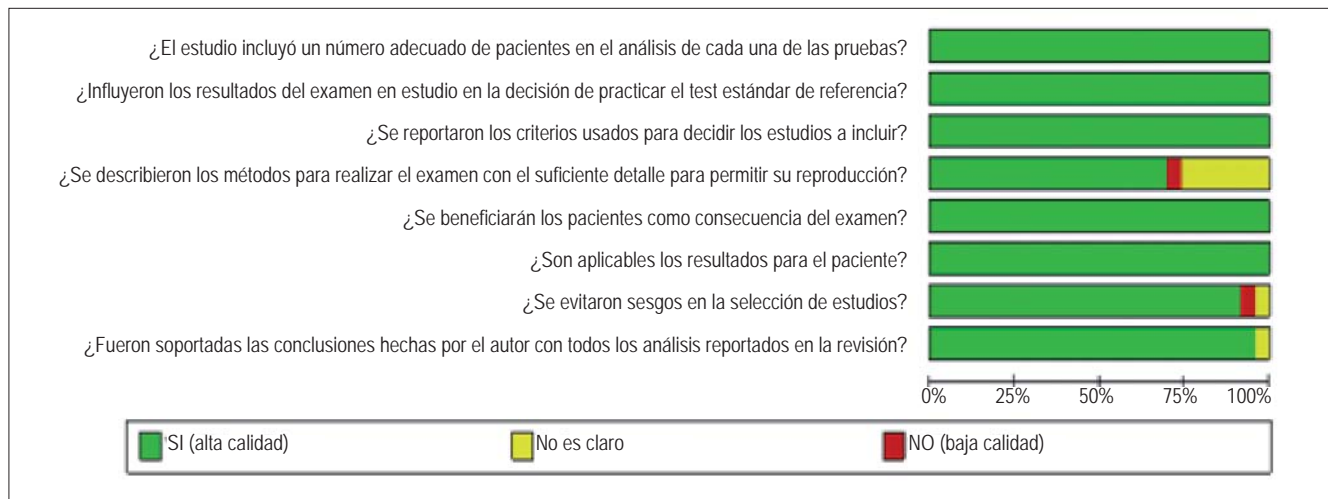


Figura 1. Calidad metodológica de los estudios.

la sensibilidad fue de 100% en 4 referencias y la especificidad fue de 100% en 3 de 11 referencias teniendo en cuenta que solo se reportaron especificidad en 11 referencias. Con respecto a la medida "overall" se calculó el valor global de la sensibilidad 95% IC 95% (94-97%) y especificidad de 92% IC 95% (90-95%) (figura 3).

Adicionalmente, la prueba de heterogeneidad estimó que los estudios son homogéneos tanto para sensibilidad como para especificidad ($p=0,96$) y ($p=0,93$) respectivamente.

Con respecto a la curva ROC se observó, en este grupo, que los estudios que tienen mayor área bajo la curva son NonJing Peng 2003 S y E=%, Peng 2005 S y E=%, Hino

2004 S y E=%, Barriga 2004 S y E=% (13, 21-23); esto se debió a que la sensibilidad y especificidad de estos estudios eran mayores al 95%. Los estudios que presentaron menor área bajo la curva fueron Gurbuz 2005 S=90%, Rasool 2007 S=91%, Griño 2003 S=93% y Frenck 2006 S=96% (4, 24-26).

Sesgos de publicación

Este grupo evidenció asimetría a la izquierda por presencia de sesgos de publicación con dispersión posiblemente por un tamaño pequeño de la muestra.

Grupo 3: Postratamiento para test de Ag fecales/histología. La sensibilidad y especificidad fue del 100% en 3 de 8 referencias con un overall para sensibilidad de 94% IC 95% (91-96%), y especificidad 96% IC 95% (94-97%) (figura 4).

Adicionalmente la prueba de heterogeneidad estimó que los estudios son homogéneos tanto para sensibilidad como para especificidad ($p=0,94$) y ($p=0,96$) respectivamente.

Con respecto a la curva ROC se observó, en este grupo, que los estudios que tienen mayor área bajo la curva fueron Weingart 2004, S y E=100%, Perri 2005 E=97%, Asfeldt 2004 S y E=100% (15, 27, 28); esto se debió a que la sensibilidad y especificidad de estos estudios eran mayores al 95%, los estudios que presentaron menor área bajo la curva

fueron Andrew 2003 S=80%, Domínguez 2006 S=88%, Manes 2005 S=88% (16, 17, 29).

Sesgos de publicación

Se evidenció asimetría a la izquierda por presencia de sesgos de publicación con dispersión hacia la parte inferior por un tamaño pequeño de la muestra.

Grupo 4: Postratamiento para PAU/histología. El total de referencias seleccionadas en este grupo fue de 4 con una sensibilidad de 100% en 2 de las 4 referencias y una especificidad de 100% en 4 de las 4 referencias y un overall para sensibilidad de 96% IC 95% (93-98%), y para especificidad de 99% IC 95% (98-99%) (figura 5).

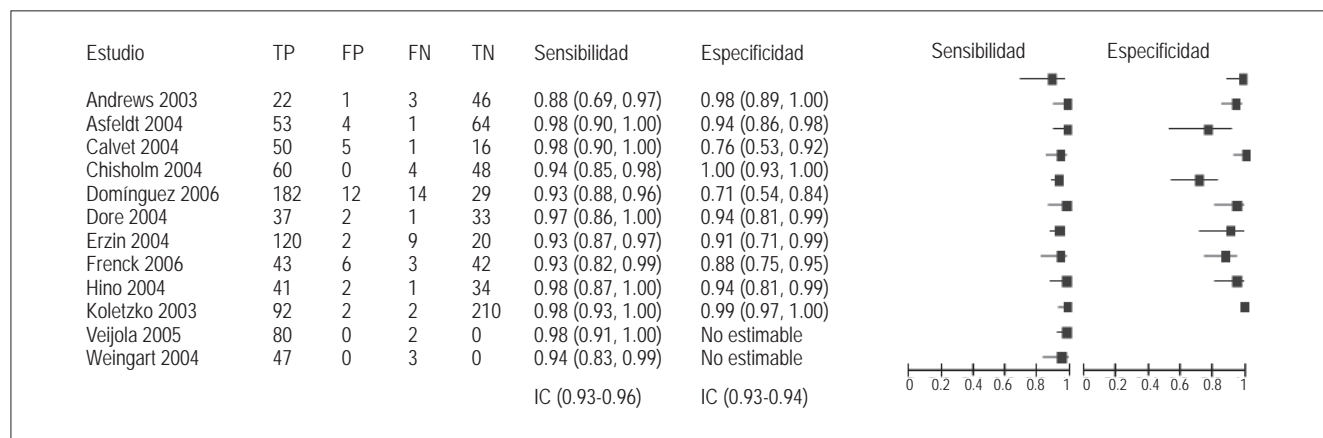


Figura 2. Forest plot en pretratamiento para test de Ag fecales-histología.

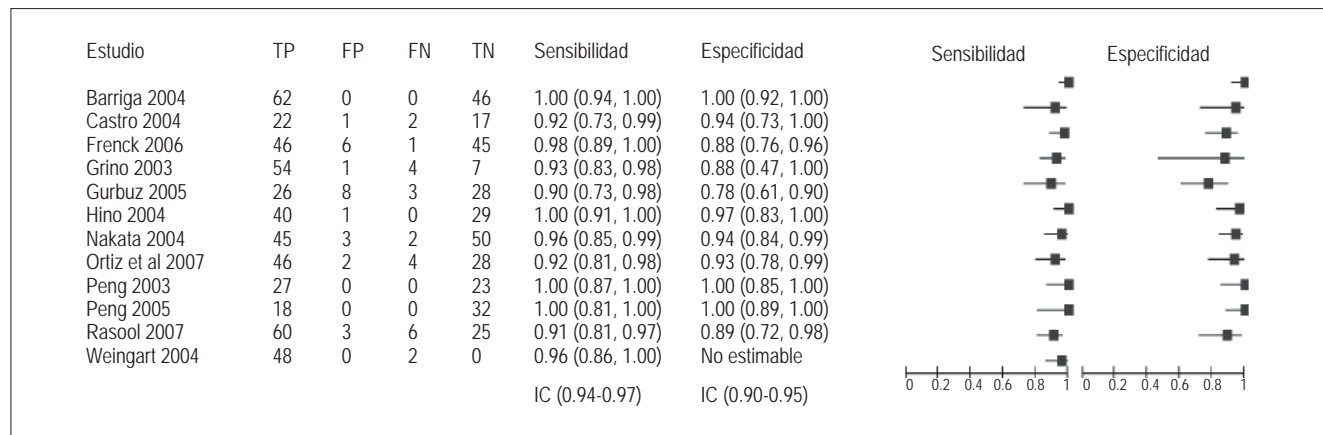


Figura 3. Pretratamiento para PAU-histología.

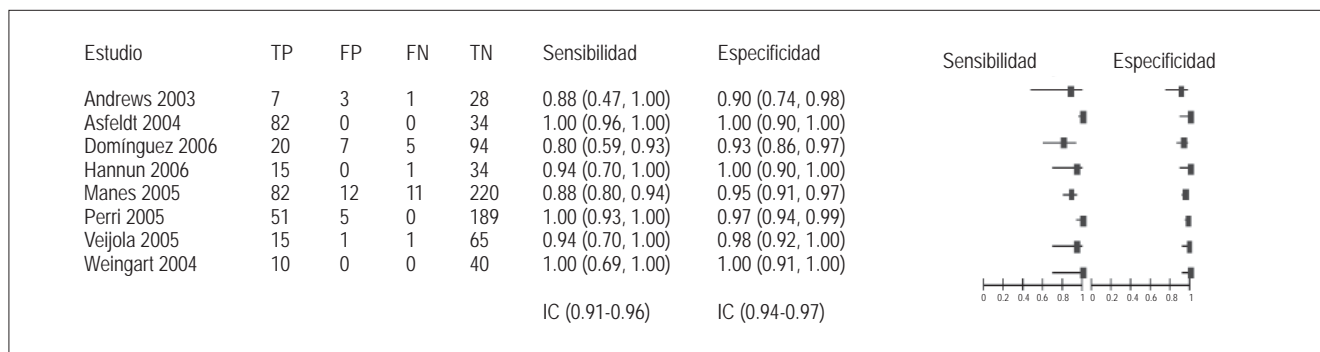


Figura 4. Postratamiento para Test de Ag fecales-histología.

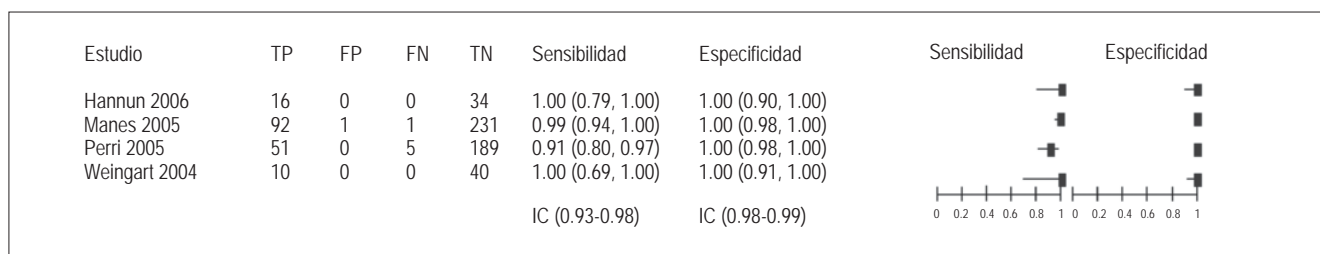


Figura 5. Forest plot en postratamiento para PAU-histología.

Adicionalmente la prueba de heterogeneidad estimó que los estudios son homogéneos tanto para sensibilidad como para especificidad ($p=0,96$) y ($p=0,99$) respectivamente.

Con respecto a la curva ROC se observó, en este grupo, que los que presentaron mayor área bajo la curva fueron Weingart 2004 S y E=100%, Hannun 2006 S y E=100% (27, 30); esto se debió a que la sensibilidad y especificidad de estos estudios eran mayores al 95%, y los que presentan menor área bajo la curva fue Perri 2005 S=91% (28).

Sesgos de publicación

Se evidenció asimetría a la izquierda por presencia de sesgos de publicación con dispersión hacia la parte inferior por un tamaño pequeño de la muestra para sensibilidad, con excepción de la especificidad que presenta una gráfica simétrica pues todos los valores son de 100%.

DISCUSIÓN

En los artículos revisados, se encontró poca información de las técnicas de interés por lo cual se redujo el tiempo del estudio de diez a cinco años (2003 a 2008). También se tuvo dificultad porque no todos utilizaron la histología como prueba de referencia y en su lugar, se observó con frecuencia el uso del UBT.

En la fase de pretratamiento se encontró mejor sensibilidad con los antígenos fecales y el UBT y por lo tanto, son

pruebas que se pueden utilizar en el diagnóstico primario. En el postratamiento, ambas pruebas son muy específicas, siendo un poco superior el UBT E: 99% frente al Test de antígenos fecales E=96% aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Los estudios que presentaron mayor área bajo la curva fueron los que presentaron valores superiores al 95% en pre y postratamiento con el test de antígenos fecales con anticuerpos monoclonales y el UBT y los que presentaron menor área bajo la curva fueron aquellos estudios con características operativas menores a 95%. Con estos valores, se pueden detectar los falsos positivos y los falsos negativos, lo que nos indica que en postratamiento con UBT hay menos falsos positivos como lo demostraron tres de los trabajos revisados (27, 28, 30), en los cuales la especificidad de la prueba fue de 100%. De igual manera, hubo menos falsos negativos, con sensibilidad de 91-100%.

Los sesgos de publicación evaluados con las gráficas de embudo "Funnel Plot" mostraron asimetría para ambas características operativas en 3 de los 4 grupos, lo cual puede estar asociado, bien a reducido tamaño o a la calidad metodológica. Esta circunstancia no necesariamente implica limitaciones de la presente revisión ya que el número de artículos al respecto no es superior a 15, dado que es escasa la literatura sobre antígenos fecales utilizando anticuerpos monoclonales. Es posible que exista sesgo de publicación, si se tiene en cuenta, que la mayoría de artículos presentan características operativas favorables, lo cual implicaría que dan a las pruebas

mayor rendimiento de la que realmente tienen. Es clásicamente conocido, que en la literatura médica se publican con más frecuencia investigaciones con resultados positivos que aquellas con resultados negativos (20).

Con base en la presente revisión, consideramos que en nuestro medio, si se implementaran con mayor frecuencia estas pruebas, serían más recomendable los antígenos fecales ya que tienen un menor costo y es más fácil de realizar ya que no necesita equipos especiales para su ejecución. Una excelente utilidad sería para verificar la erradicación postratamiento.

Los resultados de la presente revisión concuerdan con los de Vaira D, y col (31) quienes también llegaron a la conclusión de que tanto los antígenos fecales como el UBT son pruebas de mucha utilidad tanto para verificar la erradicación de la infección, como para el diagnóstico si no se requiere endoscopia digestiva alta, ya que en caso contrario, la histología sigue siendo la mejor alternativa.

En conclusión, la detección de la infección utilizando anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos en las heces y el UBT son las mejores opciones para verificar la erradicación de la infección postratamiento y la histología antes del tratamiento. Teniendo en cuenta los costos y la facilidad para su realización, en nuestro medio serían de mucha utilidad los antígenos fecales.

REFERENCIAS

1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 61: Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1994.
2. Fennerty MB. *Helicobacter pylori*. Arch Intern Med 1994; 154: 721.
3. Marshall BJ. History of the discovery of *C. pylori*. En Blaser MJ, ed. *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease New York: Igaku-Shoin, 1989. p. 7-23.
4. Pilar Griño, Sonia Pascuala, José Sucha, Juan A. Casellas, et al. Comparison of stool immunoassay with standard methods for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with upper-gastrointestinal bleeding of peptic origin. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15: 525-529.
5. Cirak MY, Akyion Y, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2007; 12(Suppl.1): 4-8.
6. Vilaichone RK, Machchai V, Graham DY. *Helicobacter pylori*: diagnosis and management. Gastroenterol Clin North Am 2006; 35: 228-47.
7. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: Biology and disease. J Clin Invest 2004; 113: 321-33.
8. Daugule I, Rowland M. *Helicobacter pylori* infection in children. Helicobacter 2008; 13(Suppl.1): 41-6.
9. Jaeschke R, Gordon H, Guyatt MD, Sackett DL. Guías para usuarios de la literatura médica, parte B ¿Cuáles son los resultados? ¿Me ayudarán a la asistencia de mis pacientes? Revista JAMA, ed. España 1997; 703-707.
10. Dersimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Contr Clin Trials 1986; 7: 177-188.
11. Herbert RD, Bo K. Analysis of quality of interventions in systematic review. BMJ 2005; 331: 507-9.
12. 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; 52: 804-806.
13. B Hino, R Eliakim, A Levine, H Sprecher, D Berkowitz, C Hartman, et al. Comparison of Invasive and Non-Invasive Tests Diagnosis and Monitoring of *Helicobacter Pylori* Infection in Children. J Ped Gastroenterol Nutr 2004; 39: 519-523.
14. Dore MP, Negrini R, Tadeu V, Marras L, Emanouel L. Novel Monoclonal Antibody-Based *Helicobacter pylori* Stool Antigen. Test. Helicobacter 2004; 9: 228-232.
15. Asfeldt AM, Locher ML, Straume B, Steigen SE, Florholmen J, Goll R, et al. Accuracy of a Monoclonal Antibody-based Stool Antigen Test in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. J Gastroenterol 2004; 39: 1073-7.
16. Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong VS, Wood E, Kelsey M. Comparison of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. J Clin Pathol 2003, 56: 769-771.
17. Dominguez J, Forne M, Blanco S, Prat C, Gali N, Latorre I, et al. Comparison of a monoclonal with a polyclonal antibody-based enzyme immunoassay stool test in diagnosing *Helicobacter pylori* infection before and after eradication therapy. Aliment Pharmacol Ther 2006; 23: 1735-1740.
18. Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, et al. Comparison of two Different Stool Antigen Tests for the Primary Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Turkish Patients with Dyspepsia. Helicobacter 2004; 9: 657-662.
19. Calvet X, Quesada M, Sanfeliu I, Salceda M, Roselló M, Montserrat A, et al. *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients by stool antigen detection. Usefulness of a new monoclonal enzyme immunoassay test. Dig Liver Dis 2004; 36: 450-454.
20. Clarke M, Oxman AD, editores. Manual de Revisores Cochrane 4.1.6. Actualización <http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook.htm> acceso 31 de enero de 2008.
21. Peng NJ, Lai KH, Liu RS, Lee SC, Tsay DG, Lo CC, et al. Endoscopic C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Dig Liver Dis 2003; 35: 73-77.
22. Peng NJ, Lai, KH, Liu RS, Lee SC, Tsay DG, Lo CC, Tseng HH, Huang WK Gin-Ho Lo, Hsu PI. Capsule 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol 2005; 11: 1361-1364.
23. Barriga G, Arumir C, Mercado F, Escorza CA. La prueba de aliento en el diagnóstico de la infección con *Helicobacter pylori*. Rev Mex Patol Clin 2004; 51: 194-199.
24. Gurbuz AK, Ozel AM, Narin Y, Yazgan Y, Baloglu H, Demirturk I. Is the Remarkable Contradiction between

- Histology and 14C Urea Breath Test in the Detection of *Helicobacter pylori* due to False-negative Histology or False-positive 14C Urea Breath Test. *J Int Med Res* 2005; 33: 632-640.
25. Rasool S, Abid S, Jafri. W Validity and cost comparison of 14carbon urea breath test for diagnosis of H Pylori in dyspeptic patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 925-929.
 26. Robert W. Frenck, Jr, MD, Hanan Mohamed Fathy, MD, May Sherif, MD, Zaynab Mohran, et al. Sensitivity and Specificity of Various Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* in Egy Child. *Ped* 2006; 118: 1195-1202.
 27. Weingart V, Russmann H, Koletzko S, Weingart J, Hochter W, Sackmann M. Sensitivity of a Novel Stool Antigen Test for Detection of *Helicobacter pylori* in Adult Outpatients before and after eradication Therapy. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1319-1321.
 28. Perri F, Quitadamo M, Ricciardi R, Piepoli A, Cotugno R, Gentile AM, et al. Comparison of a monoclonal antigen stool test (Hp StAR) with the 13C-urea breath test (UBT) in monitoring *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5878-588.
 29. Manes G, Zanetti MV, Piccirillo MM, Lombardi G, Balzano A, Pieramico O. Accuracy of a new monoclonal stool antigen test in post-eradication assessment of *Helicobacter pylori* infection: Comparison with the polyclonal stool antigen test and urea breath test. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 751-755.
 30. Hannu M Paimela, Niku K Oksala, Ilpo P Kaaria Inen, Petteri J, et al. Faecal antigen tests in the confirmation of the effect of *Helicobacter* eradication therapy. *Ann Med* 2006; 38: 352-356.
 31. Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C, Gatta L, Geminiani A, Miglioli M. Review article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14(3): 13-22.

Comparación de las pruebas de dilución en Agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Revisión sistemática de la literatura

Comparison of Agar dilution test with Polymerase Chain Reaction (PCR) to determinate antimicrobial susceptibility of *Helicobacter Pylori*. A systematic literature review

Jenny Mireya Ávila Coy,¹ Marcela Rey Arévalo,² Marcela María Mercado Reyes, MSc,² Olga Raquel Villamizar Beltrán,² William Otero Regno,³ Alba Alicia Trespalacios, MSc.⁴

RESUMEN

Objetivo: determinar las características operativas de la prueba RFLP-PCR frente a la prueba dilución en agar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana a claritromicina en aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Metodología: la búsqueda de estudios de pruebas diagnósticas sobre resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a claritromicina con técnicas de dilución en agar y RFLP-PCR se realizó en Medline, Science direct, Ovid y Cochrane. Se elaboraron tablas de contingencia para calcular las características operativas, en el programa RevMan 5. La heterogeneidad fue evaluada por la gráfica Forest Plot y el estadístico de Q. La presencia de sesgos de publicación se evaluó con Funnel Plot.

Resultados: doce artículos cumplieron con los criterios de inclusión. El overall de especificidad fue 100% (IC 95% 91-

100), demostrando baja probabilidad de falsos positivos. Para sensibilidad el valor fue de 91% (IC 95% 88-94) indicando una mayor probabilidad de resultados falsamente negativos. En la gráfica de "Funnel Plot" se observó asimetría para ambas características demostrando sesgo de publicación.

Conclusiones: la técnica RFLP-PCR no presentó características operativas iguales o superiores al 95%, comparada con el estándar de referencia dilución en agar. Por lo anterior esta técnica de se debe considerar la prueba de elección cuando se estudie la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*.

Palabras clave

RFLP-PCR, dilución en agar, susceptibilidad antimicrobiana, *Helicobacter pylori*, revisión sistemática de la literatura, claritromicina, amoxicilina.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por Marshall y Warren en 1983, ha sido uno de los fenómenos científicos de mayor importancia en la

literatura biomédica mundial (1, 2). Esta bacteria es el principal agente causal de gastritis crónica, úlceras pépticas, carcinoma gástrico y linfoma gástrico tipo MALT de bajo grado de malignidad (2).

¹ Estudiante de Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

² Profesor Asistente. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

³ MD. Profesor Asociado de Medicina. Coordinador de Gastroenterología. Universidad Nacional de Colombia,

Gastroenterólogo Clínica Fundadores. Bogotá Colombia.

⁴ Profesora Asociada. Directora Especialización Microbiología Médica. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 07-10-08/ Fecha aceptado: 26-03-09

SUMMARY

Aim: Establish the available scientific evidence of the operational characteristics of PCR-RFLP test with Agar Dilution for the determination of antimicrobial susceptibility in clarithromycin clinical isolates of *Helicobacter pylori*.

Methods: We have performed the search bibliography about diagnostic tests on antimicrobial resistance of *H. pylori* to clarithromycin by using Agar Dilution and PCR-RFLP techniques over Medline, Science direct, Ovid and Cochrane of studies. The information was validated by two observers who checked the inclusion criteria and quality. We obtained the operational characteristics of the studies on contingency tables; analysis was performed on the RevMan 5 program.

Results: A total of 50 references were tested from those 12 has been chosen in accord with the inclusion criteria and analyzed as summary measures. The specificity "overall"

was a 100% (CI 95% 91-100) that demonstrate a low probability of positive false. The projected overall sensitivity was 91% (CI 95% 88-94%) which indicated a high probability of negative results. The test showed heterogeneity studies homogeneous in sensitivity and specificity ($p = 0.78$) ($p = 0.99$). The graphics of "Funnel Plot" revealed asymmetry for both of those characteristics that showed a publications bias. In the group analysis have not found antibiotics different from clarithromycin and was evident that the continent was more publications Europe, followed by Asia and Latin America.

Conclusion: The sensitivity and specificity of PCR-RFLP technique for clarithromycin not have values equal to or higher than 95% compared proof Agar Dilution.

Key Words

RFLP-PCR, Agar Dilution, antimicrobial susceptibility, *Helicobacter pylori*, Systematic review.

Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria, pero existen diferencias según la ubicación geográfica y el nivel económico (1, 2). En países desarrollados la infección se encuentra aproximadamente en el 10% de las personas de 20 años y aumenta gradualmente con la edad entre el 50% y 60% a los 60 años, mientras que en países en desarrollo las tasas de infección alcanzan el 95% (3).

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 (4). Sin embargo en Colombia no se han hecho estudios de prevalencia general sobre *Helicobacter pylori*, razón por la cual no se tienen datos precisos.

Actualmente, la estrategia de erradicación más difundida consiste en la triple terapia que consta de un inhibidor de bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol durante 7, 10 ó 14 días (1). Más recientemente, se ha empezado a utilizar levofloxacina, una quinolona, como parte de nuevos esquemas de erradicación primera línea combinada con amoxicilina y un inhibidor de bomba de protones durante diez días (1).

En los últimos años, y debido al uso indiscriminado de antibióticos, se ha incrementado la resistencia de la bacteria a los antimicrobianos más comúnmente usados en su tratamiento, por ello se han empezado a implementar pruebas que permitan detectar la susceptibilidad de *H. pylori* frente a los antibióticos de uso rutinario, para poder establecer la efectividad de los tratamientos y aplicar nuevas terapias de erradicación.

Dentro de los mecanismos genéticos de resistencia a los antibióticos, solo uno concierne a *H. pylori*, la presencia de puntos de mutación. El sitio blanco en los macrólidos (claritromicina) es el 23S rRNA, especialmente el dominio V donde los antibióticos se unen e interrumpen la síntesis de proteínas. Los primeros puntos de mutación asociados con resistencia a macrólidos fueron 2142 (A2142G) y 2143 (A2143G) (5).

La amoxicilina es el único β -lactámico usado para el tratamiento de infecciones por *H. pylori* y un posible sitio blanco de su acción pueden ser las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), involucradas en la síntesis de péptido glucano (6) y por lo tanto, en estas PBPs pueden afectar la unión de los β -lactámicos y conferir resistencia a los mismos (6).

La mutación asociada a la resistencia en fluoroquinolonas (levofloxacina) ocurre en la región (QRDR) del gen *gyrA*, que codifica la DNA girasa la cual tiene una función principal en la replicación, relajando el DNA superenrollado (6).

El método diagnóstico de referencia definido por Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), que evalúa la resistencia antimicrobiana es la dilución en agar (DA) de *H. pylori* en el que se determina la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos comúnmente usados en la terapia de erradicación. Este método, aunque es de elección, no se realiza rutinariamente en el diagnóstico de resistencia del *H. pylori* por su compleja metodología y porque requiere de un elevado flujo de muestras para realizar, por lo tanto, solo se utiliza en laboratorios de referencia (4).

En la técnica de DA el agente antimicrobiano es incorporado en un medio (Mueller-Hinton) que contiene diferentes concentraciones por medio de diluciones seriadas dobles (Ej.: diluciones entre 0,008-64 µg/ml de un antibiótico determinado) (7). Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa (8). Esta técnica se interpreta como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

Recientemente se han desarrollado técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), basadas en ácidos nucleicos las cuales detectan las mutaciones que causan resistencia de la bacteria a los antibióticos (2). Este es un método simple, en el que se detecta la presencia o ausencia de un sitio de restricción con fragmentos de DNA amplificado (2, 9, 10). Esta técnica se usa generalmente para detectar mutaciones en blancos pequeños de secuencias conocidas, principalmente puntos de mutación de uno o pocos pares de bases y pequeñas inserciones o deleciones. Esta técnica puede detectar puntos de mutación tan poco frecuentes como de 10^{-6} hasta 10^{-8} por base (11).

La utilidad de esta técnica asociada a resistencia antimicrobiana en *H. pylori*, se describió por primera vez en 1996 con el antibiótico claritromicina (12). En este ensayo, se amplificó la región que contenía la o las mutaciones y luego los fragmentos sintetizados fueron tratados con endonucleasas de restricción que reconocieron sitios específicos creados por las

mutaciones. El tamaño de los fragmentos resultantes indicó la presencia o ausencia de la mutación (12).

Una forma de hacer una evaluación crítica y exacta sobre un tema de estudio es por medio de una revisión sistemática, en el que se pretende recopilar toda la información publicada sobre un tema determinado, para evaluarla críticamente y obtener conclusiones que resuman el efecto de una intervención clínica o diagnóstica; para llevar a cabo una revisión sistemática, se deben realizar los pasos que se muestran en la tabla 1 (13). Una revisión sistemática puede o no incluir metanálisis. Un metanálisis es un análisis estadístico de los resultados de estudios clínicos controlados aleatorizados e independientes con objetivos generales para producir una estimación del efecto para un tratamiento (14).

Tabla 1. Pasos para realizar una revisión sistemática de la literatura.

1. Definir pregunta de investigación
2. Definir los criterios de inclusión y exclusión
 - Participantes
 - Intervenciones y comparaciones
 - Información externa
 - Diseño del estudio y metodología
3. Localización de los estudios
 - Registros
 - Bases electrónicas
 - Listas de chequeo y verificación
 - Información personal de expertos acreditados en el tema
4. Selección de los estudios
 - Deben poderse verificar por más de un observador.
 - Deben resolver desacuerdos como desarrollo de estrategias.
 - Deben retirarse estudios por razón de exclusión.
5. Evaluación de la calidad de los estudios: formatos predeterminados o listas de chequeo.
6. Extracción de datos: gráfica de efectividad clínica "forest plot".
7. Análisis estadístico: exploración de heterogeneidad, determinación de características operativas y tipos de sesgos mediante "funnel plot" entre otros.
8. Interpretación de resultados: publicaciones incluidas y sesgos relacionados con el tema, implicaciones económicas y posibles estudios futuros (Egger et al, 2001).

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo pretende, mediante una revisión sistemática de la literatura, establecer si las características operativas de sensibilidad y especificidad de la prueba RFLP-PCR, son superiores al 95% en al menos el 90% de los artículos seleccionados en la revisión. Esto con el fin de

sugerir como técnica de rutina la RFLP-PCR ya que es sencilla, no requiere de equipos sofisticados y es la mejor alternativa para identificar mutaciones que confieran resistencia a claritromicina, frente a métodos que requieren una infraestructura más compleja como PCR en tiempo real y secuenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de artículos. Para la selección de artículos, se llevó a cabo una estrategia de búsqueda en las bases de datos en la que se incluyeron estudios de pruebas diagnósticas publicados entre 1998 y 2008, en donde se utilizaban pruebas de dilución en agar y RLFP-PCR para determinar la susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos (claritromicina, levofloxacina, amoxicilina) y donde fueran descritas las características operativas de estas pruebas. No hubo restricción en cuanto a las edades, tratamientos y patologías de los participantes así como de las concentraciones y combinaciones de los antibióticos en estudio.

Para la búsqueda de los artículos se utilizaron bases de datos de Medline, Science direct, Ovid y Librería Cochrane (CCTR) desde 1998 hasta el 2008. Se realizó también una búsqueda manual en revistas de gastroenterología desde 1998. La búsqueda se realizó en idioma inglés y español. Para la búsqueda se utilizó una combinación de encabezados temáticos y palabras de texto relacionadas con la detección de pruebas basadas en ácidos nucleicos para susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori* (tabla 2).

Extracción de datos. Una vez seleccionados los artículos se extrajeron de forma independiente los datos en un formato previamente estandarizado y revisado por expertos. Se obtuvieron los datos para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo mediante el uso de tablas de contingencia en caso de que no fueran expuestos por los autores. La medida de resumen “overall” fue calculada con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las características operativas de las pruebas. Los resultados de cada estudio fueron ingresados al programa RevMan 5.

Tabla 2. Estrategia de búsqueda en Science direct, Medline y Medline (ebscot)-(ovid) y Cochrane.

| |
|---|
| #1. RFLP-PCR |
| #2. Agar Dilution |
| #3. Molecular test |
| #4. Molecular testing of <i>Helicobacter pylori</i> |
| #5. Antimicrobial susceptibility |
| #6. Antimicrobial resistance |
| #7. Gastric biopsies |
| #8. Clinical isolates |
| #9. Clarithromycin |
| #10. Amoxicillin |
| #11. Levofloxacin |
| #12. Comparative- Study-Trial |
| #13. #1 or #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8 or #9 or #10 or #11 or #12 or #13 |
| #14. #1 AND #2 |
| Operador boleado: AND |
| Age group: all the groups (Egger et al, 2003). |

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Para evaluar la calidad de los artículos se realizó una lista de chequeo basándose en los parámetros de la guía para usuarios de la literatura médica (15). Los ítems de evaluación de la calidad se muestran en la tabla 3. Dos observadores realizaron de forma independiente y ciega la evaluación de calidad de los artículos, asignándole un puntaje final a cada artículo.

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

| | |
|----------|--|
| Ítem 1. | ¿Son válidos los resultados del estudio? |
| Ítem 2. | ¿Existió una comparación de la prueba en estudio con el estándar de referencia? |
| Ítem 3. | ¿Se describieron los métodos para realizar el examen con el suficiente detalle para su reproducción? |
| Ítem 4. | ¿Los resultados de las pruebas modifican el tratamiento de un paciente? |
| Ítem 5. | ¿Se ha descrito claramente la metodología de la prueba? |
| Ítem 6. | ¿Cuál fue el tamaño de la muestra de cada uno de los estudios? |
| Ítem 7. | ¿Se han establecido la susceptibilidad y la resistencia de cada una de las pruebas para <i>Helicobacter pylori</i> ? |
| Ítem 8. | ¿Se han establecido la sensibilidad y la especificidad de las pruebas a estudio o datos que permitan calcularlos? |
| Ítem 9. | ¿Se evitaron sesgos en la selección de estudios? |
| Ítem 10. | ¿Fueron reportadas las conclusiones hechas por el autor con los datos y/o análisis reportados en la revisión? |

Análisis estadístico. Para cada estudio se calcularon los parámetros diagnósticos de RFLP-PCR y dilución en agar. La posibilidad de variación entre los resultados de diferentes estudios se determinó con la gráfica de Forest Plot y el test de heterogeneidad mediante el modelo de efectos aleatorios con un alfa de 0,05 utilizando una prueba de chi cuadrado. Para evaluar si los estudios seleccionados cumplieron el requisito de homogeneidad se calculó el estadístico Q con la siguiente fórmula: (16, 17).

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (\bar{Ef}_i - Ef)^2$$

Donde:

\bar{Ef}_i es el estimador del tamaño del efecto del *i*ésimo ensayo.

Ef es el promedio de los estimadores del tamaño del efecto de los *k* ensayos y

W es el inverso de la varianza del tamaño del efecto de cada *i* ensayo clínico (varianza de cada Ef_i).

El estadístico Q se distribuye como una función de distribución χ^2 con *k*-1 grados de libertad. Para la evaluación de las características operativas se elaboró una curva ROC con sensibilidad vs. 1 - especificidad y para la exploración de sesgo de publicación se utilizó el método gráfico del embudo "Funnel Plot".

RESULTADOS

Extracción de datos

La búsqueda de literatura electrónica arrojó un total de 50 artículos los cuales fueron sometidos a evaluación por parte de expertos. De estos, 32 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. Se excluyeron aquellos artículos en los que solo se utilizaba una de las dos técnicas evaluadas y en los que no se evaluó ninguno de los tres antibióticos en estudio. Finalmente, el total de artículos utilizados para el análisis seleccionados con base a

su título y resumen teniendo de nuevo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión fueron 12; sin embargo de estos 12 solo 8 presentaron datos para el cálculo de especificidad (figura 1).

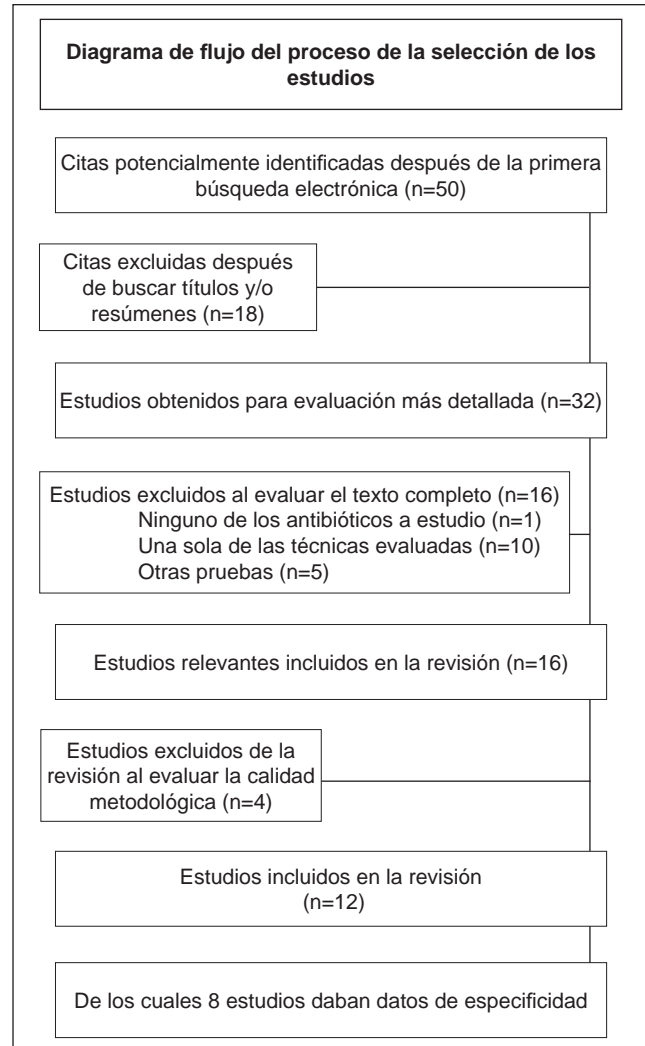


Figura 1. Selección de los estudios para la revisión sistemática de la literatura.

Los desacuerdos, como ya se mencionó en la metodología, se resolvieron por discusión entre los dos observadores y los expertos hasta llegar a un mutuo acuerdo. Los artículos seleccionados fueron: Alarcón, Baglán, Dzierzanowski, Garrido, Kobayashi, Marais, Masaoka, Mégraud, Pina, Ribeiro, Umegaki, Vega. Las características generales de estas referencias se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los estudios que comparan las pruebas dilución en agar con RFLP-PCR.

| Autor | Año | País de origen | Pruebas realizadas | No muestras | Tipo de muestras | Antibióticos evaluados | Características operativas | | | |
|----------------------------|------|----------------|--------------------|-------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|--------|--------|--------|
| | | | | | | | Sen | Esp | VPP | VPN |
| Alarcón <i>et al</i> | 2003 | España | DA, RFLP-PCR | 96 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 89,30% | 100% | 100% | 95,70% |
| Baglan <i>et al</i> | 2006 | Turkía | DA, RFLP-PCR | 28 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Dzierzanowska <i>et al</i> | 2001 | Polonia | DA, RFLP-PCR | 33 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 86,90% | 100% | 100% | 76,90% |
| Garrido <i>et al</i> | 2007 | Chile | DA, RFLP-PCR | 10 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 100% | -- | -- | -- |
| Kobayashi <i>et al</i> | 2006 | Japón | DA, RFLP-PCR | 7 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 100% | -- | -- | -- |
| Marais <i>et al</i> | 1999 | Francia | E-Test-DA, RFLP | 47 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 87,90% | 100% | 100% | 100% |
| Masaoka <i>et al</i> | 2004 | Japón | DA, RFLP-PCR | 41 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 93,30% | 90,90% | 96,50% | 83,30% |
| Mégraud <i>et al</i> | 1999 | Francia | E-Test-DA, RFLP | 516 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 91% | 100% | 100% | 99,70% |
| Pina <i>et al</i> | 1998 | Francia | DA, RFLP, DEIA | 45 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 91,30% | 100% | 100% | 91,60% |
| Ribeiro <i>et al</i> | 2003 | Brasil | DA, RFLP-PCR | 52 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 100% | -- | -- | -- |
| Umegaki <i>et al</i> | 200 | Japón | DA, RFLP-PCR | 28 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Vega <i>et al</i> | 2003 | España | DA, RFLP-PCR | 66 | Aislamientos clínicos | Claritromicina | 84,80% | -- | -- | -- |

Sen: Sensibilidad; Esp: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; DA: Dilución en agar.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Como se muestra en la figura 2, la calidad metodológica de los estudios fue adecuada en la mayoría de los aspectos evaluados: todos los estudios fueron ensayos clínicos de pruebas diagnósticas y estaba descrita claramente la metodología de las pruebas evaluadas; 11 estudios compararon la técnica PCR-RFLP con el estándar de referencia (dilución en agar) y reportaron las conclusiones hechas por los autores; 8 artículos proporcionaron los datos completos para determinar las características operativas. En lo que respecta al tamaño de la muestra se observó una gran variabilidad entre los estudios; ninguno mencionó específicamente cómo fue realizado el cálculo para el cumplimiento del objeto del estudio lo que indica una baja calidad para este aspecto en particular.

ANÁLISIS DE HETEROGENEIDAD

Basados en el análisis del gráfico de “Forest Plot” se observó una sensibilidad del 100% en 5 de 12 referencias y una especificidad de 100% en 7 de 8 referencias; recordemos que para esta última característica solo se tuvieron en cuenta 8 artículos que fueron los que tenían datos para el cálculo. Esta gráfica también mostró intervalos de confianza muy variados entre las características operativas, debido probablemente al número de falsos positivos y falsos negativos presentes en cada estudio. Con respecto a la medida de resumen “overall” se calculó el valor global de la sensibilidad y especificidad y sus intervalos de confianza (S = 0,91 IC 95% 0,88-0,94) y (E = 0,99 IC 95% 0,91; 1) $p < 0,0001$ (figura 3).

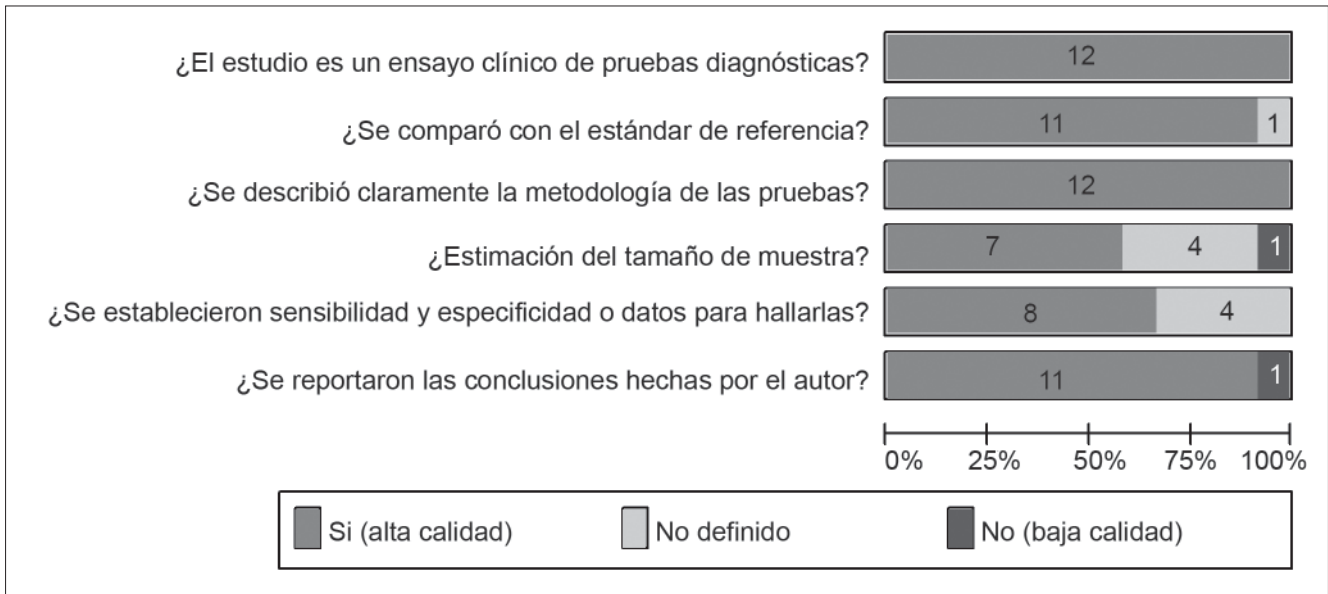


Figura 2. Evaluación de la calidad de los estudios incluidos en la revisión sistemática de la literatura.

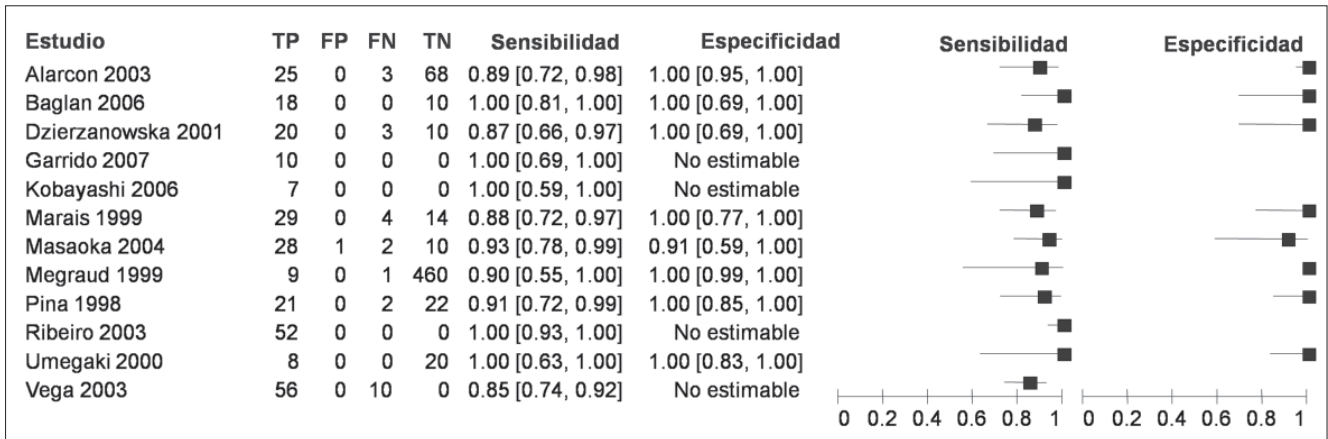


Figura 3. Características operativas de RFLP-PCR vs. dilución en agar para todos los estudios.

Adicionalmente el cálculo del estadístico de Q estimó el grado de heterogeneidad para sensibilidad y especificidad, concluyendo que los estudios no son heterogéneos ($p = 0,78$) y ($p = 0,99$) respectivamente.

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS POR MEDIO DE CURVAS ROC

Con respecto a la curva ROC, se observó que los estudios que tuvieron mayor área bajo la curva fue-

ron Umegaki y Baglán, puesto que ambos artículos presentaron una sensibilidad y una especificidad del 100%; el estudio que presentó la menor área bajo la curva fue el de Masaoka, ya que su sensibilidad fue del 93,3% y su especificidad del 90,9%. Los demás estudios presentaron diferentes porcentajes de sensibilidad, mientras que la especificidad estuvo alrededor del 100% (figura 4).

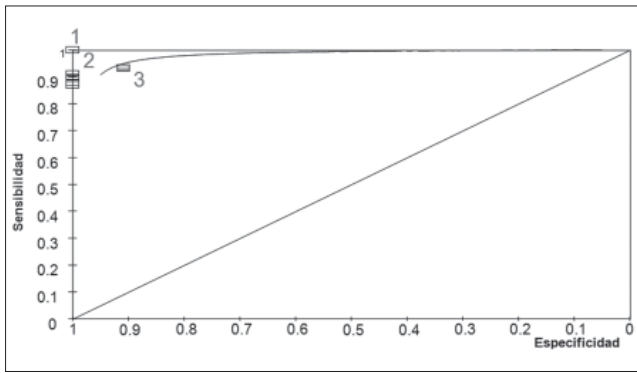


Figura 4. Curva ROC: Características operativas de RFLP-PCR vs. dilución en agar para todos los estudios. Baglan; 2. Umegaki; 3. Masaoka.

Sesgos de publicación

Para evaluar la presencia de sesgos en este estudio, se utilizó el gráfico de embudo “Funnel Plot”. En este se graficó el error estándar (precisión de la muestra) vs. la sensibilidad y la especificidad del estudios (tamaño del efecto evaluado). El gráfico de embudo mostró asimetría hacia la izquierda, lo que indica posible presencia de sesgos de publicación (figuras 5 y 6).

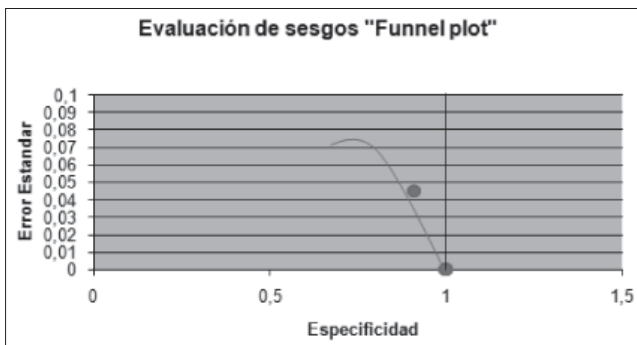


Figura 5. Funnel plot para sensibilidad.

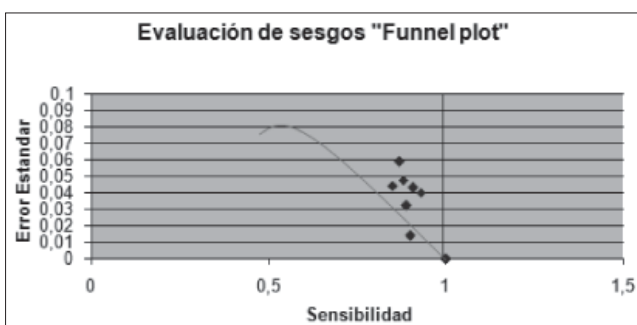


Figura 6. Funnel plot para especificidad.

Análisis de datos según región geográfica

Se clasificaron los estudios de acuerdo al lugar en donde se realizaron las pruebas. Las regiones identificadas fueron: Europa, Asia y América Latina.

El primer grupo poblacional fue el correspondiente a los estudios realizados en Europa, y el que más estudios presentó (7/12). En cuanto a sensibilidad, 6 de los 7 estudios mostraron sensibilidades entre el 85% al 91% y solo uno mostró un sensibilidad del 100%. En el artículo de Mégraud se observó un intervalo de confianza poco preciso (55%-100%) posiblemente por la presencia de un falso negativo.

El segundo grupo poblacional fue el correspondiente a Asia, con el 25% de los estudios (3/12). El estudio de Umegaki presentó sensibilidad y especificidad del 100%; el estudio de Kobayashi no proporcionó datos para calcular especificidad y los estudios de Masaoka y Kobayashi mostraron una sensibilidad del 100%. El intervalo de confianza de menor precisión fue el del estudio de Kobayashi para sensibilidad y el de Masaoka para especificidad (59%-100%).

El tercer grupo poblacional fue el de América latina, al cual correspondieron el 17% de los estudios seleccionados (2/12); ambos estudios solo proporcionaron datos para calcular sensibilidad la cual fue del 100%. Con respecto al estudio de Garrido, se observó un intervalo de confianza poco preciso (69%-100%) debido a un número de muestra pequeño.

En cuanto a la hipótesis planteada se puede decir que no existe evidencia estadísticamente significativa para concluir que más del 90% de la literatura seleccionada reporte valores de sensibilidad y especificidad de RLFP-PCR frente a dilución en agar superiores al 95%, $p > 0,05$.

DISCUSIÓN

Cada vez es más frecuente la utilización de las pruebas basadas en ácidos nucleicos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana a través de la detección de mutaciones asociadas con resistencia, debido no solo a su especificidad, sino a la rapidez en desarrollo de la prueba y la obtención de resultados.

Estas razones hacen preciso conocer las características operativas de las pruebas basadas en ácidos nucleicos más utilizadas con el fin de obtener resultados más confiables. La RS es un tipo de estudio que permite llevar a cabo este objetivo por medio de la búsqueda y exploración de estudios realizados con estas pruebas y su análisis estadístico.

Durante el desarrollo de este estudio se observó poca disponibilidad de artículos sobre el tema, pues si bien es cierto, que el uso de técnicas basadas en ácidos nucleicos es cada vez más frecuente, estas se utilizan de forma individual o directa, sin asociarse o compararse con un método de referencia como es la dilución en agar; además, en aquellos artículos en los que se utilizó una técnica basada en cultivo para determinar susceptibilidad antimicrobiana (previa a la detección de mutaciones asociadas a resistencia) fueron más comúnmente usadas técnicas como la prueba del epsilómetro (E-test) o difusión en disco, debido a que son de más fácil implementación (18).

Los análisis de una revisión sistemática dependen en gran parte del valor global obtenido "overall"; para nuestro caso el resultado global fue evaluado tanto para sensibilidad como para especificidad con respecto a la resistencia a claritromicina.

Fueron considerados como resultados positivos los aislamientos resistentes a claritromicina, ya que posteriormente se buscaba la presencia de mutaciones mediante la técnica basada en ácidos nucleicos (RFLP-PCR).

Con respecto al valor de la especificidad, no todos los estudios proporcionaron datos para determinarla, ya que algunos tomaron como número muestral solo las cepas definidas como resistentes por el método de dilución en agar. Sin embargo, dentro de los estudios que permitieron calcular especificidad, el valor global de esta fue del 100% (IC 95% 91-100), demostrando una baja probabilidad de falsos positivos. En cuanto a la sensibilidad, se observó que los valores son menos precisos $S = 91\%$ (IC 95% 88-94) lo que nos permite afirmar que existe una mayor probabilidad de tener resultados falsamente negativos. Esto debido probablemente a que las cepas resistentes por

dilución en agar sólo se les identificaron las mutaciones más frecuentes, sin embargo, el hecho de que la prueba no determine la mutación, no quiere decir que la cepa no sea resistente, pues es muy probable que presente otras menos comunes. Las mutaciones detectadas y asociadas principalmente a resistencia en *H. pylori* en los estudios fueron A2142G, A2143G y A2144G reportadas por 7, 12 y 4 artículos respectivamente (10, 18-28). Estos resultados son de gran importancia para las personas que utilizan estos métodos tanto en el área clínica como en investigación, pues aunque son bien expuestas las ventajas de estos, otra situación es la que se presenta al momento de tomar decisiones basados en sus resultados, sobre todo al momento de generalizar una medicación.

Con respecto a la calidad de los artículos es importante resaltar que todos los estudios seleccionados fueron diseñados mediante ensayos clínicos de pruebas diagnósticas, lo que permite disminuir el sesgo de selección y la aleatorización admite aumentar la precisión de los resultados. Con respecto a la comparación con un *Gold Standard* se observó que solo un artículo (23) no relacionó el total de las muestras con el estándar de referencia (dilución en agar), por tanto solo se calcularon las características operativas para el número de muestras en el que se tuvo en cuenta la comparación con el fin de disminuir el sesgo de incorporación el cual puede sobreestimar la sensibilidad y especificidad (29).

La curva ROC mostró que el artículo que presentó menor área bajo la curva fue el de Masaoka 2004, ya que mostró valores de sensibilidad y especificidad del 93% y del 91% respectivamente, debido a la presencia tanto de falsos positivos como de falsos negativos.

Los sesgos de publicación se evaluaron mediante el uso de las gráficas de embudo "Funnel Plot", que mostraron asimetría para ambas características operativas (especificidad y sensibilidad); aunque el sesgo de publicación ha sido asociado con asimetría en la gráfica de embudo, es importante recalcar que también debe ser considerado como un recurso genérico para examinar si los estudios pequeños tienden a mostrar efectos de tratamientos o de técnicas más

grandes (30). Dado que los artículos incluidos en este estudio presentaron tamaños de muestra reducidos, es posible que se hayan sobrestimado los resultados que favorezcan a las características operativas. El sesgo de publicación también pudo ser generado por la tendencia de la literatura médica de publicar estudios con resultados positivos, reduciendo la posibilidad de encontrar estudios con resultados negativos (17).

Durante la búsqueda de los artículos se encontró que la técnica de RFLP-PCR fue la más usada para detectar mutaciones asociadas a claritromicina, pero no se encontraron artículos donde refirieran esta técnica como método para detectar mutaciones en amoxicilina o levofloxacina, lo que limitó el análisis de esta prueba a solo un antibiótico.

En cuanto al análisis por regiones se encontró que la región que más estudios desarrolló fue la de Europa, presentando los mejores datos de especificidad en contraste con los datos de sensibilidad que fueron muy variados; la región de América Latina presentó mejores datos de sensibilidad (100%); sin embargo, esta región fue en la que menos publicaciones se encontraron con respecto a las otras regiones, y puede deberse a la poca exploración de técnicas basadas en ácidos nucleicos y a la falta de recursos para implementar la técnica de RFLP-PCR. Con respecto a la región de Asia, el estudio de Kobayashi mostró un tamaño de muestra pequeño, evidenciándose en un intervalo de confianza poco preciso.

Aunque la mayoría de los estudios no cumplieron con los porcentajes de las características operativas planteados en la pregunta de investigación (Sen y Esp superiores a 95%), se obtuvieron cifras buenas principalmente para especificidad, pues en el 87% de los artículos se observó que fue del 100%. Sin embargo, debido al número limitado de artículos encontrados sobre este tema, es anticipado pensar que las características operativas de esta técnica no son buenas con respecto a la prueba de referencia.

CONCLUSIONES

1. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa de los polimorfismos en la longitud de fragmentos

de restricción (RFLP-PCR) no presentó características operativas iguales o superiores al 95%, comparada con el estándar de referencia dilución en agar. Por lo tanto la técnica de dilución en agar se debe considerar la técnica de elección a pesar de que sea dispendiosa su ejecución.

2. La sensibilidad y especificidad global de la técnica de RFLP-PCR con respecto a la dilución en agar en claritromicina fue del 91% y 99% respectivamente.
3. No se encontró información disponible de las características de la prueba de RFLP-PCR para determinar resistencia a los antibióticos amoxicilina y levofloxacina, por lo cual no pudo ser comparada con la técnica de referencia de dilución en agar.
4. El análisis estadístico mostró que los estudios incluidos en esta revisión sistemática fueron homogéneos.
5. Hasta el momento no se han realizado estudios experimentales ni revisiones sistemáticas de la literatura que comparen las características operativas de la pruebas basadas en ácidos nucleicos (RFLP-PCR) con la dilución en agar para determinar susceptibilidad antimicrobiana para *H. pylori* en Colombia. Por lo anterior, consideramos de suma importancia iniciar este tipo de estudios dada la aparición cada vez más frecuente de cepas de *H. pylori* resistentes a los diferentes antimicrobianos, lo cual exigirá la disponibilidad de datos sobre susceptibilidad del microorganismo para proponer nuevos esquemas de erradicación.

REFERENCIAS

1. Malfertheiner P, Megraud F, O'Moraim C, Bazzoli F, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Masstricht III, consensus Report. Gut online. Enero 17, 2008.
2. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6: 699-709.
3. Kuipers E, Thijs JC, Festen H. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther 1995; (suppl 2): 59-69.

4. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, Badel A, Bravo PA. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica* 2003; 34 (3): 124-131.
5. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-80.
6. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment. *Drug Resistance Updates* 2001; 4: 178-186.
7. Coyle Marie B. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Capítulo 5. Department of Laboratory Medicine and Microbiology. Organización panamericana de la salud, University of Washington Edit, Editora Coordinadora. Washington-USA. 2000.
8. Piccolomini R, Bonaventura G Di, Catamo 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. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1842-6.
9. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 283-86.
10. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvenuto YH, Godoy AP, Mendonca S, Pedrazzoli J. Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2003; 2: 11.
11. Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutation Research* 1997; 387: 97-121.
12. Vallejos C, Cerda O, Valenzuela M, Toledo H. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. *Revista Médica de Chile* 2003; 131: 1313-1320.
13. Beltrán O. Revisiones sistemáticas de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20(1): 60-69.
14. Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health Care: Meta-Analysis in Context*. Segunda edición. Londres-Gran Bretaña. Editorial BMJ Publishing Group. 2001. p. 23-459.
15. Jaeschke R, Gordon H, Guyatt MD y Sackett DL. Guías para usuarios de la literatura médica, parte B ¿Cuáles son los resultados?, ¿me ayudarán a la asistencia de mis pacientes? *JAMA España* 1997. p. 703-707.
16. Dersimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7: 177-188.
17. Bermúdez M, Pérez A, Morillo L. Apreciación crítica de un artículo que presenta una revisión sistemática de la literatura en salud. Programa de actualización médica permanente 2000; 52: 2-15.
18. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, Unge P, Van Zanten SV, Wrangstadh M, Burman CF. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999; 43(11): 2747-2752.
19. Alarcón T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. 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* 2003; 41(1): 486-488.
20. Baglan PH, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayi AM, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and Icea Gene status in *Helicobacter pylori* Clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *Journal of microbiology* 2006; 44(4): 409-416.
21. Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Józwiak P, Celinska-Cedro D, Madalinski K, Dzierzanowska D. Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from children in Poland. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 18: 387-390.
22. Garrido L, Toledo H. Novel Genotypes in *Helicobacter Pylori* involving Domain V of the 23S rRNA Gene. *Helicobacter* 2007; 12: 505-509.
23. Kobayashi I, Saika T, Muraoka H, Murakami K, Fujioka T. *Helicobacter pylori* isolated from patients who later failed H. pylori eradication triple therapy readily developed resistance to clarithromycin. *Journal of medical microbiology* 2006; 55: 737-740.
24. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Mégraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a poly-

- merase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut* 1999; 44: 463-467.
25. Masaoka T, Suzuki H, Kurabayashi K, Kamiya AG, Ishii H. Second-line treatment of *Helicobacter pylori* infection after dilution agar and PCR-RFLP analysis. *Aliment pharmacol ther* 2004; 20: 68-73.
 26. Pina M, Occhalini A, Moteiro L, Doermann HP, Mégraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin Hybridization in liquid Phase. *Journal of clinical microbiology* 1998; 36(11): 3285-3290.
 27. Umegaki N, Shimoyama T, Nishiya D, Suto T, Fukuda S, Munakata A. Clarithromycin-resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2000; 15: 906-909.
 28. Vega AE, Alarcón T, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults. *Revista española de quimioterapia* 2003; 16(1): 53-57.
 29. Biggerstaff BJ. Comparing diagnostic tests: a simple graphic using likelihood ratios. *Stat Med* 2000; 19 (5): 649-663.
 30. Clarke M, Oxman AD, editores. Manual de revisores Cochrane 4.1.6. Actualizado enero de 2003. <http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook/handbook.htm> (con acceso el 29 de julio de 2008).

Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*

Marcela Rey Arévalo¹, Jenny Mireya Ávila Coy¹,
Alba Alicia Trespalacios Rangel², Olga Raquel Villamizar Beltrán³,
William Otero Regino⁴, Marcela María Mercado Reyes⁵

1. Estudiante de Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

2. Profesor Asociado MSc. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

3. Profesor Auxiliar Esp. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

4. Profesor Asociado de Medicina MD. Coordinador de Gastroenterología. Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo Clínica Fundadores. Bogotá, Colombia.

5. Profesor Asistente MSc. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Correspondencia: mmercado@javeriana.edu.co

Recibido: 20-08-08 / Aceptado: 25-11-08

Resumen

Numerosos métodos han sido desarrollados para detectar la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos. Aunque la dilución en agar es el método de referencia recomendado por el Clinical Laboratory Standards Institute, no es una técnica que resulte fácil de ejecutar en laboratorios de rutina. Por esta razón diversas técnicas surgen como alternativa de análisis, entre ellas la prueba de E-test. El objetivo de esta investigación fue comparar las características operativas del E-test con la prueba de referencia dilución en agar, para la determinación de susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a amoxicilina, claritromicina y levofloxacina. Las características operativas de los estudios fueron obtenidas por medio de tablas de contingencia, el análisis se realizó en el programa RevMan 5®.

Un total de 68 referencias fueron analizadas; 8 cumplieron con los criterios de inclusión. Se analizaron como medidas de resumen "overall" la sensibilidad y especificidad de la prueba del E-test. El 87% de los artículos mostraron sensibilidad de 100%, y el 75% especificidad de 100%. La medida de resumen obtenida para sensibilidad fue de 99% (IC 95% 98 - 99%) y especificidad de 98% (IC95% 97 - 99%). El test de heterogeneidad mostró estudios homogéneos en sensibilidad y especificidad ($p = 0.82$) ($p = 0.99$). Las gráficas de "Funnel Plot" revelaron asimetría. La sensibilidad (99%) y especificidad (98%) de la técnica de E-test presentó excelente acuerdo, en especial para el antibiótico claritromicina, sin embargo no existe evidencia estadísticamente significativa para concluir que más del 90% de la literatura seleccionada, reporte valores de sensibilidad y especificidad del E-test superiores al 95% comparadas con la dilución en agar.

Palabras clave: dilución en agar, E-test, *Helicobacter pylori*, susceptibilidad antimicrobiana.

Abstract

E-Test sensitivity and specificity for determination of antimicrobial susceptibility in clinical isolation of *Helicobacter pylori*

Numerous methods have been developed to detect *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobials. The agar dilution is the reference method recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute. However, it is not an easy technique that could be implemented at the laboratory routine. It must have sufficient time for preparation and handling of many culture mediums with different antibiotic concentrations. For that reason, several techniques emerge as an alternative of analysis, including E-test: an agar diffusion method, which consists of a strip with an antibiotic concentration gradient, which by reading an ellipse inhibition allows knowing the minimum inhibitory concentrations (MICs). These studies' operative characteristics were obtained by means of contingency tables. The analysis was done using the program RevMan 5®.

From a total of 68 analyzed references, 8 reached the inclusion criteria. E-test sensitivity and specificity were analyzed as overall summary measures. 87% of the articles showed 100% sensitivity, and 75% showed 100% specificity. The summary measured obtained for sensitivity was 99% (IC 95% 98 - 99%) and 98% specificity (IC95% 97 - 99%). Heterogeneity tests showed homogenous studies in sensitivity and specificity ($p = 0.82$) ($p = 0.99$). Funnel Plot graphics showed asymmetry. E-test sensitivity (99%) and specificity (98%) showed excellent agreement, especially for claritromicine; however, there is no significant statistical evidence to conclude that more than 90% of the selected literature reports values of E-test sensitivity and specificity higher than 90% when compared to Agar dilution.

Keywords: agar dilution, antimicrobial susceptibility, E-test, *Helicobacter pylori*.

Introducción

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) desde su descubrimiento por Marshall y Warren en 1983 (1) ha sido uno de los acontecimientos científicos de mayor importancia en la literatura biomédica mundial. Esta bacteria se considera el agente causal de la gastritis aguda y crónica; se encuentra asociada con úlcera péptica, carcinoma y linfoma gástrico. Se estima que entre el 50% y el 60% de la población mundial está infectada por esta bacteria, pero la distribución es diferente entre países, razas y nivel socioeconómico (3). La colonización por *H. pylori* aumenta con la edad y la infección aparece en personas en condición socioeconómica baja y en países en vías de desarrollo, con deficientes condiciones sanitarias (2,3).

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 (4).

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 (5). 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*.

Por la 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 la difusión en disco, microdilución en caldo, E-test y la dilución en agar (DA). Este último establecido como método de referencia por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

(NCCLS) y actualmente *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (6). El E-test (método epsilómetro) es altamente concordante con el método de referencia y su uso está recomendado por la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) (7).

Las ventajas de la prueba de DA incluyen la reproducibilidad de los resultados y el desarrollo satisfactorio de la mayoría de los microorganismos de difícil crecimiento. Sin embargo, entre sus desventajas están la compleja metodología requerida para su desarrollo y el alto costo por prueba. Generalmente la DA 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 (8). 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 DA entregando una sofisticada pero fácil y reproducible metodología.

El tema de la reproducibilidad de las pruebas y su adecuada utilización es de gran importancia al momento de realizar diagnósticos certeros sobre la sensibilidad o resistencia de un microorganismo hacia los antimicrobianos, 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.

El presente estudio evaluó si las características operativas de sensibilidad y especificidad de la prueba E-test, eran iguales o superiores en un 95% a las del estándar de referencia DA, en al menos el 90% de la literatura científica seleccionada para los antibióticos más utilizados en la terapia erradicadora de primera línea de *H. pylori* en Colombia (claritromicina, amoxicilina y levofloxacina).

Para la realización de esta investigación se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura que permitió conocer el estado del arte mundial de las pruebas basadas en cultivo, con miras a explorar la posibilidad de implementar el E-test en nuestro país, como prueba de rutina hospitalaria en la determinación de resistencia a los antimicrobianos más utilizados para la erradicación de este microorganismo.

Materiales y métodos

La revisión sistemática de la literatura es un tipo de diseño de investigación que recopila y sintetiza los resultados de múltiples investigaciones con el objetivo de realizar una evaluación crítica que permite resumir el efecto de una intervención clínica o una prueba diagnóstica. Son

Tabla 1. Etapas de la revisión sistemática (14)

| | |
|---|---|
| 1. Definir pregunta de investigación. | 4. Selección del estudio. |
| 2. Definir los criterios de inclusión y exclusión. | a. Debe poderse verificar por más de un Observador. |
| a. Participante. | b. Debe resolver desacuerdos como desarrollo de Estrategias. |
| b. Intervenciones y comparaciones. | c. Deben eliminar estudios por razón de exclusión. |
| c. Información externa. | 5. Evaluación de la calidad de los estudios: formatos predeterminados o listas de chequeo. |
| d. Diseño del estudio y metodología. | 6. Extracción de datos: gráfica de efectividad clínica "forest plot". |
| 3. Localización de los estudios. | 7. Análisis estadístico: exploración de heterogeneidad y sesgos de publicación "funnel plot". |
| a. Registros. | 8. Interpretación de resultados: publicaciones incluidas, sesgos implicaciones económicas y futuros estudios. |
| b. Bases electrónicas. | |
| c. Listas de chequeo y verificación. | |
| d. Información personal de expertos acreditados en el tema. | |

Tabla 2. Estrategia de búsqueda en SCIENCE DIRECT, MEDLINE y MEDLINE (ebscohost)-[ovid] y librería Cochrane

Se realizó mediante la combinación de los siguientes encabezados temáticos:

- #1: Antimicrobial agents.
 - #2: Testing susceptibilities.
 - #3: Agar dilution.
 - #4: E-test.
 - #5: Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*.
 - #6: Agar dilution AND E-test of *Helicobacter pylori*.
 - #7: Clarithromycin
 - #8: Amoxicillin.
 - #9: Levofloxacin.
 - #10: COMPARATIVE - STUDY-TRIAL
 - #11: #1 or #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8 or #9 or #10 # 11
 - #12: (#3 AND #4)
- Operador booleano:** AND
Age group: all the groups
(Egger et al., 2003).

parte esencial de la medicina basada en la evidencia por su rigurosa metodología, logrando identificar los estudios relevantes para responder preguntas específicas de la práctica clínica, Tabla 1 (12,13).

Selección de artículos

Se incluyeron artículos de pruebas diagnósticas publicados entre 1995 y 2008, que determinaron la susceptibilidad de *H. pylori* a claritromicina, levofloxacina y amoxicilina por las técnicas de E-test y DA. Sólo se incluyeron artículos en donde fueran descritas las características operativas de estas pruebas. No se contempló restricción en cuanto a las edades, tratamientos y patologías gástricas asociadas a *H. pylori* de los participantes así como de las concentraciones y combinaciones de los antibióticos en estudio.

La búsqueda de los estudios se realizó en las bases de datos de MEDLINE, SCIENCE DIRECT, OVID y librería COCHRANE (CCTR) desde 1995 hasta el 2008. Además de la búsqueda computarizada se realizó una búsqueda manual en revistas de gastroenterología desde 1995. Para la indagación se utilizó una combinación de encabezados temáticos y términos relacionados con la detección de pruebas basadas en cultivos para susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*. Las estrategias de búsqueda utilizadas para todas las bases de datos se presentan en la Tabla 2.

Selección de datos

Después de la selección de los artículos se sacaron de forma independiente los datos de cada estudio en un formato previamente estandarizado y revisado por expertos. De cada uno de los estudios elegidos se obtuvieron datos para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo mediante el uso de tablas de contingencia en caso de que no fueran expuestos por los autores. La medida de resumen "overall" fue calculada con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las características operativas de las pruebas. El conjunto de resultados de las características operativas de cada estudio fue analizado mediante el uso del programa RevMan 5 de la Biblioteca COCHRANE.

Evaluación de la calidad metodológica

La calidad de los artículos fue evaluada mediante el uso de una lista de chequeo basada en los parámetros de las guías para usuarios de la literatura médica (14). Los ítems de evaluación de la calidad se muestran en la Tabla 3. Dos observadores realizaron de forma independiente la evaluación de la calidad de los artículos, asignándole un puntaje final a cada uno de ellos. Los desacuerdos fueron resueltos con la ayuda de expertos por medio de discusión de acuerdo a los criterios establecidos.

Tabla 3. Lista de chequeo utilizada para los estudios

1. Son validos los resultados del estudio:
 - a) ¿existió una comparación de la prueba con un patrón de referencia?
 - b) ¿Redescribieron los métodos para realizar el examen con suficiente detalle para su reproducción?
 - c) ¿Los resultados de las pruebas modifican el tratamiento de un paciente?
 - d) ¿Se ha descrito claramente la prueba?
 - e) ¿El tamaño de muestra de los estudios fue?
 2. ¿Se estableció la susceptibilidad y resistencia de cada unas de las pruebas para *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos claritromicina, amoxicilina y levofloxacina?
 3. ¿Se estableció la sensibilidad y especificidad de las pruebas a estudio o datos que permitieran calcularlos?
 4. ¿Se evitaron sesgos en la selección de los estudios?
 5. ¿Fueron reportadas las conclusiones hechas por el autor con los datos y/o análisis reportados en la revisión?
 6. ¿Cómo califica la calidad científica de esta revisión? (escala de 1 a 5, observando si las fallas fueron extensas, mayores y mínimas).
- *Parámetro tomado de las guías para usuarios de literaturas medicas parte B. (14)

Análisis estadístico

Se calcularon los parámetros diagnósticos de las pruebas E-test y DA para cada estudio. La variación entre los resultados de diferentes estudios se determinó con el test de heterogeneidad (Forest plot), mediante el modelo de efectos aleatorios con un alfa de 0.05 utilizando una prueba de Chi cuadrado. Para analizar hasta qué punto los resultados de los diferentes estudios podían combinarse en una única medida, se realizó la evaluación del grado de heterogeneidad, mediante el cálculo del estadístico de Q utilizando la siguiente fórmula: (22)

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (Ef_i - Ef)^2$$

Fórmula: de Heterogeneidad (18).

Donde:

Ef_i : representa el estimador del tamaño del efecto del i -ésimo ensayo.

Ef : representa el promedio de los estimadores del tamaño del efecto de los k ensayos combinados.

W_i : representa el inverso de la varianza del tamaño del efecto de i -ésimo ensayo clínico (varianza de cada Ef_i).

El estadístico Q se distribuye como una función de distribución χ^2 con $k-1$ grados de libertad y la hipótesis nula indica que los tamaños del efecto a través de los

ensayos clínicos son homogéneos (23). La exploración gráfica de las características operativas, se evaluó mediante la elaboración de la curva ROC con sensibilidad vs 1-especificidad y la búsqueda de sesgo de publicación se analizó mediante el uso del método gráfico del embudo "Funnel Plot". Los artículos excluidos se resumieron en una tabla que contenía el nombre del estudio, autor, año de publicación y el motivo de la exclusión.

Resultados

Selección de datos

La búsqueda de literatura electrónica arrojó un total de 68 artículos, los cuales fueron sometidos a evaluación por parte de expertos. De éstos, 28 cumplieron los criterios de inclusión previamente establecidos. Se excluyeron aquellos artículos en los que sólo se utilizaba una de las dos técnicas evaluadas, además de aquellos en los que no se evaluó ninguno de los tres antibióticos en estudio (claritromicina, amoxicilina y levofloxacina). Después de esta primera selección se analizaron por lectura completa cada uno de los artículos por dos evaluadores, quienes diligenciaron la lista de chequeo previamente establecida para este fin y resolvieron por discusión los posibles desacuerdos. En número final de artículos que cumplieron estas características fue de 8: Best, Dzieranowka, Khan, Megraud, Osato, Piccolomimi, Wang y Dore, Tabla 4 (11,15-21).

Tabla 4. Características de los estudios que comparan el E-test con la Dilución en Agar.

| Autor | Año | País de Origen | Pruebas Realizadas | No. Muestra | Tipo de Muestra | Antibióticos Evaluados | Características Operativas | | | |
|--------------|------|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|------------------------|----------------------------|------------|--------------|--------------|
| | | | | | | | S (IC 95%) | E (IC 95%) | VPP (IC 95%) | VPN (IC 95%) |
| Best. M.L. | 2003 | Canada | E-test - DA. | 13 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Dore. P. | 1999 | USA - Italia | E-test - DA. | 16 ^a | AC | Amoxicilina | 100% | 67% | 92% | 100% |
| Dzierzonawka | 2001 | Polonia | E-test - DA. | 98 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Khan Rasel | 2004 | Bangladesh | E-test - DA. | 16 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Megraud. F. | 1999 | Francia | E-test - DA. | 474 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Osato. M. | 2001 | USA | E-test - DA. | 332 | AC | Claritromicina | 93,40% | 98,30% | 95,50% | 97,50% |
| Piccolomini | 1997 | Italia | E-test - DA. | 71 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Piccolomini | 1997 | Italia | E-test - DA. | 71 | AC | Amoxicilina | 100% | ND | 100% | ND |
| Wang W.H. | 2000 | Hong kong | E-test - DA. | 87 | AC | Claritromicina | 100% | 100% | 100% | 100% |

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo y VPN: valor predictivo negativo. AC: aislamientos clínicos a partir de patologías gástricas, DA: dilución en Agar y ND: no hay dato.

Los datos de las características operativas (sensibilidad y especificidad) sacados de los artículos seleccionados fueron consignados en tablas de contingencia y posteriormente procesados en el programa RevMan 5¹, Figura 1.

Evaluación de la calidad metodológica

La calidad de cada uno de los estudios fue valorada mediante el uso de la lista de chequeo previamente

mencionada. La Figura 2 muestra que la calidad de los estudios fue buena en la mayoría de los aspectos evaluados; 7 (87%) de los estudios fueron ensayos clínicos de pruebas diagnósticas, todos compararon la prueba E-test con el patrón de referencia y contenían los datos para calcular la sensibilidad y especificidad y 1 (12%) se basó en la recopilación de datos a partir de historias clínicas. 5(62%) artículos presentaron un espectro superior al 50% y 3 no

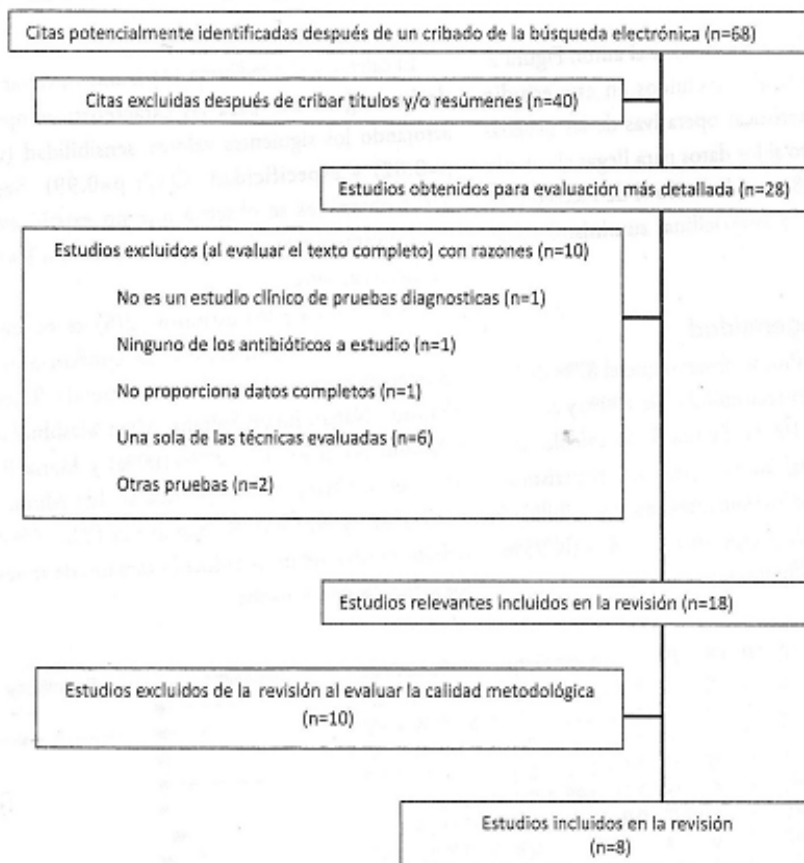


Figura 1. Selección de los estudios

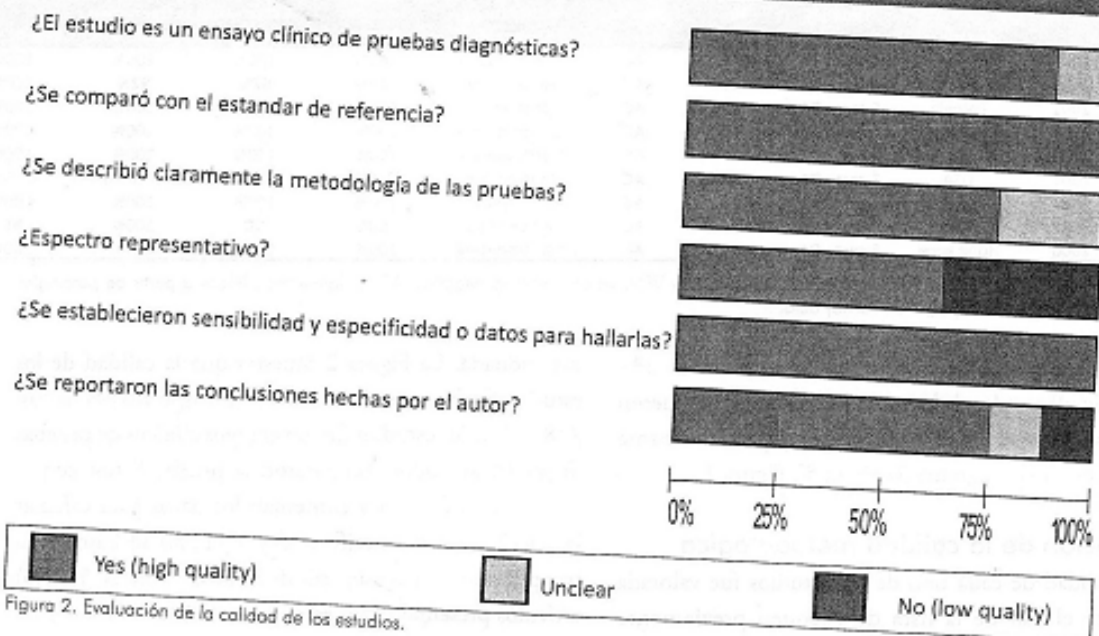


Figura 2. Evaluación de la calidad de los estudios.

reportaron las conclusiones hechas por el autor, Figura 2.

Ninguno de los artículos incluidos en este estudio proporcionó las características operativas de las pruebas de forma explícita, pero si los datos para llegar al cálculo de las mismas. De los 8 artículos, sólo el de Piccolomini (11), para el antibiótico amoxicilina, suministró datos para sensibilidad.

Análisis de heterogeneidad

En el gráfico Forest Plot se observó que el 87% de los artículos (7/8) presentaron sensibilidad de 100% y el 75% (6/8) especificidad del 100%, Figura 3. Se calculó una medida de resumen global "overall" para las características operativas, el cual entregó los siguientes datos: sensibilidad 99% (IC95% 0.98-0.99) y especificidad 98% (IC95% 0.97-0.99) $p < 0,0001$, Figura 3.

El cálculo del estadístico Q permitió estimar el grado de heterogeneidad para las características operativas, arrojando los siguientes valores: sensibilidad ($Q=0.87$; $p=0.82$) y especificidad ($Q=7$; $p=0.99$). Según los datos obtenidos se observó que no existió evidencia estadísticamente significativa para afirmar que los estudios son heterogéneos.

En el 25% de los estudios (2/8) se observó una variabilidad en los intervalos de confianza entre las características operativas para los estudios de: Rasel Khan, Shamsun Nahar, Jinath Sultana, Mian Mashhud Ahmad y Motiur Rahman (17) (29%-100%) y María P. Dore, Michael S. Osato, Giuseppe Realdi, Ida Mura, David Y. Graham y Antonia R. Sepúlveda (21) (9%-99%), debido posiblemente al reducido tamaño de muestra de los artículos relacionados.

| Study | TP | FP | FN | TN | Sensitivity | Specificity |
|--------------------|-----|----|----|-----|-------------------|-------------------|
| Best 2003 | 6 | 0 | 0 | 7 | 1.00 [0.54, 1.00] | 1.00 [0.59, 1.00] |
| Dore 1999 | 13 | 1 | 0 | 2 | 1.00 [0.75, 1.00] | 0.67 [0.09, 0.99] |
| Dzlerzanowska 2001 | 75 | 0 | 0 | 23 | 1.00 [0.95, 1.00] | 1.00 [0.85, 1.00] |
| Khan 2004 | 3 | 0 | 0 | 13 | 1.00 [0.29, 1.00] | 1.00 [0.75, 1.00] |
| Megraud 1999 | 460 | 0 | 0 | 14 | 1.00 [0.99, 1.00] | 1.00 [0.77, 1.00] |
| Osato 2001 | 85 | 4 | 6 | 237 | 0.93 [0.86, 0.98] | 0.98 [0.96, 1.00] |
| Piccolomini 1997 | 67 | 0 | 0 | 4 | 1.00 [0.95, 1.00] | 1.00 [0.40, 1.00] |
| Wang 2000 | 77 | 0 | 0 | 10 | 1.00 [0.95, 1.00] | 1.00 [0.69, 1.00] |

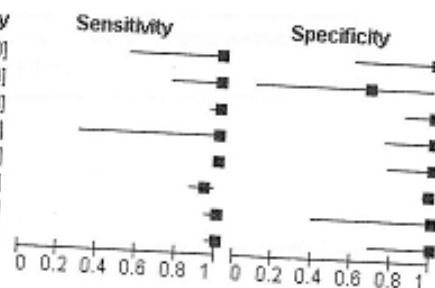


Figura 3. Forest plot: características operativas de E-test vs. Dilución en agar para todos los estudios.

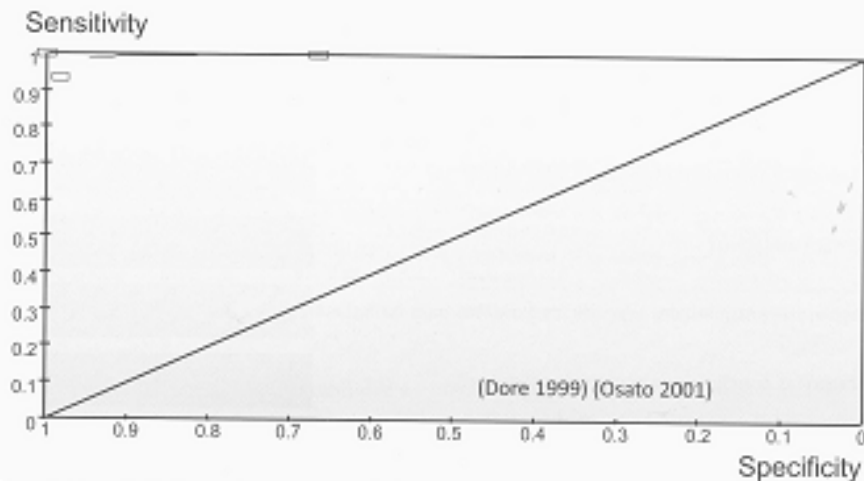


Figura 4. Curva ROC: Características operativas de E-test vs. Dilución en agar para todos los estudios.

Evaluación de las características operativas por medio de curvas ROC

En la curva ROC se observó que el 87% de los estudios (7/8) presentaron mayor área bajo la curva, esto se debió a que la sensibilidad y especificidad de estos estudios eran mayores al 95%, mientras que sólo un estudio presentó una especificidad baja. El estudio que mostró un menor valor de área bajo la curva fue el de María P. Dore y colaboradores, 2001, Figura 4 (21).

Sesgos de publicación

La presencia de sesgos en este estudio fue evaluada utilizando el gráfico de embudo (Funnel Plot) (24) o también llamado gráfico de dispersión (scatter plots). El Funnel Plot grafica el error estándar (precisión de la muestra) vs la sensibilidad y la especificidad de cada estudio (tamaño del efecto evaluado). El gráfico de embudo mostró ausencia de simetría hacia la izquierda,

lo que indica posible presencia de sesgos de publicación, Figura 5 y 6.

Análisis por grupo antimicrobiano

En el 87% (7/8) del total de los estudios se encontró que el antibiótico de mayor investigación para las prueba E-test y el método de referencia fue la claritromicina, en el gráfico forest plot se observa que el 86% (6/7) de los artículos que exploraron dicho antibiótico presentaron sensibilidad y especificidad del 100%, Figura 7

El segundo antibiótico encontrado en esta revisión fue la amoxicilina, con una sensibilidad del 100% para sólo dos artículos. El estudio de Raffaele Piccolomini, Giovanni Di Bonaventura, Giovanni Caramo, Flavia Carbone y Matteo Neri (11) no proporcionó datos que permitieran calcular especificidad y el estudio de María P. Dore y colaboradores (21), mostró un intervalo de confianza poco preciso, Figura 8.

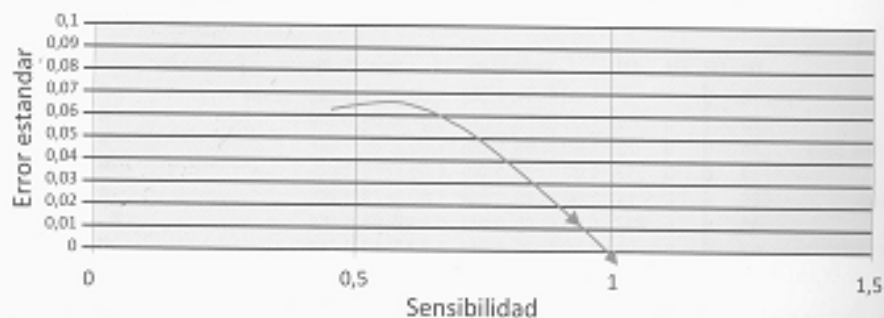


Figura 5. Funnel plot para sensibilidad.

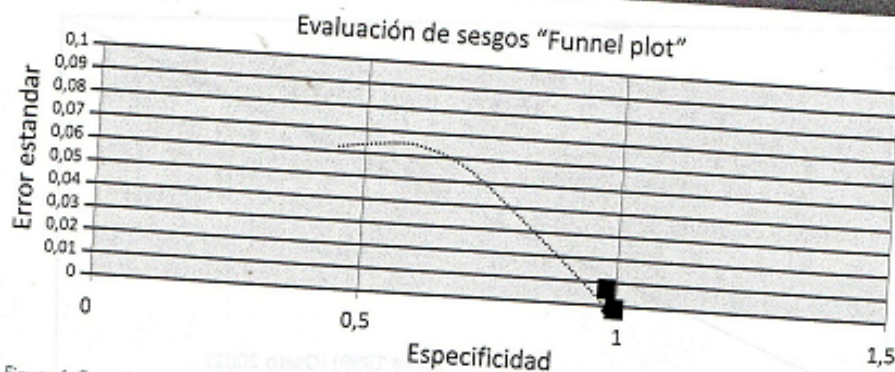


Figura 6. Funnel plot para especificidad

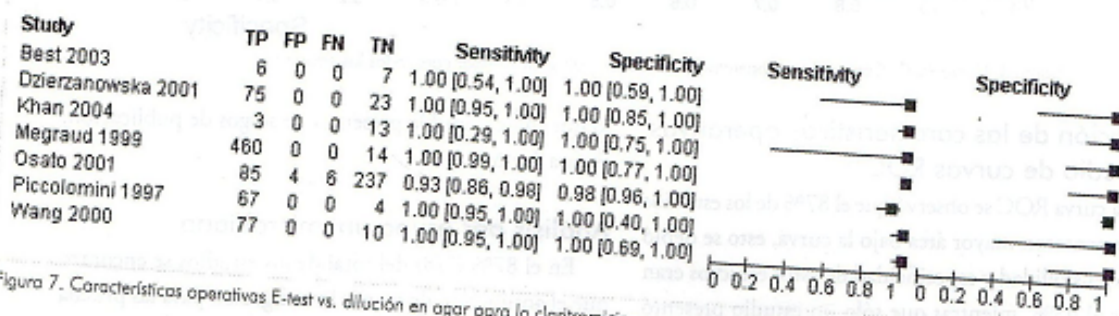


Figura 7. Características operativas E-test vs. dilución en agar para la claritromicina.

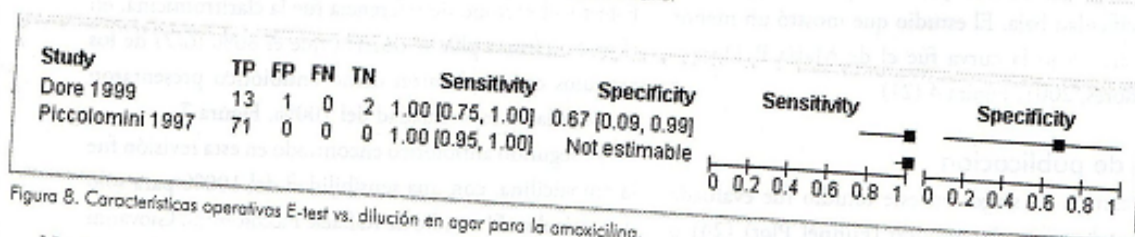


Figura 8. Características operativas E-test vs. dilución en agar para la amoxicilina.

No se encontraron estudios que exploraran las características operativas de las pruebas E-test y DA para la levofloxacina. En cuanto a la hipótesis formulada para este estudio, se demostró que no existe evidencia estadísticamente significativa para concluir que más del 90% de la literatura seleccionada reporta valores de sensibilidad y especificidad del E-test frente a la DA superiores al 95%. ($P > 0.05$).

Discusión

Hasta el momento en Colombia no se han realizado estudios experimentales que comparen las características operativas de la prueba E-test con la DA para determinar susceptibilidad antimicrobiana para *H. pylori*. Parece lógico pensar que la prueba E-test resulta igual de eficiente que el método de DA para la mayoría de los antibióticos, en nuestro caso, en especial para la claritromicina (18).

Esta afirmación debe ser demostrada en la terapia de erradicación para *H. pylori* en nuestro país antes de recomendar su uso, por tanto fue necesario realizar una revisión sistemática.

Lo primero a destacar en esta revisión es la escasez de publicaciones encontradas sobre este tema, también se observó que dichos estudios no eran recientes debido a que las pruebas utilizadas ya han sido exploradas y actualmente se utilizan de forma individual en otras regiones, razón por la cual en la mayoría de artículos excluidos sólo se utilizaba la técnica de E-test (11).

De los artículos analizados se observó que la exploración de las pruebas se realizó con pocos pacientes pero con similares diseños metodológicos y resultados muy homogéneos. La metodología experimental utilizada en general fue la misma: medios de cultivo (Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre de oveja), tiempos y

atmosferas incubación (72 h a 37 °C en frasco campyGen), casa comerciales (AB Biodisk – Abbott) y preparación del inóculos (Escala de McFarland No. 2 o 3). La DA para todos los estudios siguió el protocolo de la NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) actualmente CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (8).

Durante la búsqueda de los artículos se encontró que la claritromicina fue el antibiótico más explorado por la prueba E-test y DA, seguido por amoxicilina. No se encontraron artículos donde se utilizaran estas técnicas para evaluación de sensibilidad a levofloxacina, esto debido a que su uso en el tratamiento contra *H. pylori* no es muy frecuente y por ende su tasa de resistencia es baja (5). Por tal motivo no se pudo realizar un análisis de esta prueba.

En la búsqueda también se observó que las pruebas motivo de este estudio se compararon con más frecuencia para metronidazol, este antibiótico no fue contemplado en este análisis, puesto que *H. pylori* presenta gran resistencia a nivel mundial a este medicamento. Este antibiótico mostró baja correlación al momento de detectar sensibilidad y resistencia entre las pruebas estudiadas, limitando aún más la búsqueda de artículos (25).

El hecho de comparar las características operativas del E-test con la DA hace que los resultados de la prueba sean más confiables y válidos al momento de detectar susceptibilidad antimicrobiana, puesto que sus resultados están respaldados con una prueba, que aunque de difícil manipulación, proporciona excelentes datos de sensibilidad y resistencia para microorganismos de difícil crecimiento (independiente de su desenlace).

Ninguno de los estudios incluidos en el trabajo proporcionó datos expuestos en valores de sensibilidad y especificidad de las dos pruebas, por lo tanto fue necesario calcularlos. Sin embargo, un artículo que evaluaba la susceptibilidad a amoxicilina, no permitió calcular la especificidad debido a que no se suministró el valor total de cepas resistentes, es decir los verdaderos negativos para ambas pruebas. Aunque la amoxicilina presentó buena correlación entre las pruebas para sensibilidad, no se encontró suficiente literatura que confirmara esta afirmación.

En la mayoría de los estudios se observó que el antibiótico de mayor exploración en esta revisión y que presentó las mejores características operativas fue

la claritromicina 7/8 (87%); sin embargo, los datos no fueron estadísticamente significativos para recomendar completamente el uso de esta prueba, esto quiere decir que el E-test mostró buenas características operativas pero no supera las del método de referencia.

El estudio de María Dore y colaboradores (21) a pesar de suministrar una sensibilidad del 100%, presentó una especificidad del 67%, lo que originó el área bajo la curva de menor superficie observado en el gráfico ROC; esto debido a la obtención de resultados falsos positivos y al reducido número de muestras analizado en el artículo mencionado.

Las gráficas de embudo "Funnel Plot" fueron asimétricas, tanto para sensibilidad como especificidad. Uno de los parámetros que evalúa este tipo de gráficas es el sesgo de publicación; dentro de las posibles causas de este error sistemático está la falta de difusión de estudios negativos, poco interesantes, de pequeña escala o de baja calidad metodológica, lo que conlleva a encontrar estudios con desenlaces positivos (24). Una de las razones de haber encontrado estudios positivos puede ser la presencia del sesgo del lenguaje (publicación de estudios que no tienen hallazgos significativos en otros idiomas diferentes al inglés) lo que hace menos probable que se encuentren dichos estudios "negativos", ya que la mayoría de estudios "positivos" se publican en inglés. Otra posible causa del sesgo de publicación es la ausencia de estudios con tamaños de muestras no representativos, lo que aumentaría aún más la apreciación de positividad de las pruebas evaluadas.

En esta revisión se rechazó la hipótesis planteada de que más del 90% de la bibliografía revisada reportara características operativas de sensibilidad y especificidad de la prueba E-test iguales o superiores en un 95%. Aunque el acuerdo entre las dos pruebas en estudio fue muy bueno, solamente el 87% de los estudios lograron cumplir la hipótesis, debido en parte a la falta de estandarización del E-test en antibióticos diferentes a la claritromicina y a la poca utilización de estas técnicas en conjunto (DA y E-test) en particular en laboratorios de rutina.

A manera de conclusión, se puede anotar que la prueba de E-test demostró tener buen acuerdo en sensibilidad y especificidad para detectar susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *H. pylori*, sin embargo no

igual a ni supera las características operativas del método de referencia. El E-test puede ser utilizado de manera rutinaria para evaluar susceptibilidad de *H. pylori* a claritromicina y amoxicilina, pero deben realizarse más estudios para evaluar si esta técnica puede ser útil en la evaluación de susceptibilidad de *H. pylori* a levofloxacina.



Referencias

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-1315.
2. Axon A. Helicobacter pylori: what do we still need to know? *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:15-19.
3. Malaty HM. Epidemiology of Helicobacter pylori. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:205-214.
4. Cervantes E. Helicobacter pylori e infecciones asociadas. *Rev Fac Med UNAM* 2006;49:163-167.
5. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham DY, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III, consensus Report. *Gut* 2007;56:772-781.
6. Fariña N, Kasamatsu E, Samudio M, Morán M, Sanabria R, Laspina F. Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de Helicobacter pylori aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. *Rev Méd Chile* 2007;135:1009-1014.
7. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 2006;6:699-709.
8. Mathew W. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. Pan American Health Organization. 2008. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Lopez-Brea M, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2004.
9. Coyle M. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Department of Laboratory Medicine and Microbiology, Organización panamericana de la salud, University of Washington Edit, Editora Coordinadora. Washington-U.S.A 2000. Capítulo 5.
10. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo 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. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1842-1846.
11. Egger M, Smith GD y Altman DG. Systematic Reviews in Health Care: Meta-Analysis in Context. Edit. BMJ Publishing Group. Segunda edición 2001; 23- 459.
12. Beltran O. Revisiones sistemáticas de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20: 60-69.
13. Jaeschke R, Gordon H, Guyatt MD y Sackett DL. Guías para usuarios de la literatura médica, parte A ¿son válidos los resultados del estudio?. Ed. España 1997. pg. 389-391.
14. Dersimonian R, Kacker R.. Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: An update. *Contemp Clin Trials*. 2007;28:105-114.
15. Bermúdez, M, Pérez, A y Morillo, LE. Apreciación crítica de un artículo que presenta una revisión sistemática de la literatura en salud. Programa de actualización médica permanente. 2000; 52:2-15.
16. Best LM, Haldane DJ, Keelan M, Taylor DE, Thomson AB, Loo V, et al. Multilaboratory Comparison of Proficiencies in Susceptibility Testing of Helicobacter pylori and Correlation between Agar Dilution and E Test Methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3138-3144.
17. Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Józwiak P, Celińska-Cedro D, Madaliński K, Dzierzanowska D. Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of Helicobacter pylori isolated from children in Poland. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:387-390.
18. Khan R, Nahar S, Sultana J, Ahmad MM, Rahman M. T2182C Mutation in 23S rRNA Is Associated with Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Isolates Obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3567-3569.
19. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Helicobacter pylori in a Large Multicenter Trial: the MACH 2 Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2747-2752.
20. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Graham DY. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant Helicobacter pylori. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17:39-44.
21. Wang WH, Wong BC, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Cho CH, Lai KC, et al. High prevalence of Helicobacter pylori infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14:901-910.
22. Dore MP, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepulveda AR. Amoxicillin tolerance in Helicobacter pylori. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43:47-54.
23. Clarke M, Oxman AD, editores. Manual de Revisores Cochrane 4.1.6. Actualización <http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook.htm> (con acceso el 31 de enero de 2003).
24. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 4 ed. Madrid, España: Elsevier; 2002.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se logró dar información nueva sobre varios aspectos de la infección por *H. pylori* en Colombia.

1. Se determinó la tasa de resistencia de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos mas frecuentemente utilizados en la erradicación de esta infección, encontrándose niveles altos para claritromicina 13,6%, levofloxacina 15,6% y metronidazol 81%.
2. La tasa de resistencia de *H. pylori* a amoxicilina es aún baja en nuestro medio y no constituye un motivo de preocupación como causa de falla terapéutica por el momento.
3. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la resistencia a los antimicrobianos y los genotipos de virulencia *H. pylori*.
4. Se encontró que la causa más importante de resistencia a claritromicina en *H. pylori* fueron mutaciones ubicadas en las posiciones 2142 y 2143 del gen 23S rRNA, siendo la mutación A2143G la más frecuente.
5. Las mutaciones relacionadas con resistencia a levofloxacina se ubicaron en las posiciones 87 y 91 de la proteína GyrA siendo la más frecuente N87I en el 47,2% de las cepas, este es un aporte interesante al conocimiento, ya que esta mutación no se encuentra con frecuencia en Europa, Asia o Norteamérica.
6. Se estandarizaron dos pruebas rápidas de ASP-PCR, para la detección de resistencia a levofloxacina y claritromicina en biopsias gástricas. La prueba es factible aplicarla a las biopsias utilizadas en la prueba rápida de la urea y no se requiere refrigeración de la muestra.
7. Se diseño un nuevo set de iniciadores para amplificar la mutación N87I, que no es contemplada en las pruebas comerciales ni en las pruebas moleculares disponibles en el mundo para determinación de resistencia genotípica de *H. pylori* a levofloxacina.
8. En las biopsias se puede determinar y genotipificar la resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina, lo cual es considerado como un avance trascendental en el diagnostico molecular de infección.
9. El crecimiento de *H. pylori* es lento (7-14 días), esto conlleva a dificultades para obtener cantidades suficientes del microorganismo cuando se realizan pruebas de susceptibilidad o se requiere la extracción de ADN. Para corregir estas dificultades se implemento un sistema de cultivo líquido, que redujo los tiempos de incubación y mejoró la cantidad de biomasa.

10. En el ensayo clínico aleatorizado, controlado, ciego, se demostró que la triple terapia estándar está por debajo de 80% de eficacia la cual la ubica como una terapia inaceptable.
11. Las terapias triples con levofloxacina a diferencia de lo que sucede en otros países, en Colombia no fueron eficaces.
12. La eficacia de las tres terapias evaluadas en este trabajo está por debajo de 85%, lo que las ubica en la categoría F e impide que sean prescritas empíricamente.
13. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de erradicación de *H. pylori* entre los tres esquemas de tratamiento evaluados.
14. Es importante reevaluar los esquemas de tratamiento actualmente utilizados en nuestro país, ya que con este trabajo se evidenció que las terapias no aseguran la erradicación de *H. pylori*, por lo tanto son inaceptables para el tratamiento de la infección.
15. Se debe verificar la erradicación de la infección 6 – 8 semanas después de terminar el esquema de tratamiento.
16. Se debe determinar la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos antes de iniciar una terapia de tratamiento.
17. Debido a que las tasas de resistencia a levofloxacina y claritromicina son altas en nuestro medio, debe implementarse un programa de vigilancia de la resistencia, para monitorear el comportamiento del microorganismo a los diferentes antibióticos utilizados en las terapias de erradicación.
18. No existe una prueba perfecta para evaluar la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos, por lo tanto los programas de vigilancia de la resistencia deben efectuarse con pruebas de dilución en agar y secuenciación, de esta manera se monitorea la tasa de resistencia y los mecanismos implicados en la resistencia.
19. La resistencia del microorganismo a los antimicrobianos no explica la totalidad de las fallas terapéuticas en los pacientes, lo que implica que estudios farmacogenómicos y farmacocinéticos deben ser conducidos para completar la información que no puede explicarse con la resistencia bacteriana.
20. En este trabajo se evaluó la eficacia de tres terapias de erradicación de *H. pylori* y paralelamente se determinó la resistencia del microorganismo a amoxicilina, levofloxacina y claritromicina. Se pudo determinar que la falla terapéutica está relacionada con la presencia de mutaciones en los genes 23S rRNA y *gyrA*.

21. Se realizó un modelo de regresión logística para estimar la probabilidad de éxito terapéutico. Las variables asociadas al modelo fueron la presencia de mutación A2143G, N87I, D91G, obteniéndose una probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que no presentan ninguna mutación de un 98% y una probabilidad de éxito terapéutico en pacientes que tienen todas las mutaciones de tan solo 13%.
22. Como parte del proceso de divulgación de información en Colombia, en especial en la búsqueda de generar conciencia de la problemática que gira alrededor de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos, se publicaron 3 revisiones sistemáticas de la literatura, en donde en una de ellas se analizan las pruebas para verificar la erradicación de la infección en todos los pacientes que reciben terapia de erradicación. Se concluye que esta verificación puede determinarse con la “Prueba Respiratoria de la Urea (UBT)” o por determinación de antígenos de la bacteria en muestra de materia fecal.
23. Dos revisiones sistemáticas se condujeron para ilustrar los retos que enfrenta el laboratorio cuando se realizan pruebas de susceptibilidad. Una de ellas demuestra que la prueba de E-test sobreestima las tasas de resistencia y la otra revisión muestra como las pruebas que detectan mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina y levofloxacina, deben estandarizarse localmente de acuerdo a las mutaciones presentes en cada área geográfica y la importancia de comprender que estas pruebas fallan al detectar la resistencia cuando mecanismos diferentes a las mutaciones puntuales tales como, bombas de expulsión o porinas son las responsables de la resistencia.
24. La prevalencia de la infección en Colombia se encuentra alrededor del 80%, y las tasa de resistencia del microorganismo a los antibióticos se ha incrementado en los últimos años, por lo tanto se debe continuar investigando en la búsqueda de nuevas terapias de tratamiento y en la comprensión de las patologías producidas por este microorganismo y su impacto en nuestra población.

Lista de publicaciones

1. LI Y; Rimbara E; Thirumurthi S; **Trespalacios AA**; Reddy R; Attumi T; Sabounchi S; Graham DY. Detection of clarithromycin resistance in *H. pylori* following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days" Journal of Digestive Diseases - Manuscript ID JDD-2011-01-0016.R1. En prensa.
2. **Trespalacios AA**, Otero W, Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Revista Colombiana de Gastroenterología. Vol. 25 No 1 enero – marzo de de 2010
3. Duque-Jamaica R, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, **Trespalacios AA**. Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 2010 Aug;15(4):303-12.
4. Otero W, **Trespalacios AA**, Otero E. *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual un importante reto en Gastroenterología. Revista Colombiana de Gastroenterología. 2009. 2009;24:279-292.
5. Arévalo G. A, **Trespalacios AA**, Otero W. Importancia de la proteína *cagA* en infección por *Helicobacter pylori*. Revista Colombiana de Gastroenterología. 2009; 24 (4): 388-395.

6. Carreño Y, Mercado M, **Trespalacios AA**, Otero W. Comparación de la prueba de antígenos fecales (ELISA) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura. Revista Colombiana de Gastroenterología. 2009; 24(4): 116 – 127.

7. Avila J, Rey M, Mercado M, Villamizar OR, Otero W, **Trespalacios AA**. Comparación de las pruebas de dilución en agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Revisión sistemática de la literatura. Revista Colombiana de Gastroenterología. Vol 2009; 24 (2): 219 – 229.

8. Rey M, Avila J, Trespalacios AA, Villamizar OR, Otero O, Mercado MM. Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. NOVA. 2008; 6:116-127.

Pasantía Internacional

Pasantía en la Facultad de Medicina, Unidad de Gastroenterología de Baylor College of Medicine. 8 Marzo – 27 Agosto de 2010. Bajo la dirección del Dr. David Graham y la Dra. Emiko Rimbara.

Premios y distinciones

Trespalacios AA, Otero W, Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Premio Nacional de Gastroenterología José Antonio Jácome Valderrama. Septiembre de 2009.

Participación en congresos internacionales

1. **Trespalacios AA**, Otero W, Mercado M, Caminos E, Avila J, Rosero L, Arévalo A.

Resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin and levofloxacin from 2009 to 2011 in Bogotá – Colombia.

European *Helicobacter Study* Group. XXIV International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive. Inflammation and Gastric Cancer.

Dublin – Irlanda. September 11 – 13, 2011. Aceptado para presentación.

2. **Trespalacios AA**, Arévalo A, Otero W, Mercado MM, Poutou R, Caminos E, Rimbara E, Graham DY.

Primary levofloxacin resistance among *Helicobacter pylori* in Colombia.

European *Helicobacter Study* Group. XXIII International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive. Inflammation and Gastric Cancer

Rotterdam - Holanda, September 16–18, 2010

3. **Trespalacios AA**, Ávila JM; Rey M; Mercado MM; Villamizar OR; Otero W
Comparación de las características operativas de la prueba RFLP-PCR con dilución en agar para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*.

III Workshop Latinoamericano de *Helicobacter pylori*

Valencia – Venezuela. 12- 15 noviembre de 2008

4. **Trespalacios AA**; Muñoz AB; Mercado MM; Otero W
Evaluación de la resistencia a claritromicina en genotipos *cagA* y *vacA* de aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*

III Workshop Latinoamericano de *Helicobacter pylori*

Valencia – Venezuela. 12- 15 noviembre de 2008

Lista de abreviaturas

| | |
|-------------|--|
| IBP | Inhibidor de la bomba de protones |
| ELA | Terapia constituida por esomeprazol, levofloxacin y amoxicilina |
| ECL | Terapia constituida por esomeprazol, claritromicina y levofloxacin |
| ECA | Terapia constituida por esomeprazol, claritromicina y levofloxacin |
| ITT | Intenci3n a tratar |
| ACV | accidente cerebrovascular |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| BLASTN | Basic local alignment search tool |
| CLSI | Instituto de Est3ndares Cl3nicos y de Laboratorio |
| CONSORT | Consolidated Standards of Reporting Trials |
| E - test | Prueba de difusi3n en disco por el m3todo de epsilometr3a |
| <i>gyrA</i> | Gen de la girasa A |
| ICC | insuficiencia cardiaca congestiva |
| NNT | N3mero necesario a tratar |
| PCR | Reacci3n en cadena de la polimerasa |
| PP | Por protocolo |
| QRDR | Regi3n determinante de resistencia a las quinolonas |
| RR | Riesgo relativo |
| UBT | Prueba respiratoria de la urea |