

Susceptibilidad antibiótica de *Helicobacter pylori*: un estudio de prevalencia en pacientes con dispepsia en Quito, Ecuador

Susceptibility of *Helicobacter Pylori* to Antibiotics: a Study of Prevalence in Patients with Dyspepsia in Quito, Ecuador

Jorge Reyes Ch.,¹ Katherine Guzmán,² Eduardo Morales,² José Villacís,³ Galo Fernando Pazmiño Quirós,⁴ Rosa Eugenia Pacheco Tigselema,⁵ Luis Santiago Escalante.²

¹ Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez", Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

² Escuela de Bioanálisis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

³ Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez" Escuela de Bioanálisis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

⁴ Hospital de las fuerzas Armadas n.º 1. Quito, Ecuador.

⁵ Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. Quito, Ecuador.

Correspondencia: Luis Santiago Escalante. lscalante@puce.edu.ec.

Póster de carácter científico presentado en: IV Encuentro Internacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Tema: *Helicobacter pylori*, prevalencia de resistencia al metronidazol, claritromicina, amoxicilina, levofloxacina y tetraciclina de muestras provenientes de biopsias gástricas en 2 hospitales de especialidades, Quito, Ecuador. 2016.

Fecha recibido: 26-01-17
Fecha aceptado: 06-10-17

Resumen

Introducción: el *Helicobacter pylori* se asocia con patologías gastrointestinales, el incremento en la resistencia a los antibióticos utilizados para su erradicación es alarmante a nivel mundial. En este estudio se determinó la susceptibilidad a 5 antibióticos utilizados en la terapia de erradicación de *H. pylori* aislado de una población adulta con dispepsia recurrente en Quito, Ecuador. **Materiales y métodos:** previa aceptación del consentimiento informado, se tomaron biopsias de cuerpo y fondo gástrico de 210 pacientes con dispepsia y mediante cultivo se recuperaron los aislados de *H. pylori* identificado mediante pruebas bioquímicas. La susceptibilidad al metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y levofloxacina se realizó por concentración mínima inhibitoria (CMI). Todos los cultivos se correlacionaron con el estudio histopatológico. **Resultados:** se recuperaron 89 aislados de *H. pylori*. Se obtuvo un kappa de 0,9 entre el cultivo y el estudio histopatológico. El porcentaje de cepas con resistencia antibiótica fue: metronidazol (63%), claritromicina (66%), amoxicilina (43%), tetraciclina (36%) y levofloxacina (54%). **Conclusión:** estos hallazgos demuestran la alta resistencia a los antibióticos usados para la erradicación de *H. pylori*, varios factores como el consumo indiscriminado de antibióticos, terapia previa, entre otros podrían estar involucrados.

Palabras clave

Helicobacter pylori; resistencia antibiótica; concentración mínima inhibitoria.

Abstract

Introduction: Worldwide, *Helicobacter pylori* is associated with gastrointestinal pathologies, but increasing resistance to antibiotics used for its eradication is causing alarm. This study determined susceptibility of *H. pylori* to five antibiotics used in eradication therapy in an adult population with recurrent dyspepsia in Quito, Ecuador. **Materials and methods:** After patients provided informed consent, biopsies were taken from the gastric corpus and fundus of 210 patients with dyspepsia. *H. pylori* isolates identified by biochemical tests were recovered from cultures of biopsy samples. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and levofloxacin were tested to indicate susceptibility. All cultures were correlated with the histopathological study. **Results:** *H. pylori* isolates were recovered from 89 cultures. A kappa of 0.9 was obtained between the culture and the histopathological study. The percentage of strains with antibiotic resistance were 63% for metronidazole, 66% for clarithromycin, 43% for amoxicillin, 36% for tetracycline and 54% for levofloxacin. **Conclusion:** These findings demonstrate high levels of resistance to the antibiotics used for eradication of *H. pylori*. Several factors including indiscriminate consumption of antibiotics and previous therapy may be involved.

Keywords

Helicobacter pylori; antibiotic resistance; minimal inhibitory concentration.

INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* es una bacteria bacilar gramnegativa que habita en la mucosa gástrica, se asocia con enfermedades gastrointestinales inflamatorias como úlcera péptica, gastritis crónica y neoplásicas como los linfomas tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) donde la producción de citotoxinas como la asociada al gen A (*cagA*) y la vacuolizante (*vacA*) han sido asociados (1, 2). *H. pylori* se adquiere durante la niñez, permanece de forma asintomática durante muchos años y el contacto cercano es un factor de riesgo (3, 4). Estudios de prevalencia han demostrado que la presencia de *H. pylori* en personas adultas en países en vías de desarrollo supera el 70% (5), mientras que en países desarrollados oscila entre el 24% y el 42% (6).

La terapia de erradicación de *H. pylori* basada en antibióticos asociados con un inhibidor de bomba de protones alcanza hasta un 80% de efectividad; sin embargo, existe un porcentaje de fallo terapéutico debido principalmente por resistencia a los antibióticos (7), la utilización del cultivo y el antibiograma para el desarrollo de guías terapéuticas con base en datos de resistencia bacteriana locales son una estrategia adecuada (7, 8).

El estudio pretende determinar la prevalencia de la resistencia antibiótica en aislados clínicos de *H. pylori* de pacientes mayores de 18 años con dispepsia recurrente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

El estudio se llevó a cabo en 2 hospitales públicos de especialidades (aproximadamente 400 camas cada uno) de la ciudad de Quito, Ecuador, en un período de 6 meses, se seleccionaron a los pacientes mayores de 18 años con síntomas de dispepsia recurrente, que han aceptado ingresar al estudio mediante la firma del consentimiento informado y que no hayan tomado tratamiento antibiótico por lo menos 5 días antes de la endoscopia digestiva alta (EDA).

Aislamiento e identificación de *H. pylori*

Mediante EDA se tomaron 2 biopsias gástricas, una de fondo y otra de antro, colocadas en un frasco de tapa rosca con 1 mL de solución salina 0,9% estéril y transportadas durante las 2 primeras horas (9) al laboratorio de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y al laboratorio de referencia nacional de resistencia a los antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI "LIP") para su control y supervisión. Luego de maceradas, se estriaron en agar base columbia (Oxoid UK)

suplementado con sangre de cordero al 7%, vancomicina 10 mg/L, trimetoprima 5 mg/L, cefsulodina 5 mg/L y anfotericina B 5 mg/L (DENT[®], Oxoid UK) siguiendo las instrucciones del fabricante e incubados en atmósfera microaerófila alcanzando 5% de oxígeno (O₂), 10% de dióxido de carbono (CO₂) y 85% de nitrógeno (N₂) (CampyGen[®], Oxoid UK) a 37 °C por 7 días. La identificación de *H. pylori* se realizó mediante la observación morfológica de la colonia, la coloración de Gram (bacilos gramnegativos), reacción positiva para las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa. Los aislados se almacenaron en infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid UK) con glicerol al 20% a -70 °C.

Pruebas de susceptibilidad

Para alcanzar una turbidez n.º 3 de la escala de Mc Farland, a partir de cultivo puro se preparó una suspensión bacteriana en caldo BHI (Oxoid UK) incubando durante 3 días en atmósfera microaerófila (CampyGen[®], Oxoid UK) a 37 °C (10), posteriormente se inoculó en agar Mueller Hinton (Oxoid UK) suplementado con 7% de sangre de cordero. Se utilizaron tirillas en gradiente de concentración mínima inhibitoria (CMI) para: amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacina y claritromicina (Liofilchem, Italia), incubando durante 5 días en ambiente microaerofílico (CampyGen[®], Oxoid UK). Los puntos de corte para la claritromicina se tomaron del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), mientras que para el resto de antibióticos se tomaron los puntos de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff value* [ECV]) del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) vigentes. Para el control de calidad se utilizó *H. pylori* ATCC 43504.

Aspectos éticos

Previo al estudio, todos los pacientes firmaron el consentimiento informado, indicando los procedimientos que iban a ser realizados con las muestras, los posibles riesgos y beneficios de su participación en la investigación. El trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética de cada hospital y de la PUCE.

RESULTADOS

De las 210 personas involucradas en el estudio, 143 presentaron cierto grado de inflamación gástrica y 2 personas con adenocarcinoma. Se aislaron en total 89 (42,4%) cepas de *H. pylori*, de las cuales 87 estuvieron asociadas con patología gástrica por histopatología (**Tabla 1**); 4 cepas no pudieron ser recuperadas para las pruebas de susceptibilidad para: metronidazol, levofloxacina, amoxicilina y tetraciclina, mientras que para la claritromicina se investigaron 78 aislados (**Figuras 1 y 2**).

Tabla 1. Resultados del estudio citológico de las biopsias gástricas y número de aislados de *H. pylori* recuperados

Características histológicas de la mucosa gástrica	Cantidad de pacientes (%)	Cantidad de aislados de <i>H. pylori</i> recuperados
Gastritis crónica no atrófica	60 (28,6)	15
Gastritis crónica con metaplasia intestinal	28 (12,3)	15
Gastritis crónica folicular	23 (11)	23
Gastritis crónica difusa	20 (9,5)	20
Gastritis crónica erosiva	8 (8,8)	8
Gastritis crónica atrófica	4 (1,9)	4
Adenocarcinoma	2 (1)	2
Negativo	65 (26,9)	2
Total	210	89

El mayor número de cepas que presentaron CMI superiores a los valores de referencia fueron para metronidazol y claritromicina, mientras que el análisis de asociación de antibióticos para los distintos esquemas terapéuticos demostró que el 32% de los aislados fue resistente a la combinación amoxicilina/claritromicina y un 42% a la claritromicina/metronidazol (**Tabla 2**).

DISCUSIÓN

H. pylori se asocia con procesos inflamatorios en la mucosa gastrointestinal, su prevalencia es alrededor del 70% al 80% a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo (5). En nuestro estudio se aisló *H. pylori* en 89 pacientes (42,4%), solo 2 aislados no se asociaron con inflamación

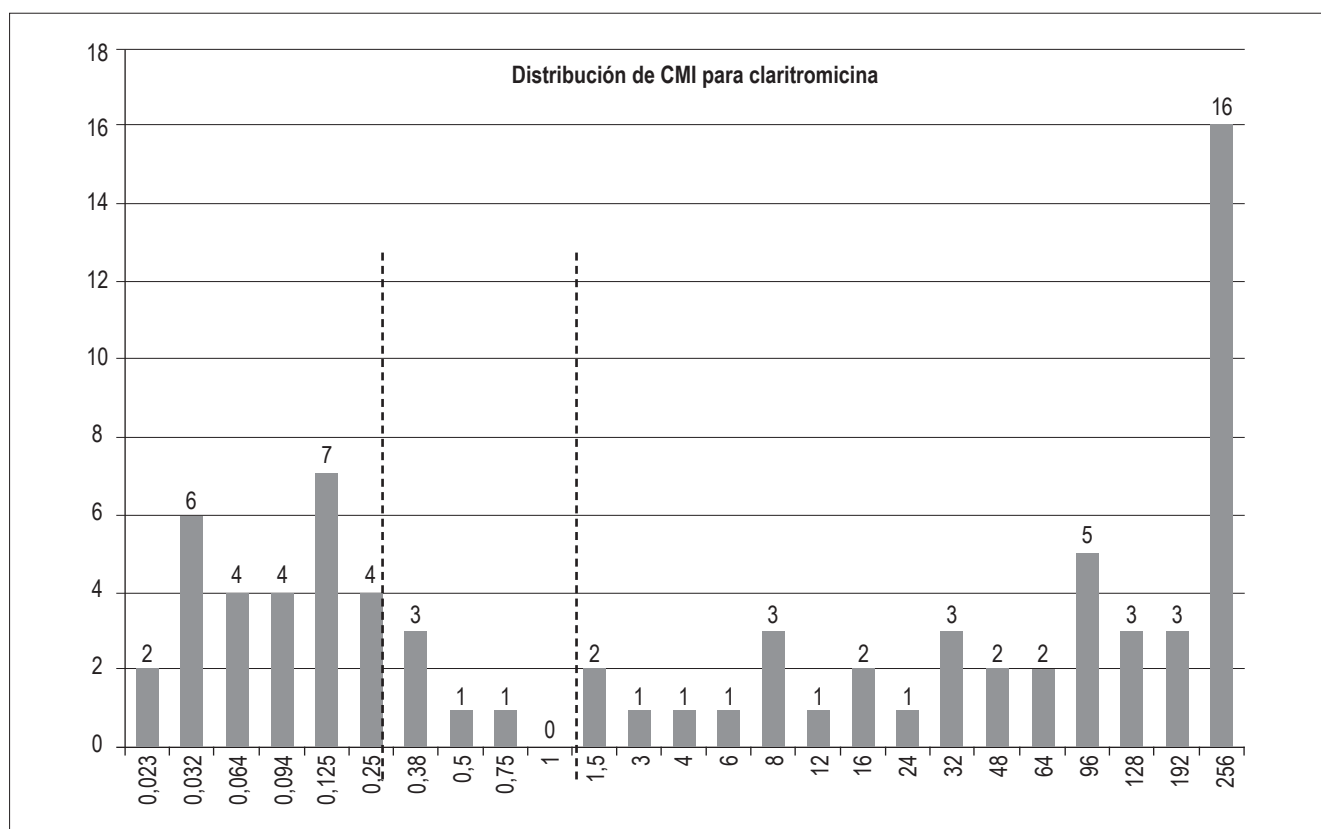


Figura 1. CMI para claritromicina en 78 cepas de *H. pylori*. Las líneas entrecortadas representan puntos de corte según CLSI 2017.

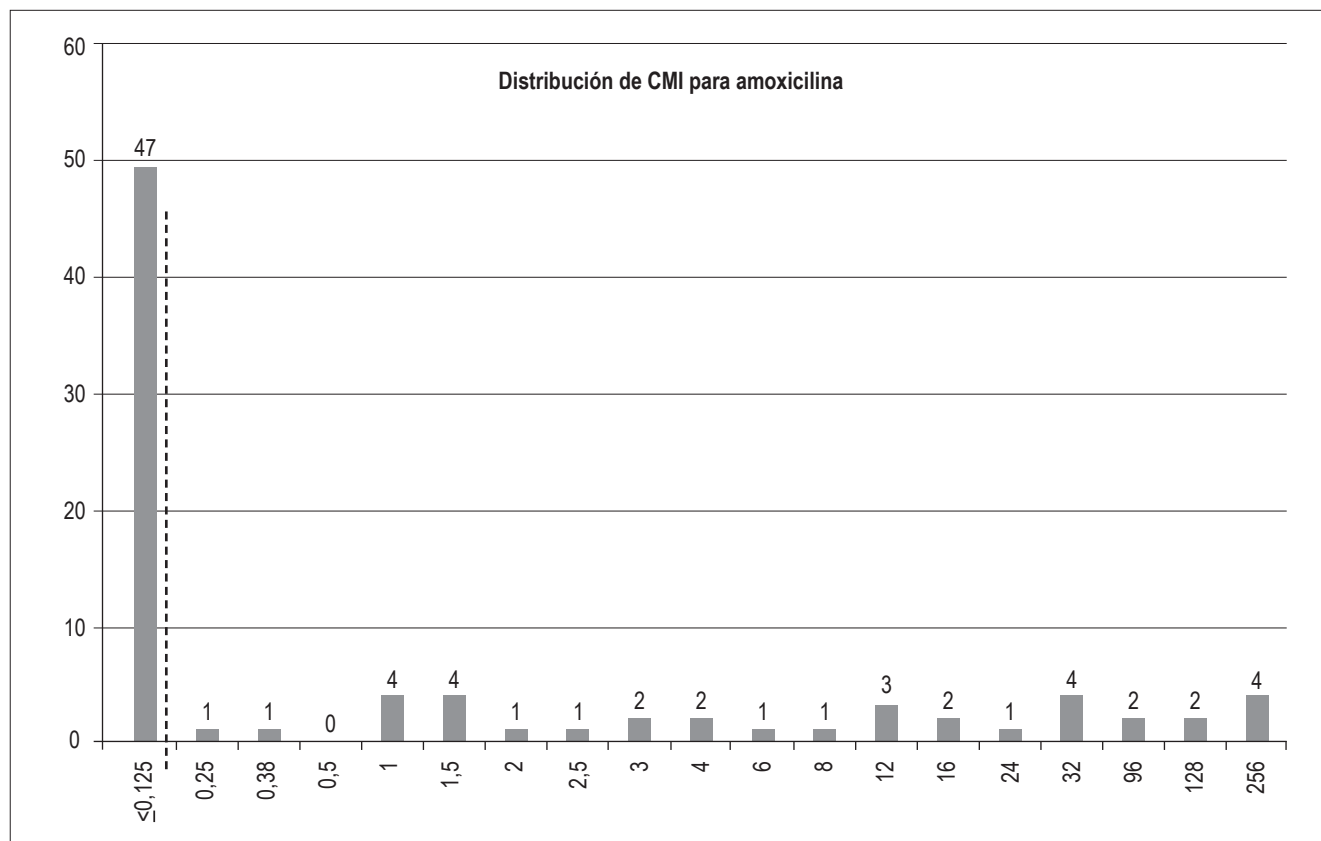


Figura 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para amoxicilina en 83 cepas de *H. pylori*. Las líneas entrecortadas representan puntos de corte epidemiológico según EUCAST 2017.

gástrica, y la prevalencia fue más baja que la reportada en otros estudios. Factores como la dificultad de aislar *H. pylori* por medio del cultivo, sitio y calidad de la biopsia gástrica, transporte y condiciones de incubación (11), entre otros pudieron influir en los resultados. En nuestro estudio se seleccionaron las biopsias obtenidas del fondo y antro gástrico como se recomienda (12), mientras que el cultivo se realizó dentro de las 2 horas para evitar la pérdida de la viabilidad de las cepas.

Tanto la resistencia “primaria” asociada con el uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos distintos a *H. pylori*, como la resistencia “secundaria” causada por un tratamiento previo con el fin de erradicar *H. pylori* influyen en su erradicación (13-15). El CLSI establece puntos de corte clínicos para la claritromicina, pero no lo hace para amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y levofloxacina. Se ha observado una variación entre estudios epidemiológicos en cuanto a los valores utilizados como puntos de corte, en nuestro estudio se tomaron los puntos de corte epidemiológicos dados por EUCAST y usados en la mayor parte de países de Europa;

no obstante, se toma en cuenta que los aislados considerados como resistentes pueden incrementar, así como la falta de eficacia clínica demostrada al utilizarlos (16).

La claritromicina continúa siendo el fármaco recomendado como primera opción para el tratamiento de erradicación (8) de *H. pylori*. En nuestro estudio se demostró que el 66% de los aislados presentaba resistencia, valores muy superiores al 12% reportado para América Latina (17) y al 9,5% en el Ecuador, reportado en el 2003 (18). No obstante, Raymont y colaboradores demostraron un incremento en la prevalencia de aislados resistentes a la claritromicina llegando al 68% en pacientes con antecedentes de antibioticoterapia previa (19); un porcentaje similar de resistencia lo demostraron Gao y colaboradores (20).

El consenso de Maastricht IV sobre el uso de macrólidos recomienda que, para el tratamiento empírico de *H. pylori*, se debe tomar en cuenta la prevalencia local, ya que se debe evitar su uso al observar entre el 15%-20% de cepas resistentes y se deben realizar pruebas de susceptibilidad (8); sin embargo, al ser una técnica compleja, pocos laboratorios lo realizan. Entre los mecanismos de resistencia descri-

Tabla 2. Porcentaje de resistencia a los antibióticos asociados utilizados en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*. Claritromicina: puntos de corte CLSI; para el resto de antibióticos, puntos de corte epidemiológico EUCAST.

Antibióticos investigados	% de aislados de <i>H. pylori</i> resistentes según ECV-EUCAST y CLSI
Levofloxacina	54
Tetraciclina	36
Metronidazol	63
Claritromicina	66
Amoxicilina	43
Combinación de antibióticos	Cantidad de aislados de <i>H. pylori</i> resistentes (%)
Amoxicilina/claritromicina	26 (32)
Metronidazol/claritromicina	32 (42)
Amoxicilina/levofloxacina	26 (32)

tos a la claritromicina están principalmente las mutaciones en el gen 23S rRNA y presencia de bombas de flujo (21, 22). Una deficiencia de nuestro estudio fue no investigar estos mecanismos.

La amoxicilina es otro antibiótico de primera línea dentro de la terapia triple. En nuestro estudio se encontró que el 43% de cepas presenta una CMI $\geq 0,125$, clasificadas como resistentes, un porcentaje elevado si se toma en cuenta que para América Latina se encuentra entre el 0%-39%; y aún más para el Ecuador, que en años anteriores no se superaba el 4% (17, 18). No obstante, similar a lo que ocurre con el uso de la claritromicina, Nishizawa y colaboradores demostraron que, luego de varios intentos fallidos de erradicación utilizando amoxicilina dentro del esquema terapéutico, se incrementó el número de aislados resistentes del 49,5% a 72% (23). En nuestro estudio no se obtuvieron datos sobre el consumo previo de antibióticos relacionados o no a terapia de erradicación; sin embargo, se seleccionaron pacientes con dispepsia recurrente y que posiblemente recibieron terapéutica antimicrobiana previa. Una resistencia del 63% al metronidazol se encuentra dentro del rango reportado para América Latina (12,5%-95%) y para Ecuador del 80,9% (17, 18).

Más de 30% de cepas presenta resistencia simultáneamente a 2 antibióticos usados para la terapia de erradicación, sea claritromicina o levofloxacina.

El uso previo de antibióticos es un factor de riesgo para el incremento de cepas de *H. pylori* resistentes y, consecuentemente, para fallo terapéutico, sea por resistencia primaria o secundaria (24). Se demostró una prevalencia elevada de resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de erradicación, a diferencia de los resultados obtenidos en

Ecuador en el año 2003; se recomienda el análisis riesgo/beneficio cuando se utilice la claritromicina o amoxicilina como tratamiento empírico en pacientes con dispepsia recurrentes o que posiblemente ya recibieron tratamiento previo, junto con la realización de pruebas de susceptibilidad.

Agradecimientos

Al personal del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo y Fuerzas Armadas n.º 1 de la ciudad de Quito, nuestros agradecimientos sinceros.

Conflicto de intereses

El proyecto *Susceptibilidad antibiótica de Helicobacter pylori en Quito, Ecuador: un estudio de prevalencia en pacientes con dispepsia* fue producto del Grant otorgado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, código: L13295. Sin embargo, estos resultados no fueron influenciados por el ente patrocinador.

REFERENCIAS

1. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2008;135(1):91-9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.041>
2. Wang F, Meng W, Wang B, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014;345(2):196-202. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.016>
3. Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, et al. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1971-3.
4. Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, et al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2003;8(11):987-91.
5. Porras C, Nodora J, Sexton R, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes Control*. 2013;24(2):209-15.
6. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014;19 Suppl 1:1-5. <https://doi.org/10.1111/hel.12165>
7. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*. 2010;59(8):1143-53.
8. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61(5):646-64. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
9. Ndip RN, Malange Takang AE, Ojongokpoko JE, et al. *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies

- of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Trop Med Int Health*. 2008;13(6):848-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02062.x>
10. Ogata SK, Gales AC, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Braz J Microbiol*. 2015;45(4):1439-48. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400039>
 11. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):280-322. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
 12. El-Zimaity H, Serra S, Szentgyorgyi E, et al. Gastric biopsies: the gap between evidence-based medicine and daily practice in the management of gastric *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol [Internet]*. 2013;27(10):e25-30. <https://doi.org/10.1155/2013/897423>
 13. Poon SK, Chang CS, Su J, et al. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(2):291-6. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01184.x>
 14. Pilotto A, Franceschi M, Rassa M, et al. Incidence of secondary *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in treatment failures after 1-week proton pump inhibitor-based triple therapies: a prospective study. *Dig Liver Dis*. 2000;32(8):667-72. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(00\)80327-8](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(00)80327-8)
 15. Lim SG, Park RW, Shin SJ, et al. The relationship between the failure to eradicate *Helicobacter pylori* and previous antibiotics use. *Dig Liver Dis*. 2016;48(4):385-90. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.12.001>
 16. Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, et al. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(5):278-282. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.010>
 17. Camargo MC, García A, Riquelme A, et al. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(4):485-95. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24>
 18. Debets-Ossenkopp YJ, Reyes G, Mulder J, et al. Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(1):141-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg023>
 19. Raymond J, Lamarque D, Kalach N, et al. High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter*. 2010;15(1):21-7.
 20. Gao W, Cheng H, Hu F, et al. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. *Helicobacter*. 2010;15(5):460-6.
 21. Taylor DE, Ge Z, Purych D, et al. 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(12):2621-8.
 22. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25 Suppl 1:S75-9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06220.x>
 23. Nishizawa T, Suzuki H, Tsugawa H, et al. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3012-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00188-11>
 24. Mégraud F, Coenen S, Versporten A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013;62(1):34-42. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302254>