

## Patrones de resistencia secundaria de *Helicobacter pylori* a metronidazol y claritromicina en Quito.

Gonzalo Zurita H.<sup>1</sup>, Jeannete Zurita<sup>2</sup>, Ximena Oñate<sup>2</sup>, Yolanda Espinosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Clínico. Edificio Cruz Roja Cuarto Piso. Quito. Ecuador, <sup>2</sup>Hospital Vozandes. Quito. Ecuador.

### Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* está implicada en el desarrollo de varias enfermedades gástricas y constituye un grave problema de salud pública. La resistencia a los antibacterianos por parte del *Helicobacter pylori* se ha convertido en un nuevo desafío para su erradicación. El objetivo de este estudio fue identificar los patrones de resistencia secundaria a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes (biopsia) que habían recibido tratamiento para este agente y en quienes persistía la sintomatología. Ciento ochenta biopsias de mucosa gástrica fueron obtenidas de sesenta pacientes (32 mujeres y 28 varones) provenientes de diferentes centros hospitalarios de Quito. Las biopsias fueron procesadas para tinciones de Giemsa y Gram, prueba de ureasa y cultivo. Cuando se obtuvo el desarrollo de *H. pylori* se procedió a la realización de las pruebas de sensibilidad. Las colonias fueron estriadas en agar Wilkins & Chalgren y colocadas una tirilla E-test para los siguientes antimicrobianos: metronidazol, azitromicina, claritromicina, amoxicilina y trovafloxacino. Se obtuvo crecimiento de *H. pylori* en 21 biopsias (35%). La resistencia secundaria para metronidazol fue del 47.6% y para la claritromicina fue del 4.7%. Resistencia dual tanto al metronidazol como a la claritromicina no fue observada. En conclusión en este estudio se encontró una alta prevalencia de resistencia a metronidazol en las cepas de *H. pylori* y una baja resistencia a claritromicina, después de una falla de tratamiento. **Rev Fac Cien Med (Quito) 2001; 26(2-3): 23-26**

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, resistencia, metronidazol, claritromicina

### Abstract

*Helicobacter pylori* infection is implicated in the natural history of gastric diseases and constitute a serious problem of public health. Another new problem related to this bacteria is its resistance to various antimicrobial agents. The aim of this study was to investigate the patterns of secondary resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in certain strains of *H. pylori* isolated from patients which received treatment (biopsy), but still with symptomatology. One hundred eighty gastric mucose biopsies were taken from 60 patients (female 32, male 28) from different health centers from Quito. The biopsies were processed for Giemsa and Gram stains, ureasa test and bacterial culture. Once *H. pylori* developed sensitivity tests were performed. Colonies were striking in Wilkin and Chalgren's agar and tested using an E-test for the following antimicrobial agents: metronidazole, azitromicine, clarithromycin, amoxicillin and trovafloxavine. *H. pylori* was obtained in 21 biopsies (35%), in 33 patients (55%) the urea, smear and the bacterial culture tests were negative. In six biopsies (10%) the bacilli were observed and the urea test was positive too, however there was not bacterial growing. The secondary resistance to metronidazole was 47.6% and for clarithromycin was 4.7%. In this study dual resistance either to metronidazole or clarithromycin was not observed. In conclusion, in this study was found a high rate of resistance to metronidazole in *Helicobacter pylori* strains and a low resistance to clarithromycin after a failure treatment. **Rev Fac Cien Med (Quito) 2001; 26(2-3): 23-26**

**Key words:** *Helicobacter pylori*, metronidazole, clarithromycin, resistance.

### Introducción

El *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa microaerófila, la cual infecta la mucosa gástrica y es una de las infecciones crónicas más comunes en

el mundo.<sup>1</sup> La infección por esta bacteria esta asociada a varias patologías gástricas en todas las edades, como la gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico, entre otras.<sup>2,3</sup> Varios antimicrobianos han sido utilizados para tratar a la infección por *H. Pylori*, y la erradicación exitosa ha demostrado prevenir la úlcera gástrica y duodenal.<sup>4,5</sup> En este sentido, la erradi-

**Dirección para correspondencia:** Jeannete Zurita M.D. MSc., Laboratorio de Microbiología. Hospital Vozandes. Villalengua 267. Quito Ecuador, e-mail: jzurita@hcej.org.ec

cación de esta bacteria significa curación y prevención de los posibles episodios recurrentes. El esquema de tratamiento utilizado con frecuencia incluye una combinación de dos o más agentes antimicrobianos y supresión de la acidez gástrica a través de un inhibidor de la bomba de protones, sin embargo, hasta el momento no se dispone de un esquema terapéutico universalmente efectivo. La resistencia del *H. pylori* al metronidazol y a la claritromicina ha aumentado notablemente en todo el mundo,<sup>6</sup> también se ha informado resistencia a la amoxicilina, aunque este fenómeno es raro e inestable.<sup>7</sup> La presencia de organismos resistentes entre otros factores al parecer ha determinado una baja tasa de curación. La frecuencia de resistencia del *H. pylori* a los antibióticos varía notablemente entre regiones geográficas, y más aún se han registrado variaciones dentro de las propias poblaciones estudiadas,<sup>8-11</sup> mismas que se reflejan en las cifras de resistencia al metronidazol que va desde un escaso 10% hasta un notable 90%.<sup>8,9,12</sup>

El conocer la prevalencia de resistencia del *H. pylori* es sumamente importante debido a que su tratamiento, es por lo general iniciado en forma empírica. El metronidazol es ampliamente utilizado en Ecuador, al igual que la amoxicilina, mientras que los macrólidos lo son en menor proporción, por lo que la resistencia puede ser prevalente. Con estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue conocer los patrones de resistencia secundaria a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes provenientes de diferentes centros hospitalarios del área metropolitana de Quito referidos para cultivo y pruebas de sensibilidad al hospital Vozandes.

### Materiales y métodos

Durante un periodo de 14 meses (enero del 2000 a abril 2001) se recibieron 180 biopsias de mucosa gástrica (60 pacientes) de diferentes unidades de salud de la ciudad de Quito. Todos los pacientes recibieron información sobre el objetivo del estudio. Los pacientes tuvieron una edad comprendida entre 14 y 85 años, con una media de 41.8 años (32 mujeres y 28 varones). Todos tenían antecedentes de enfermedad por *H. pylori* y habían recibido tratamiento previo para una infección por este agente, sin embargo, continuaban con la sintomatología de enfermedad ácido péptica (dolor, ardor epigástrico, dispepsia, pirosis, náusea, hematemesis y melenas). Tres biopsias de aproximadamente 2 a 3 mm fueron tomadas del antro gástrico, enviadas al laboratorio de microbiología en solución salina estéril y procesadas dentro de dos horas de recibidas. La primera de estas muestras de mucosa gástrica fue destinada a la realización de improntas, para las tinciones de

Giemsa y Gram, la segunda fue destinada a la prueba de ureasa y la tercera fue inoculada directamente sobre un agar Columbia (Oxoid) suplementado con sangre de caballo al 5% y con Butzler (Oxoid SR085E). Todos los cultivos fueron incubados en bolsas Campy Pouch (Becton Dickinson BBL, Cockeysville, MD) a 37°C por 5 días. Este sistema permite crear la atmósfera ideal para el desarrollo de *H. pylori* (5% oxígeno, 5% dióxido de carbono, 2% hidrógeno y 88% de nitrógeno).

Una vez obtenida la colonia se procedió a la realización de las pruebas de sensibilidad. Tres a cinco colonias fueron estriadas en agar Wilkins & Chalgren (Oxoid) y colocadas una tirilla E-test para los siguientes antimicrobianos: metronidazol, azitromicina, claritromicina, amoxicilina y trovafloxacin. Las cajas fueron incubadas con el sistema Campy Pouch a 37°C durante 3 días. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue definida como la más baja concentración de antibiótico que inhibía el crecimiento en el cruce con la tirilla (Foto 1).



Foto 1. Cálculo de concentración antibiótica mediante cruce con tirilla.

Las cepas resistentes a metronidazol se consideraron a aquellas cuyas CIM eran >8 ug/ml y para claritromicina >1 ug/ml. Los puntos de corte para azitromicina, amoxicilina y trovafloxacin no han sido establecidos, razón por la cual para estos últimos antimicrobianos se presentarán las CIM que se obtuvieron.

### Resultados

Se cultivaron 60 biopsias de mucosa gástrica, obteniéndose crecimiento de *H. pylori* en 21 biopsias (35%). A cada uno de las biopsias de los pacientes se les realizó improntas y prueba de la urea. Treinta y tres pacientes (55%) tuvieron negativa la urea, negativa la impronta y negativo el cultivo. Seis biopsias (10%) tuvieron positiva la urea y se visualizaron los bacilos curvos en las improntas, sin embargo no se obtuvo desarrollo de la bacteria. Los datos de los pacientes en los que se logró el aislamiento de *H. pylori* se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1. Concentración inhibitoria mínima de las cepas de *Helicobacter pylori* a diversos antimicrobianos.**

Paciente	Sexo	Edad	Impronta	Urea	Metronidazol	Claritromicina	Azitromicina	Amoxicilina	Trovafloxacin
		(años)	Gram		ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
1	F	48	positiva	positiva	>32	0.094	0.064	0.75	<0.016
2	F	59	positiva	positiva	>32	0.094	0.125	0.75	0.75
3	F	38	positiva	positiva	8	0.25	0.19	0.5	0.016
4	F	23	positiva	positiva	4	0.032	0.75	0.016	<0.016
5	M	53	positiva	positiva	8	0.032	0.75	0.016	<0.016
6	F	85	positiva	positiva	1.5	0.25	0.38	0.094	0.094
7	M	40	positiva	positiva	1	0.19	0.25	0.125	0.125
8	F	49	positiva	positiva	6	1.5	1	0.064	0.064
9	F	38	positiva	positiva	3	0.75	0.75	0.19	0.19
10	F	40	positiva	positiva	12	0.032	0.25	0.125	0.125
11	F	51	positiva	positiva	128	0.64	0.094	0.75	0.75
12	F	14	positiva	positiva	1	0.19	0.25	0.125	0.125
13	F	32	positiva	positiva	<0.016	0.032	0.023	0.125	0.125
14	F	40	positiva	positiva	4	0.125	0.023	0.064	0.064
15	M	48	positiva	positiva	0.19	0.125	0.023	0.38	0.125
16	F	37	positiva	positiva	1.5	0.094	0.25	0.75	0.75
17	F	48	positiva	positiva	>32	0.094	0.064	0.75	0.75
18	F	59	positiva	positiva	>32	0.094	0.125	0.75	0.75
19	F	38	positiva	positiva	8	0.25	0.19	0.5	0.125
20	M	23	positiva	positiva	4	0.032	0.75	0.016	<0.016
21	M	45	positiva	positiva	>32	0.032	0.19	0.5	<0.016

En sombreado se identifican a las diez cepas que presentaron una CIM >8, indicativo de resistencia secundaria para metronidazol (47.6%), apenas existió una cepa que presentó una CIM de 1.5 ug/ml para claritromicina (4.7%). Resistencia dual tanto al metronidazol como a la claritromicina no fue observada en este estudio.

Diez cepas presentaron una CIM >8 por lo que se concluye que la resistencia secundaria para metronidazol es del 47.6%, mientras que apenas una cepa (4.7%) presentó resistencia a la claritromicina con una CIM de 1.5 ug/ml para este macrólido. Resistencia dual tanto al metronidazol como a la claritromicina no fue observada en este estudio.

Con relación a la amoxicilina, todas las cepas presentaron una CIM menor a 0.75 ug/ml, la azitromicina tuvo un comportamiento similar a la claritromicina, y las CIM para trovafloxacin no superaron los 0.75 ug/ml.

## Discusión

La prevalencia de resistencia de *H. pylori* se considera como una consecuencia del consumo indiscriminado de antimicrobianos en la comunidad. En este estudio se encontró una prevalencia de la resistencia al metronidazol del 48%, sin embargo, estudios realizados en Guayaquil - Ecuador, reportan cifras tan altas como de un 80.9%.<sup>13</sup> Pero la prevalencia de la resistencia al metronidazol entre cepas de *H. Pylori* es muy variable, así en países desarrollados, la prevalencia de la resistencia varía entre el 11 al 70%,<sup>14-18</sup> mientras que en países en vías de desarrollo la resistencia al metronidazol parece ser más alta, pudiendo alcanzar cifras superiores al 95%.<sup>19,20</sup> Esto sugiere que actualmente la efectividad del tratamiento empírico con metronidazol puede ser muy baja.

La resistencia observada en este estudio es probablemente debida al uso de estos antimicrobianos para otro tipo de infecciones, por ejemplo, de las 21 ce-

pas aisladas, 16 corresponden a mujeres (76%), lo que sugiere que la resistencia en este grupo poblacional puede deberse al uso de estos agentes en problemas infecciosos genitourinarios. Vale la pena también mencionar que en el Ecuador la utilización del metronidazol como antiparasitario, es una práctica frecuente lo que podría estar contribuyendo al incremento aquí observada.

La prevalencia de resistencia a claritromicina, encontrada en este estudio es del 5%, comparable con la mayoría de estudios cuya resistencia es inferior al 12%.<sup>18,21</sup> Esta resistencia tiende a bajar en países en los cuales no ha sido utilizada ampliamente y en donde tampoco otros macrólidos no han sido utilizado en forma indiscriminada.<sup>22,23</sup> De todas maneras, existen algunos reportes en los cuales se menciona una resistencia del 27% en el Japón<sup>24</sup> o del 50% en el Perú.<sup>20</sup> A diferencia de otros investigadores,<sup>17,18</sup> en este estudio no se encontró resistencia concomitantemente para el metronidazol y la claritromicina.

En relación al bajo porcentaje de cultivos positivos (35%) encontrados, a pesar de que fueron pacientes, en quienes persistía la sintomatología por *H. pylori*, posiblemente se deba a la localización de la toma de biopsia. En este sentido, varios autores han mencionado la importancia de la toma de muestra en sitios adecuados.

Existen múltiples metodologías para determinar la prueba de sensibilidad que se usará para un microorganismo y lograr establecer cual será el punto de corte para un antimicrobiano a un microorganismo dado. Es decir hay que establecer la concentración de antibiótico a la cual una bacteria se considera como sensible o resistente. Estandarizar estos métodos depende de la velocidad de crecimiento de la bacteria, si requiere un medio complejo para desarrollarse, atmósfera especial, entre otros factores. Muchas de estas bacterias "fastidiosas" como el *H. pylori*, son problemáticas y ha pesar de que se han realizado grandes progresos aún no hay un consenso para los puntos de corte de la mayoría de antimicrobianos. Recientemente, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aprobó el método de dilución en agar como el método de elección para *H. pylori*, sin embargo para metronidazol no hay un valor predictivo de lo encontrado in vitro en relación al éxito o fracaso del tratamiento, mientras que para la claritromicina este valor predictivo es más confiable.<sup>25</sup> Así se ha observado que la erradicación de cepas resistentes al metronidazol es más baja que las cepas sensibles (75% vs. 97%), mientras que para la claritromicina hay mayor relevancia clínica pues la erradicación de una cepa resistente frente a una sensible es del 95% vs. 40%.<sup>26</sup> Pero en pacientes cuya erradicación ha fallado, la resistencia secundaria tiene una tasa de al menos un 50% tanto para metronidazol como para claritromicina.<sup>26</sup>

Aún cuando en los pacientes que ingresaron al estudio persistía su sintomatología, en el 55% de ellos no se logró visualizar ni cultivar la bacteria, y la prue-

ba de urea fue negativa. Esto podría mejorarse si se cultivan biopsias de mucosa gástrica de varios sitios, probablemente los pacientes mantengan el *H. pylori* pero la biopsia no fue representativa. En 6 de ellos se visualizaron los bacilos curvos en las improntas y la prueba de ureasa fue positiva pero no logramos el cultivo debido quizás a que no se utilizó el medio de transporte adecuado.

En conclusión este estudio encontró una alta prevalencia de resistencia a metronidazol en las cepas de *H. pylori* y una baja resistencia a claritromicina, después de una falla de tratamiento, lo que sugiere que la resistencia presentada por el *H. pylori*, es un problema que requiere una vigilancia continua de los patrones de sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos y es imperativo conocer estos patrones antes de iniciar una terapia de erradicación.

### Agradecimiento

Al Dr. Camilo Zurita Salinas, del Laboratorio de Inmunología y Medicina Tropical, Centro de Biomedicina, Universidad Central del Ecuador, por su revisión crítica de este manuscrito.

### Bibliografía

1. Thomas JE, Pretolani S. Epidemiology of the infection. *Curr Opin Gastroenterol* 1994;10 (Suppl.1):6-11.
2. Blaser M, Parsonnet J. Parasitism by the slow growing bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994;94:4-8.
3. Eurogast Study Group. An international association between *H. pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993;341:1359-1362.
4. Hentschel E, Brandstatter G, Dragosics B, Hirschl M, Nemeč H, Schutze K, Taufer M, Wurzer H. Effect of ranitidine and ampicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993;328:308-312.
5. Seppälä K, Pikkarainen P, Sipponen P, Kivilaakso E, Gormsen M, the Finnish Gastric Ulcer Study Group. Cure of peptic gastric ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995;36:834-837.
6. Graham DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* 1998;115:1272-1277.
7. Dore MP, Realdi G, Mura I, Osato MS, et al. Amoxicillin-resistant strains of *Helicobacter pylori* undergo reversible loss of resistance after storage. *Gut* 1997;412 (Suppl. 1):A8
8. European Study Group on Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicentre European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:777-781.
9. Glupczynski Y, Burette A, de Koster E, et al. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:976-977.
10. Van Zwet AA, de Boer WA, Schneeberger PM, et al. Prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:861-864.
11. Wolle K, Nilius A, Leodolter WA, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to several antimicrobial

- agents in a region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:519-521.
12. Ling TK, Cheng AF, Sung JJ, et al. An increase in *Helicobacter pylori* strains resistant to metronidazole: a five year study. *Helicobacter* 1996;1:129.
13. Debets-Ossenkopp YJ, Reyes G, Mulder J, et al. *Helicobacter pylori* Antimicrobial susceptibility Patterns in Guayaquil-Ecuador. Is there still a role for metronidazole in empiric *H. pylori* treatment?. 2000. 40th ICAAC. Abstract 521. Pag 168
14. Glupczynski Y. Results of a multicenter European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:777-781.
15. Karim Q, Logam R. Emerging patterns of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) antimicrobial resistance in Europe. *Gut* 1996;39:A51.
16. Parsonnet J, Blaser M, Perez-Perez G, Hargrett-Bean N, Tauxe R. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* 1992;102:41-46.
17. Reddy R, Osato M, Gutierrez O, Kim J, Graham D. Metronidazole resistance is high in Korea and Columbia and appears to be rapidly increasing in the US. *Gastroenterology* 1996;10:A235.
18. Olson C, Edwards A. Primary susceptibility of *H. pylori* to clarithromycin compared to metronidazole in patients with duodenal ulcers associated with *H. pylori*. *Gastroenterology* 1995;80:1589-1592.
19. Glupczynski Y, Burette A, Koster E, Nyst J-F, Deltenre M, Cadranel S, Bourdeaux L, DeVos D. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 335:976-977.
20. Vasquez A, Valdez Y, Gilman R, McDonald J, Westblom T, Berg D, Mayta H, Gutierrez V. Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring mics of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. *J Clin Microbiol* 1996;34:1232-1234.
21. Peterson W, Graham D, Marshall B, Blazer M, Genta R, Klein P, Stratton C, Drnec J, Prokocimer P, Siepmann N. Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized double-blind trial. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1860-1864.
22. Dunn B, Cohen H, Blazer M. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:720-741.
23. Vakil N, Hahn B, McSorley D. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in the United States. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1432-1435.
24. Mototsugu K, Yoshio Y, Kim J, et al. Regional differences in Metronidazole Resistance and Increasing Clarithromycin Resistance among *Helicobacter pylori* Isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 2214-2216.
25. Osato MS. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: sensitivity test results and their clinical relevance. *Curr Pharm Des* 2000;6:1545-1555.
26. Bazzoli F, Berretti D, De Luca L, et al. GAT Can be learnt from the new data about antibiotic resistance? Are there any practical clinical consequences of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11 (Suppl 2):S39-42.