



INFORME BREVE

Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de lesiones gástricas



Laura del V. Pereyra^a, Rosa C. Gorordo Ipiña^b, Fabiana A. Berruezo^a,
Cristian A. Amieva^a, Maria E. García^a y Marina T. Bottiglieri^{a,*}

^a Servicio de Microbiología, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Córdoba capital, Argentina

^b Servicio de Gastroenterología, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Córdoba capital, Argentina

Recibido el 25 de julio de 2016; aceptado el 19 de noviembre de 2016

Disponible en Internet el 13 de mayo de 2017

PALABRAS CLAVE

Helicobacter pylori;
E-test;
Difusión por discos;
Sensibilidad a los
antimicrobianos

KEYWORDS

Helicobacter pylori;
E-test;
Disk diffusion;
Antimicrobial
susceptibility

Resumen Se evaluó la sensibilidad a los antimicrobianos de 30 aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de biopsias gástricas mediante los métodos de difusión por discos y tiras de E-test. Los antimicrobianos evaluados fueron amoxicilina, claritromicina, metronidazol y ciprofloxacina. No se encontraron cepas resistentes a amoxicilina, el 17% (5/30) fueron resistentes a claritromicina, el 20% (6/30) a ciprofloxacina por ambos métodos, y el 37% (11/30) a metronidazol por E-test. Si bien el número de cepas estudiadas fue reducido, hubo una sola discrepancia en la interpretación de la sensibilidad cuando se compararon ambos métodos: el metronidazol fue categorizado como sensible por E-test e intermedio por el método de difusión por discos. No pudo determinarse una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión histológica y el patrón de resistencia encontrado.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric lesions

Abstract Antimicrobial susceptibility was evaluated by two diffusion methods: E-test strips to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and disk diffusion for amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and ciprofloxacin in 30 *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsies. No strains were resistant to amoxicillin, 17% (5/30) were resistant to clarithromycin, 20% (6/30) ciprofloxacin by both methods, and 37% (11/30) to metronidazole by the E-test. Although the number of strains studied was reduced, there was a single mismatch in interpreting susceptibility when both methods were compared; the same mismatch was observed for

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marinabottiglieri@gmail.com (M.T. Bottiglieri).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.001>

0325-7541/© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

metronidazole, being categorized as sensitive by the E-test and as intermediate by disk diffusion. No association between the histological type of lesion and the resistance pattern found could be determined.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Helicobacter pylori es un bacilo gram negativo, curvado, microaerófilo, con una importante movilidad debido a sus flagelos polares. El hombre es su reservorio natural, en él coloniza la cavidad gástrica, dentro del moco en contacto con el epitelio, y causa infecciones que contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades gastroduodenales, entre ellas úlceras, gastritis atróficas, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa y adenocarcinoma. Es probable su asociación a otras manifestaciones cardiovasculares, dermatológicas y hematológicas. Los individuos infectados tienen de 2 a 6 veces más riesgo de desarrollar cáncer gástrico y linfoma comparados con sus contrapartes no infectados⁷. La prevalencia de infección en la población adulta en América Latina oscila entre el 72 y el 90%⁷.

La eliminación de *H. pylori* mejora la evolución de la patología gástrica y previene las recurrencias y otras complicaciones. La efectividad de la erradicación en relación con el tratamiento estándar, basado en una triple terapia que incluye inhibidores de la bomba de protones (IBP), amoxicilina y claritromicina¹⁴, ha disminuido en un 30% en los últimos años; esto podría corresponder, según Hunt et al.⁷, al incremento de la resistencia a claritromicina y a una baja adherencia al tratamiento.

La realización del cultivo y antibiograma antes de iniciar un tratamiento de erradicación no es un procedimiento costo-efectivo y no se utiliza de forma rutinaria, por lo que la selección del esquema terapéutico se basa en recomendaciones internacionales. El conocimiento de los patrones locales de sensibilidad puede ser una herramienta valiosa para indicar los esquemas más apropiados en cada población en particular.

El *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) recomienda el método de dilución en agar para realizar las pruebas de sensibilidad; este es útil para un número elevado de cepas, pero laborioso para ser implementado como método rutinario. Dos métodos alternativos han sido reportados: el método de difusión por discos de Kirby Bauer y el test epsilométrico conocido como E-test, este último avalado por la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC)².

Los objetivos de nuestro estudio fueron determinar los patrones de sensibilidad de *H. pylori* aislados de muestras gástricas en nuestro medio y establecer si existe asociación entre la resistencia a los antimicrobianos y el tipo de lesión histológica encontrada.

Se realizó un trabajo observacional transversal y analítico en los servicios de Microbiología y Gastroenterología de la Clínica Universitaria Reina Fabiola (Córdoba, Argentina). Se analizaron consecutivamente las biopsias gástricas de 378

pacientes mayores de 15 años a los que se les realizó una endoscopia digestiva alta con fines diagnósticos, durante el periodo comprendido entre julio del 2013 y diciembre del 2015.

Debido a la distribución en parches que tiene este microorganismo, de cada paciente se tomaron 3 biopsias gástricas, 2 del antro y una del cuerpo, para efectuar el diagnóstico anatomopatológico basado en la clasificación del Sistema Sydney⁴ y el microbiológico.

Para el procesamiento de las biopsias gástricas, las muestras fueron conservadas a 4°C en medio de transporte de Cary Blair hasta su procesamiento, en un lapso no mayor de 2 h. Se realizó examen directo por coloración de Giemsa para visualizar los microorganismos con una morfología característica, esto es, bacilos con formas curvas, rectas o espiraladas presentes en los acúmulos de células gástricas.

Para el cultivo se utilizó medio selectivo agar Columbia suplementado con sangre de carnero al 5-10%, carbón al 4%, hemina al 0,2% y suplemento antibiótico V.C.N.T. con solvente Britania®, REF B0360521 (concentraciones finales: vancomicina, 3 µg/ml; colistina, 7,5 µg/ml; nistatina, 12,5 U/ml; trimetoprima, 0,5 µg/ml). Se incubaron en jarra con sobres generadores de atmósfera microaerófila GENbox microaer (BioMérieux®, REF 96125) a 35-37°C durante 7 días. Se realizaron lecturas de los cultivos a partir de las 48 h. Se consideraron compatibles con *H. pylori* las colonias pequeñas, de 1-2 mm de diámetro, puntiformes, no hemolíticas y translúcidas. La identificación se llevó a cabo mediante la morfología de la colonia, tinción de Gram y la positividad de las pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se realizaron por las técnicas de difusión por discos y tiras de E-test. Se realizó un inóculo a partir del cultivo puro, con una densidad bacteriana de 3 en la escala de McFarland (aproximadamente 9×10^8 UFC/ml), se sembró en Mueller Hinton agar suplementado con 5-10% de sangre de carnero. Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: claritromicina (15 µg), metronidazol (5 µg), amoxicilina (10 µg) y ciprofloxacina (1 µg) con el método de difusión por discos y por el método de E-test. Las placas fueron incubadas en atmósfera microaerófila a 35°C durante 72 h. Para la técnica de difusión por discos, se empleó una placa para cada antimicrobiano debido al gran tamaño de los halos de inhibición. Para la interpretación de los resultados de la CIM por E-test se utilizaron los puntos de corte propuestos por la BSAC, versión 2013: para amoxicilina, sensibles $\leq 0,12$ µg/ml y resistentes $> 0,12$ µg/ml; para claritromicina, sensibles $\leq 0,25$ µg/ml y resistentes $> 0,5$ µg/ml; para metronidazol,

sensibles $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ y resistentes $> 4 \mu\text{g/ml}$, y para ciprofloxacina, sensibles $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ y resistentes $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ².

Los puntos de corte para interpretar los resultados obtenidos con la técnica de difusión por discos se tomaron de la bibliografía. Para amoxicilina, los aislamientos se consideraron sensibles en presencia de diámetros $> 25 \text{ mm}$ y resistentes si aquellos fueron $\leq 25 \text{ mm}$; para claritromicina, se categorizaron como sensibles los diámetros $> 21 \text{ mm}$ y como resistentes los $\leq 21 \text{ mm}$; para metronidazol, se consideraron sensibles los $> 21 \text{ mm}$, de sensibilidad intermedias los de $16\text{-}21 \text{ mm}$ y resistentes los $< 16 \text{ mm}$, y para ciprofloxacina, los $> 20 \text{ mm}$ se consideraron sensibles y los $\leq 20 \text{ mm}$ resistentes¹².

Los resultados se expresaron con estadística descriptiva: media (desviación estándar) para variables continuas y N (porcentaje) para variables cualitativas. Para evaluar la posible asociación entre la resistencia a los antimicrobianos con respecto al tipo de lesión histológica se utilizó el test de chi-cuadrado con test de Fisher. Se consideró como significativo un valor de $p \leq 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS statistics 22.

De un total de 378 pacientes estudiados, el 42% fueron hombres. Los pacientes con aislamiento exitoso tenían una media de edad de 44,37 (DE: 11,57) años. Del total de 378 biopsias gástricas analizadas, obtuvimos recuperación de *H. pylori* mediante técnicas culturales en 112 (29,6%). El hallazgo más frecuente en la videoendoscopia alta de los pacientes con cultivos positivos correspondió a lesiones gástricas del tipo folicular: 77/112 (69%). Estos datos se muestran en la [tabla 1](#).

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se practicaron solo con 30 aislamientos de *H. pylori* debido a la pérdida de viabilidad de algunas cepas recuperadas.

Los resultados obtenidos con el método de difusión por discos se compararon con los que arrojó el E-test. No se encontraron cepas resistentes a amoxicilina; el 17% (5/30) fueron resistentes a claritromicina y el 20% (6/30) a ciprofloxacina por ambos métodos; mientras que el 37% (11/30) presentó resistencia a metronidazol por E-test. Se observó solo una discrepancia entre ambos métodos: hubo una cepa con sensibilidad intermedia a metronidazol por el método de difusión por discos, con un halo de 16 mm, y categorizada como sensible por el método E-test, con una CIM de $4 \mu\text{g/ml}$.

Tabla 1 Lesiones histológicas asociadas a 112 aislamientos de *H. pylori*

N.º de cultivos positivos (%)	Hallazgo anatomopatológico
77 (69)	Lesión folicular
42 (38)	Gastritis crónica activa
14 (13)	Gastritis crónica atrófica
26 (23)	Gastritis erosiva
7 (6)	Gastritis crónica superficial quiescente
0 (0)	Gastritis degenerativa

En cuanto a la relación entre la lesión histológica documentada y la resistencia a los antimicrobianos, se observó que los aislamientos resistentes al metronidazol se recuperaron de lesiones foliculares, mientras que la resistencia a claritromicina fue más frecuente entre los aislamientos recuperados de gastritis erosivas. Dos aislamientos con resistencia a metronidazol y a claritromicina se encontraron en lesión folicular, y el único aislamiento que presentó resistencia a 3 antimicrobianos simultáneamente (metronidazol, ciprofloxacina y claritromicina) estuvo presente en una gastritis crónica activa y en una lesión folicular. Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión y el perfil de resistencia a los antimicrobianos. Estos datos se muestran en la [tabla 2](#).

En nuestra serie, todas las cepas fueron sensibles a la amoxicilina; este dato coincide con los de otros trabajos^{5,11}, si bien Kim et al.⁹ observaron una resistencia a este fármaco del 12,3%. La amoxicilina presenta una elevada eficacia frente a la erradicación de *H. pylori* como terapia de primera línea, dentro del esquema de triple terapia.

Los macrólidos son considerados antibióticos con buena actividad *in vitro* frente a *H. pylori*. La resistencia reportada en la mayoría de los países europeos frente a la claritromicina ronda el 2-5%^{11,13} y en la actualidad se observa un aumento de estos valores, especialmente en los países desarrollados^{6,15}. En poblaciones con resistencia menor del 20%, la terapia triple se administra 2 veces al día^{8,14}. En nuestro estudio encontramos una resistencia del 17%, lo que

Tabla 2 Relación entre la lesión histológica y el perfil de resistencia antimicrobiana de *H. pylori*

Antimicrobiano	Tipo de lesión gástrica					
	GCSQ ^a	GCAT ^a	GCACT ^a	FL ^a	GDE ^a	GE ^a
Metronidazol	1	-	3	5	-	2
Ciprofloxacina	-	-	1	2	-	2
Claritromicina	-	-	-	1	-	2
Amoxicilina	-	-	-	-	-	-
Metronidazol-claritromicina	-	-	1	2	-	1
Ciprofloxacina-claritromicina	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina-metronidazol	-	-	-	2	-	2
Metronidazol-ciprofloxacina- claritromicina	-	-	1	1	-	-

GCSQ: gastritis crónica quiescente superficial; GCAT: gastritis crónica atrófica; GCACT: gastritis crónica activa superficial; FL: lesión folicular; GDE: gastritis degenerativa; GE: gastritis erosiva.

^a Los valores de p obtenidos no fueron significativos.

Tabla 3 Sensibilidad antimicrobiana de *H. pylori* por el método de E-test (mg/l)

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango	Resistencia (%)
Amoxicilina	< 0,016	0,032	< 0,016-0,032	0
Claritromicina	< 0,016	4	< 0,016-> 256	17
Metronidazol	0,25	256	< 0,016-> 256	37
Ciprofloxacina	< 0,016	32	< 0,016-32	20

validaría su uso como terapia de primera línea junto a la amoxicilina y los IBP.

Las fluoroquinolonas se consideran terapia de segunda línea o tratamiento de rescate y han sido evaluadas para su posible empleo como tratamiento primario en adultos. En la literatura se han informado tasas de resistencia de hasta un 35% frente a la levofloxacina^{3,8}. En este trabajo, la resistencia fue del 20%.

Una terapia triple alternativa incluye un IBP administrado con claritromicina y metronidazol en poblaciones con una resistencia a este último fármaco menor del 40%⁸. El valor de 37% de resistencia observado en nuestra serie es comparable con los valores descriptos por otros autores, que expresan tasas de resistencias de 30-40%^{1,10,13}.

Los resultados de CIM₅₀, CIM₉₀ y el rango para los distintos antimicrobianos ensayados se detallan en la [tabla 3](#).

En conclusión, consideramos que todas las cepas estudiadas de *H. pylori* presentaron valores aceptables de sensibilidad a la amoxicilina y claritromicina, comparables con los que informan estudios realizados en otros países. Estos resultados apoyan la utilidad de la triple terapia para la erradicación de esta bacteria en nuestro medio. Por el contrario, no pudimos determinar una asociación entre el patrón de resistencia a los antimicrobianos y el tipo de lesión histológica; esto último podría deberse al reducido tamaño muestral.

Consideramos que los estudios de sensibilidad deberían ser efectuados en cada región en particular debido a la variación geográfica y al aumento de resistencia en los últimos años.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de intereses

Los autores indican no presentar ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Al Área de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina), por su contribución en los reactivos, y a la Dra. Ana Bertoli, por sus aportes en el tema.

Bibliografía

1. Aristine C, Wang-Huei S, Jyh-Ming L, Hsiu-Po W, Ming-Shiang W, Jaw-Town L, Shan-Chwen C. Comparative in vitro antimicrobial susceptibility and synergistic activity of antimicrobial combinations against *Helicobacter pylori* isolates in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48:72–9.
2. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC). Methods for antimicrobial susceptibility testing. Additional information Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Version 12 May 2013.
3. Chaohui Y, Lan L, Wenguo C. Levofloxacin susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in China: Comparison of E-test and disk diffusion method-2011. *Helicobacter.* 2011;16:119–23.
4. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: The Updated Sydney System. *Am J Surg Pathol.* 1996;20:1161–81.
5. Dore M, Kwon D, Graham D. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. 2001;6:79.
6. Francis M, Samuel C, Ann V, Manfred K, Manuel L, Alexander M, Leif P, Herman G, Youri G. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut.* 2013;62:34–42.
7. Hunt R, Megraud F, Vaz Coelho SL, Malfertheiner P, Hamid S, Wong Y, Krabshuis J, Goh K, Siao S, León R, Van Der Merwe S, Fock K, Cohen H, Vakil N, Bazzoli F, Fedail S. *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología. *Gastroenterol Latinoam.* 2010;2:165–81.
8. Jyh-Ming L, Chi-Yang C, Mei-Jyh C, Chieh-Chang C, Yu-Jen F, Ji-Yuh L, Jeng-Yih W, Jiing-Chyuan L, Tai-Cherng L, Wen-Hsiung C, Cheng-Hao T, Chun-Ying W, Tsung-Hua Y, Chun-Chao C, Hsiu Po W, Bor-Shyang S, Jaw-Town L, Ming-Jong B, Ming-Shiang W. The primary resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan after the National Policy to Restrict Antibiotic Consumption and its relation to virulence factors. *PLoS One.* 2015;10:e0124199.
9. Kim J, Jung H, Kim N, Song I. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients in 2003. *Korean J Gastroenterol.* 2004;44:126–35.
10. Laleh M, Forough S, Sarah M, Bahman P, Ramin N. Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test and disk diffusion for metronidazole and mutations in *rdxA* gene sequences of *Helicobacter pylori* strains. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;1:235–42.
11. Figueroa M, Cortes A, Pazos A, Bravo LA. Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido

- de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 2012;32:32–42.
12. Ogata S, Gales A, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: Comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Braz J Microbiol*. 2015;45:1439–48.
 13. Ogata S, Godoy A, Kawakami E, da Silva P. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56:645–8.
 14. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Atherton J, Axon A, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, el-Omar Kuipers EJ. The European Helicobacter Study Group (EHSG) management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61:646–64.
 15. Thung H, Aramin V, Vavinskaya S, Gupta J, Park S, Crowe M, Valasek. The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43:514–33.